

Entwicklung und Charakterisierung
plasma-copolymerisierter, pH-sensitiver Hydrogelschichten
als Funktions- und Immobilisierungsplattform
für biosensorische Anwendungen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) am Institut für Physik
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

in Kooperation mit dem
Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP)

vorgelegt von
Monique Levien
im November 2023

Gutachter:

Prof. Dr. Jürgen Kolb, Universität Rostock, Institut für Physik

Prof. Dr.-Ing. Hermann Seitz, Universität Rostock, Lehrstuhl für Mikrofluidik

Dekan:

Prof. Dr. Oliver Kühn, Universität Rostock, Institut für Physik

Datum der Einreichung:

28. November 2023

Datum der Verteidigung:

05. Juli 2024

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Jürgen F. Kolb, Professor vom Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V. (INP) und der Universität Rostock (Institut für Physik, Fachbereich Angewandte Physik: Bioelectrics) für die Betreuung und Begutachtung der Arbeit, sowie der fachlichen Diskussionen.

Ebenso danke ich Frau Dr. Katja Fricke, der ehemaligen Leiterin der Nachwuchsforschergruppe Biosensorische Oberflächen am Leibniz-Institut für Plasmaforschung und Technologie e.V., für die Bereitstellung und fachliche Betreuung des Themas.

Dr. Zahra Nasri danke ich für die Unterstützung bei den biosensorischen Tests. Außerdem danke ich der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Petr Skladal, insbesondere Dr. Zdeněk Farka und Matěj Pastucha, für die tolle Zusammenarbeit, Hilfe und Mitwirkung während meines Forschungsaufenthaltes an der Masaryk Universität Brunn.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Holger Testrich für das Korrekturlesen der Arbeit, den hilfreichen Tipps und ganz besonders für sein stets offenes Ohr. Danke „Fressfeind“ ☺

Ebenfalls möchte ich mich bei all meinen lieben Kollegen und Kolleginnen der Abteilung Plasmaoberflächentechnik, der Nachwuchsforschergruppe Biosensorische Oberflächen und der Forschergruppe Grüne Ammoniak Materialien des Leibniz-Instituts für Plasmaforschung und Technologie e.V. bedanken, für die ständige Hilfsbereitschaft, das angenehme Arbeitsklima und dem Zuhören der ein oder anderen Sorge meinerseits.

Nicht zuletzt gebührt ein ganz spezieller Dank meinen Freunden, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich über die gesamte Zeit der Promotion unterstützt und motiviert haben. Sie waren immer für mich da und die ganzen Jahre in vielerlei Hinsicht eine große Stütze.

Zum Schluss möchte ich meinen beiden Lieblingsmenschen danken. Einen herzlichen Dank an meinen Partner und gleichzeitig besten Freund dafür, dass er mir immer den Rücken freigehalten hat und mich bei allen Entscheidungen stets unterstützt hat. Seine Geduld und sein ruhiges Wesen haben mir auch in schwierigeren Zeiten immer Kraft gegeben. Unserem gemeinsamen Sohn danke ich für die kindliche Sichtweise auf die wichtigen Dinge im Leben, wodurch ich immer wieder geerdet wurde.

Kurzfassung

Hydrogele sind dreidimensional verknüpfte Netzwerke aus polymerisierten Monomerstrukturen. Als Antwort auf einen Umgebungsreiz (z. B. pH-Wert, Temperatur, Biomoleküle) können sie – durch strukturelle Veränderungen – Wasser aufnehmen und wieder abgeben. Dies macht sie zu interessanten Kandidaten im medizinischen Bereich für kontrollierte Wirkstofffreisetzung oder biosensorische Anwendungen. Darüber hinaus sind Hydrogele weiche, flexible und biokompatible Materialien, wodurch sie eine gewebeähnliche Grenzfläche, beispielsweise für implantierbare Sensoren, darstellen können. Die Hydrogelschichten werden üblicherweise nass-chemisch in mehreren Einzelschritten und durch zusätzliche Vernetzermittel erzeugt. Die Schwierigkeiten bei der Entwicklung bestehen zudem in der Gewährleistung der Stabilität der Schicht bei gleichzeitiger Funktionserhaltung sowie der Kompatibilität gegenüber Materialoberflächen. Durch eine alternative Herstellungsrouten mittels Plasma können Schichteigenschaften wie Dicke, Vernetzung, Funktionalität, Anhaftung und Zusammensetzung präzise kontrolliert und verbessert werden. Weiterhin kann auf den Einsatz von Lösungsmitteln und Vernetzermitteln verzichtet werden. Diese Arbeit beschreibt ein neuartiges Herstellungsverfahren von Hydrogelschichten mittels Atmosphärendruck-Plasmajet sowie deren Charakterisierung und Eignung im Hinblick auf eine Funktions- und Immobilisierungsschicht für biosensorische Anwendungen.

Zunächst bestand die Herausforderung in der Darstellung der Hydrogele auf Basis von 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) und Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester (DEAEMA)-Monomeren durch Plasma-Copolymerisation. Dafür wurden aus vorangegangenen Arbeiten Prozessparameter optimiert und weiterentwickelt. Die Besonderheit besteht dabei in der Einfachheit des entwickelten Prozesses, wodurch innerhalb von Sekunden Hydrogele mit guten Hafteigenschaften entstehen, ohne dafür weitere Chemikalien zu verwenden. Es wurde festgestellt, dass die chemischen und mechanischen Eigenschaften der Schichten durch Veränderung des Mischungsverhältnisses der verwendeten Monomere eingestellt werden können. Mit diesem Verständnis erfolgte eine Übertragung auf Goldelektroden im Hinblick auf mögliche Sensoranwendungen. Da das Co-Monomer DEAEMA darüber hinaus pH-sensitive Eigenschaften besitzt, wurden Untersuchungen der Grenzflächenwechselwirkungen in Flüssigkeiten mit unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt, um die Empfindlichkeit gegenüber diesem Umgebungsreiz herauszustellen. Zuletzt wurde die Eignung der Hydrogele als Bindungsmatrix für Biomoleküle überprüft. Dafür wurden zwei verschiedene, gut untersuchte Enzyme ausgewählt, immobilisiert und in Gegenwart von ihren Substraten elektrochemisch untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass das pH-Wert-abhängige Verhalten in Kombination mit einer vergrößerten Oberfläche einen kontrollierten Transport elektroaktiver Spezies erlaubt. Dies ermöglicht nicht nur eine innovative, einfache Elektrodenmodifikation, sondern auch die Bereitstellung einer Plattform für Biomoleküle hinsichtlich (bio-)sensorischer Anwendungen.

Abstract

Hydrogels are three-dimensional, cross-linked networks consisting of one or more polymerized monomer structures. In response to an environmental stimulus (e.g. pH, temperature, biomolecules), they can absorb and release water through structural changes. This makes them interesting candidates in the biomedical field for controlled drug release or biosensing applications. Furthermore, hydrogels are soft, flexible and biocompatible materials, which allows them to provide a tissue-like interface, for example for implantable sensors. Hydrogel layers are usually generated *via* wet-chemical methods, comprising several steps and additional agents. In this context various challenges for the design and development have to be considered to ensure the stability of the layers while maintaining function, as well as compatibility for a range of material surfaces. A plasma assisted synthesis as alternative route can help to address these difficulties. Layer properties such as thickness, cross-linking, functionality, adhesion and composition can be precisely controlled and improved. Furthermore, the use of additional solvents, agents and cross-linking chemicals can be eliminated. This work describes a novel fabrication process of hydrogel layers by atmospheric pressure plasma jet and their characterization and suitability in terms of a functional layer and immobilization platform for biosensing applications. First, the challenge was to prepare the hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and methacrylic acid-2-diethylaminoethyl ester (DEAEMA) monomers by plasma copolymerization. For this purpose, process parameters from preliminary work were optimized in order to improve function and crosslinking of the layers on the model substrate silicon. What makes it special is the simplicity of the process developed, whereby hydrogel layers with good adhesion properties are formed within a few seconds without the use of further chemicals. It was found that the chemical and mechanical properties can be adjusted by varying the mixing ratio of the monomers used. Owing to this, the hydrogel layers were transferred to gold electrodes and characterized with respect to possible sensor applications. Since the monomer DEAEMA has pH-sensitive properties, interfacial interactions were investigated in liquids with different pH values to highlight the sensitivity to this environmental stimulus. Finally, the suitability of the hydrogels as a binding matrix for biomolecules was tested. For this purpose, two different well-studied enzymes were selected, immobilized and electrochemically studied in the presence of their substrates. The results showed that the pH-dependent behavior in combination with an increased surface area enables a controlled transport of electroactive species. This allows not only an innovative, simple electrode modification, but also the provision of a platform for biomolecules with regard to (bio)sensory applications.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	V
Kurzfassung	VII
Abstract	VIII
Abkürzungsverzeichnis	XI
Abbildungsverzeichnis	XIII
Tabellenverzeichnis	XVI
1 Einleitung	1
2 Zielstellung und Inhaltsübersicht	5
3 Grundlagen und Stand des Wissens	7
3.1 Hydrogele	7
3.1.1 Eigenschaften	8
3.1.2 Synthese	11
3.1.3 Verwendung.....	15
3.2 Grenzflächenwechselwirkungen.....	17
3.2.1 Oberflächenenergie und Benetzbarkeit.....	17
3.2.2 Elektrokinetisches Potential (Zetapotential).....	20
3.2.3 Cyclovoltammetrie.....	22
3.3 Enzymimmobilisierung.....	24
3.4 Biosensor	24
4 Apparativer Aufbau und Messmethoden	29
4.1 Hydrogelsynthese mittels Plasmapolymerisation	29
4.2 Oberflächenanalytik.....	31
4.2.1 Chemische Zusammensetzung.....	31
4.2.2 Benetzbarkeit und Oberflächenenergie.....	32
4.2.3 Topographie und Morphologie	33
4.2.4 Profilometrie	35
4.2.5 Oberflächenladung.....	35
4.3 Elektrochemische Charakterisierung	36
4.4 Enzymimmobilisierung.....	37
4.5 AChE-basierte Biosensorik	38
4.6 Glucose-Biosensor	38

5	Ergebnisse und Diskussion	39
5.1	Teil 1: Herstellung und Charakterisierung der Hydrogelschichten	39
5.1.1	Depositionsprozess plasma-polymerisierter Hydrogele	40
5.1.2	Chemische Hydrogelzusammensetzung FT-IR-Untersuchungen	42
5.1.3	Chemische Hydrogelzusammensetzung XPS-Untersuchungen	43
5.1.4	Morphologie und Schichtdicken	45
5.1.5	Topographie und Faltencharakteristik	49
5.1.6	Oberflächenladung	51
5.1.7	Zusammenfassung Teil 1	54
5.2	Teil 2: Untersuchungen zur Topographie und Grenzflächenwechselwirkungen plasma-polymerisierter Hydrogelschichten auf Goldelektroden	55
5.2.1	Oberflächenenergie und Benetzbarkeit	55
5.2.2	pH-abhängige Topographie	59
5.2.3	Untersuchungen zum elektrochemischen Ansprechverhalten	65
5.2.4	Herstellung und Untersuchungen dünnerer plasma-polymerisierter Hydrogelschichten	68
5.2.5	Zusammenfassung Teil 2	71
5.3	Teil 3: Biosensorische Funktionsprüfung	72
5.3.1	Acetylcholinesterase (AChE)-basierte Biosensorik	72
5.3.1.1	Aktivitätstest von AChE auf den Hydrogelschichten	73
5.3.1.2	Inhibitorwirkung von Eserin auf AChE	74
5.3.1.3	Stabilitätstest des adsorbierten AChE auf der Hydrogelschicht	76
5.3.1.4	Quantitative Bestimmung von Eserin als Hemmstoff	77
5.3.2	Glucoseoxidase (GOx) -basierte Biosensorik	77
5.3.2.1	Hydrogelschicht HD14 als Immobilisierungsplattform für GOx	78
5.3.2.2	Aktivitätstest GOx auf den Hydrogelschichten	80
5.3.3	Zusammenfassung Teil 3	83
6	Fazit und Ausblick	85
7	Literaturverzeichnis	89
8	Anhang	103
9	Publikationsliste	107
10	Lebenslauf	109
11	Eigenständigkeitserklärung	111

Abkürzungsverzeichnis

AC	<i>alternating current</i> , Wechselstrom
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
At. %	Atomprozent
ATChCl	Acetylthiocholinesterase
CV	Cyclovoltammogramm
DBD	Dielektrische Barriereentladung
DC	<i>direct current</i> , Gleichstrom
DEAEMA	Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDL	elektrochemische Doppelschicht
FAD	Favin-Adenosin-Dinukleotid
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie
GOx	Glucoseoxidase
HD	HEMA:DEAEMA
HEMA	2-Hydroxyethylmethacrylat
IEP	Isoelektrischer Punkt
K_a	Säuredissoziationskonstante
LTE	<i>local thermodynamic equilibrium</i> , Quasi-Gleichgewichtsplasma
NIST	National Institute of Standards and Technology
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECVD	<i>plasma enhanced chemical vapor deposition</i> ; Plasmaunterstützte, chemische Gasphasenabscheidung
PP	plasma-polymerisiert
PVD	<i>physical vapor deposition</i> , physikalische Dampfphasenabscheidung
ROS	<i>reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
R_q	quadratische Mittenrauheit
sccm	Standardkubikzentimeter
slm	Standardliter pro Minute
SFE	<i>surface free energy</i> , freie Oberflächenenergie

SPE	<i>screen printed electrode</i> , Siebgedruckte Elektroden
(V)UV	(Vakuum)-Ultraviolettstrahlung
WKW	Wasserkontaktwinkel
XPS	Röntgenphotoelektronenspektroskopie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Phasenübergänge von fest über flüssig zu gasförmig. Durch weitere Energizufuhr auf den gasförmigen Zustand entsteht Plasma.....	13
Abbildung 2:	Radikale im Plasmapolymer	14
Abbildung 3:	Festkörperbenetzung mit Kräftegleichgewicht nach Young.....	18
Abbildung 4:	Schema der Benetzbarkeit von Flüssigkeiten auf einer Oberfläche	20
Abbildung 5:	Schematische Darstellung einer elektrochemischen Doppelschicht an einer fest-flüssig Grenzfläche	21
Abbildung 6:	Beispiel eines Cyclovoltammogramms; gemessen in $K_3[Fe(CN)_6]:K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1)-Lösung als Redoxsonde.....	23
Abbildung 7:	Schematische Übersicht einiger ausgewählter Immobilisierungstechniken.....	24
Abbildung 8:	Schematische Darstellung eines Biosensors mit drei verschiedenen Biorezeptorkategorien: a.) Nukleinsäuren und DNA, b.) Antigen/Antikörper, c.) Enzyme auf einer biokompatiblen Schicht (z. B. Hydrogel)	25
Abbildung 9:	Schematische Darstellung des Atmosphärendruck-Plasmajets (links), beschrieben in [126] und fotografische Aufnahme des Jets mit Hydrogelmischung auf einem Siliziumwafer (rechts).	30
Abbildung 10:	Schematischer Aufbau der zwei Methoden zur Herstellung unterschiedlicher Hydrogelschichtdicken.....	30
Abbildung 11:	Schematische Darstellung der verschiedenen AFM-Modi	34
Abbildung 12:	Fotografische Aufnahmen der mittels Pipette abgesetzten Monomermischungen auf den Si-Wafern (obere Reihe) sowie den anschließend plasma-polymerisierten Hydrogelschichten unterschiedlicher Mischungsverhältnisse (untere Reihe).	41
Abbildung 13:	FT-IR-Spektren der plasma-polymerisierten (pp) HD-Filme (a) und der nicht-polymerisierten Monomermischungen (b)	43
Abbildung 14:	XPS-Elementaranalyse der verschiedenen Hydrogelmischungen direkt nach der Abscheidung und nach Lagerung in Wasser für 24 h	44
Abbildung 15:	Mikroskopische Aufnahme eines Hydrogels mit 100x-Vergrößerung.....	46
Abbildung 16:	Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme bei 400-facher Vergrößerung	47

Abbildung 17:	Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme bei 1500-facher Vergrößerung	48
Abbildung 18:	Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme mit Blasenstrukturen nach der Lagerung in Wasser.....	49
Abbildung 19:	AFM-Bilder der Faltenstrukturen der HD-Filme in Abhängigkeit vom HD-Mischungsverhältnis und den entsprechenden Höhenprofilen mit Rauheitsparameter.....	50
Abbildung 20:	Faltenwellenlänge (λ) und Faltenhöhe (A) in Abhängigkeit der Schichtdicke bestimmt durch AFM-Messungen.....	51
Abbildung 21:	Zeta-Potentiale der verschiedenen Hydrogelmischungen und Glas als Referenzsubstrat, gemessen im Bereich von pH 4 bis pH 9.....	53
Abbildung 22:	Freie Oberflächenenergie der Hydrogele, eingeteilt in polare und dispersive Anteile	56
Abbildung 23:	Freie Oberflächenenergie der in verschiedenen pH-Lösungen gelagerten HD-Filme	58
Abbildung 24:	Topographie (a) und Höhenprofil (b) einer unbeschichteten Goldelektrode.....	60
Abbildung 25:	AFM-Aufnahmen mit den entsprechenden Höhenprofilen der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtungen a) HD14, b) HD11 und c) HD41 auf Goldelektroden an Luft	61
Abbildung 26:	AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhenprofile der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtung HD14 auf Goldelektroden in a) saurer (pH 4), b) neutraler (pH7) und c) alkalischer (pH 10) Lösung	62
Abbildung 27:	AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhenprofile der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtung HD11 auf Goldelektroden in a) saurer (pH 4), b) neutraler (pH7) und c) alkalischer (pH 10) Lösung	63
Abbildung 28:	AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhenprofile der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtung HD41 auf Goldelektroden in a) saurer (pH 4), b) neutraler (pH7) und c) alkalischer (pH 10) Lösung	64
Abbildung 29:	Cyklische Voltammogramme	66
Abbildung 30:	Freie Oberflächenenergie der in verschiedenen pH-Lösungen gelagerten HD-Hydrogelen, welche mit der Verneblermethode hergestellt wurden	69
Abbildung 31:	Cyklische Voltammogramme (A–C) der dünneren plasma-polymerisierten Hydrogelmischungen (erzeugt durch das Verneblerverfahren) in unterschiedlichen pH-Pufferlösungen.....	70

Abbildung 32:	Cyklische Voltammogramme der mit AChE immobilisierten, plasma-polymerisierten Hydrogelmischungen auf den Goldelektroden	74
Abbildung 33:	Amperometrische Messungen von AChE immobilisiert auf den Hydrogelschichten	75
Abbildung 34:	Amperometrische Messungen mit AChE + HD auf der Goldelektrode nach dem Waschen mit PBS (A) und Regenerationstest des Sensors (B)...	76
Abbildung 35:	Amperometrische Reaktionskurven zur quantitativen Bestimmung der Eserinkonzentration in Gegenwart von ATChCl bei einem Potential von 0,42 V vs. Ag (A) und Kalibrierkurve mit einer logistischen Vier-Parameter-Anpassung	77
Abbildung 36:	FT-IR-Spektren der einfachen Hydrogelschicht HD14 (rot) und der dreischichtigen Hydrogelschicht HD14-3 (blau).....	79
Abbildung 37:	Cyclovoltammogramme von 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ in PB (pH 7,0) auf der unmodifizierten Goldelektrode (schwarz) und nach Beschichtung mit HD14 (rot) und HD14-3 auf der Goldelektrode (blau).....	80
Abbildung 38:	Cyklische Voltammogramme: A: GOx + HD14 auf der Goldelektrode. B: GOx + HD14-3 auf der Goldelektrode, in PB pH 7,0 (schwarz) und in Anwesenheit von 0,5 (rot), 1 (blau) und 2 mM (grün) Glucose	81
Abbildung 39:	Amperometrische Messung. A: GOx + HD14 auf der Goldelektrode in PB (pH 7,0) und die entsprechende Zugabe von verschiedenen Glucosekonzentrationen, gemessen bei 0,60 V vs. Ag. B: Kalibrierkurve des Glucosenachweises, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen	81
Abbildung 40:	Amperometrische Messung. A: GOx + HD14-3 auf der Goldelektrode in PB (pH 7,0) und die entsprechende Zugabe von verschiedenen Glucosekonzentrationen, gemessen bei 0,60 V vs. Ag. B: Kalibrierkurve des Glucosenachweises, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Oberflächenenergien der Testflüssigkeiten in mN/m 33
Tabelle 2:	Zuordnung chemischer Bindungen, dazugehörige Bindungsenergien und Atomprozentsätze der HD-Beschichtungen im abgeschiedenen Zustand und nach der Lagerung in Wasser, bestimmt mittels XPS-Messungen. 45
Tabelle 3:	Ermittelte Schichtdicken aus Profilometermessungen (n=3) und Faltenbreiten der Hydrogelschichten, gemessen aus den mikroskopischen Aufnahmen (n=10). 48
Tabelle 4:	Wasserkontaktwinkel der plasma-polymerisierten Hydrogele nach Eintauchen in Pufferlösungen von pH 4, 7 und 10 für die verschiedenen HD-Mischungsverhältnisse..... 59
Tabelle 5:	Mittlere quadratische Oberflächenrauheiten (Rq) von Hydrogelen an Luft und in verschiedenen Pufferlösungen mit einer unbeschichteten Goldelektrode als Referenz..... 61

1 Einleitung

Biofunktionelle Beschichtungen mit gezielt einstellbaren Eigenschaften bieten ein großes Potential hinsichtlich verschiedener Anwendungen in biomedizinischen und biotechnologischen Bereichen. Als Funktionsschicht in der Sensorik sind sie beispielsweise die Schlüsselemente, um Interaktionen zwischen sensorischer Oberfläche und Analyten zu regulieren. Schichten auf Hydrogelbasis gehören dabei mit zu den effektivsten, aufgrund ihrer Fähigkeit eine extrazelluläre Matrix nachzuahmen und damit der Möglichkeit bioaktive Moleküle unter physiologischen Bedingungen anzubinden [1, 2]. Hydrogele sind viskoelastische, feststoffartige, aber verformbare Materialien, die aus einem Polymernetzwerk bestehen [3]. Das hydrophile Polymer ist dabei chemisch oder physikalisch vernetzt, wodurch die strukturelle Stabilität entsteht, gleichzeitig wird die Auflösung des Polymers in wässrigen Medien verhindert [3]. Hydrogele sind in der Lage, große Mengen an Wasser zu absorbieren, zu halten und wieder abzugeben in Gegenwart bestimmter Umweltreize wie Temperatur- oder pH-Wert-Änderungen [3, 4]. Der hohe Wassergehalt und die weiche Struktur schaffen dadurch einzigartige Eigenschaften gegenüber starren, „regelmäßigen“ Oberflächen. So können beispielsweise bessere Biokompatibilität, Funktionalität, Permeabilität und Reizempfindlichkeit nutzbar gemacht werden. Dieses Potential macht sie zu attraktiven Kandidaten in verschiedenen Gebieten. Hydrogele werden industriell z. B. als Superabsorber in Hygieneartikeln [5] oder für funktionale Textilbeschichtungen [6] verwendet. In der Medizin finden sie Anwendung als Kontaktlinsen [7], Wundauflagen [8] oder als „*drug-delivery*“-Systeme [9]. Ein weiteres großes Anwendungsfeld ist der Einsatz als Funktionselement in der Sensorik und Mikrofluidik [10].

Acrylatbasierte Monomere eignen sich aufgrund ihrer Biokompatibilität und der Möglichkeit, mit Biomolekülen zu interagieren, hervorragend für die Herstellung von Hydrogelen [11, 12]. Des Weiteren können sie – in Abhängigkeit von ihrer Zusammensetzung – auf äußere Stimuli aus der Umgebung wie die Temperatur oder den pH-Wert reagieren und dadurch ihre Struktur verändern. Als Grundgerüst für die Herstellung acrylatbasierter Hydrogele wird häufig 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) verwendet. Polymere, die aus diesem Monomer bestehen, zeichnen sich durch gute mechanische Festigkeit und Elastizität aus [13, 14]. Durch die Copolymerisation mit einer anderen Verbindung kann ein komplexes, dreidimensionales Netzwerk mit regulierbaren Eigenschaften erzeugt werden. Ein gut untersuchter und einstellbarer Stimulus für Hydrogele ist der pH-Wert. Besonders im pharmazeutischen Bereich, als individuell angepasster Träger für die kontrollierte Arzneimittelfreisetzung, ist die Reaktion der Hydrogele auf sich ändernde pH-Werte

von Interesse [15-17]. Für diese Reizantwort kann beispielsweise ein dahingehend gut untersuchtes, ionisches Monomer wie Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester (DEAEMA) verwendet werden. Durch protonierbare und deprotonierbare Gruppen im DEAEMA werden – in Abhängigkeit des pH-Werts – feste Ladungen im Polymernetzwerk ausgebildet, wodurch ein pH-abhängiges Quellen oder Schrumpfen ermöglicht wird [15-17]. Des Weiteren wird durch die Copolymerisation von DEAEMA mit HEMA nicht nur eine stimuli-responsive Verbindung generiert, sondern auch ein hoher Grad an Vernetzung im Polymer erreicht.

Es gibt zahlreiche Herausforderungen, die dem Design und der Herstellung von Hydrogelen gegenüberstehen. So können die vorteilhaften Eigenschaften auch gleichzeitig ein Nachteil sein. Hydrogele sind weiche, verformbare Materialien, wodurch sie bei mechanischem Stress ihre Form verlieren können und zum Zerreißen neigen. Die Fähigkeit, Wasser aufzunehmen und unter bestimmten Umweltreizen wieder abzugeben, kann zu Defekten und Instabilitäten in der Schicht führen. Einer der größten Herausforderung ist jedoch ihre schwache Anhaftung an Oberflächen, wodurch die Anwendungen limitiert sein können. So bestimmt der Kontakt zwischen Oberfläche und Analyt die Sensitivität des Sensors. Durch Modifikation der Oberflächeneigenschaften und durch die Verwendung von Anheftungspromotoren wie auch Vernetzungschemikalien wurde versucht, dem entgegenzuwirken [18-20]. Dennoch führen diese Ansätze zu einer höheren Komplexität des Systems und verursachen zusätzliche Kosten beim Herstellungsprozess. Alternative Herstellungsverfahren sind daher erforderlich, sodass Kompatibilität und eine gute Performance unter verschiedenen Konditionen gegeben sind.

Hydrogele werden üblicherweise in mehreren Schritten erzeugt. Dabei erfolgt die Vorbehandlung der Substrate (Gold, Glas, Kunststoffe) zur Haftung meist mittels aggressiver Chemikalien (konzentrierte Schwefelsäure, Salpetersäure, Wasserstoffperoxid etc.), wodurch die Oberfläche oft beschädigt wird [21-23]. Die Polymerisation wird dabei durch den Einsatz von Hitze, Radikalen, Katalysatoren oder durch Bestrahlung im UV-Bereich initiiert. Zusätzlich werden sogenannte „Vernetzer“ zur Erzeugung des Polymernetzwerks benötigt [24-26]. Soll dann noch eine mikrostrukturierte Oberfläche für bestimmte Anwendungen erzielt werden, müssen konventionell erzeugte Hydrogelschichten einen weiteren Behandlungsschritt durchlaufen [27]. Ein alternatives Verfahren für Oberflächenmodifikationen und Beschichtungen bieten Atmosphärendruckplasmen, welche im Bereich für biomedizinische Anwendungen als materialschonend bekannt sind [28, 29]. Insbesondere Atmosphärendruck-Plasmajets (APPJ) wurden als effizientes Werkzeug zur Einführung funktioneller Gruppen wie =O, -OH, -O, -O =CO, -COC oder -NH in Abscheidungsprozessen eingesetzt [30-32]. Weiterhin konnte durch die Plasmabehandlung

der Probenoberfläche eine Verbesserung der Haftfestigkeit durch den Einbau sauerstoffhaltiger, funktioneller Gruppen nachgewiesen werden [33, 34]. Eine Erweiterung des Depositionsprozesses ist die Plasmapolymersation, die der radikalischen Photopolymerisation ähnelt. Das Ausgangsmonomer tritt dabei in Wechselwirkung mit reaktiven Spezies oder Radikalen des Plasmas, was zu neu vernetzten, fragmentierten und umgelagerten Monomerbausteinen führt [35]. Aufgrund der hohen Reaktivität der Plasmaspezies wird kein Initiator oder Vernetzungsmittel benötigt, die Polymerisation wird allein durch die Spaltung der Vinyl-doppelbindungen initiiert. Das resultierende Plasmapolymere kann dabei wesentliche Unterschiede zu den konventionellen Polymeren aufweisen, wie beispielsweise eine gute Haftung und neue, funktionelle Gruppen [35, 36].

Es gibt einige Arbeiten, die sich mit der Behandlung bzw. Aktivierung polymerisierter Hydrogelschichten im Nieder- oder Atmosphärendruckplasma beschäftigen [37-39]. Die Arbeit von Buxadera-Palomero et al. [38] zeigt beispielsweise die Polymerisation von HEMA mittels Atmosphärendruck-Plasmajet. Durch eine Optimierung der Prozessparameter für diese Schichten können die Vorteile des Plasmas für eine stärkere Substratanhaftung sowie der Funktionalisierung und/ oder Vernetzung noch besser nutzbar gemacht werden. Durch den Zusatz eines weiteren Monomers können darüber hinaus funktionelle Hydrogelschichten entstehen. Die einfache Copolymerisation von acrylatbasierten, pH-sensitiven Monomeren mittels Atmosphärendruck-Plasmajet sowie deren Charakterisierung und Anwendungsüberprüfung für biotechnologische oder biomedizinische Sensoranwendungen wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben.

2 Zielstellung und Inhaltsübersicht

In dieser Arbeit soll ein neuartiger Herstellungsprozess von pH-sensitiven Hydrogelschichten mittels Plasmapolymersation gezeigt werden. Das Verfahren soll durch den Verzicht auf Vernetzungschemikalien und die Vermeidung von Abfallprodukten eine umweltfreundliche Alternative im Vergleich zu nass-chemischen Methoden darstellen. Angeknüpft wird dabei an bereits veröffentlichte Vorarbeiten mit einem Atmosphärendruck-Plasmajet [38]. Die daraus entstandenen Schichten aus HEMA sollen durch Prozessparameteroptimierung hinsichtlich Funktionalität und Vernetzung, sowie Stabilität und Haftung weiterentwickelt werden. Für die Stabilität innerhalb der Schicht soll als zweites Monomer DEAEMA zugesetzt werden, ohne dabei die Probenhandhabung im Prozess zu verändern. Durch die Verwendung von DEAEMA können sowohl stärkere Vernetzungsreaktionen auftreten, als auch zusätzliche Funktionen durch die pH-sensitiven Eigenschaften eingeführt werden. Diese Zusammensetzung macht die Schichten zu interessanten Kandidaten als Funktions- und Immobilisierungsschicht für analytische und biosensorische Anwendungen. Infolgedessen müssen die entstandenen Hydrogelschichten charakterisiert werden, um ein tieferes Verständnis der chemischen Stabilität und Funktionalität zu erhalten. Außerdem sollen Immobilisierungsexperimente mit Enzymen Aufschluss über die Kompatibilität der Schichten in biologischen Systemen geben. Die Umsetzung dieser Ziele erfolgt in drei Abschnitten, die sich in Kapitel 5 – Ergebnisse und Diskussion – widerspiegeln.

Die Herstellung der Hydrogele erfolgte durch kontrollierte Prozessoptimierung mittels Plasmacopolymerisation unter Verwendung unterschiedlicher Mischungsverhältnisse der acrylatbasierten Monomere HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) und DEAEMA (Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester). Die Entwicklung und die Ergebnisse der Charakterisierung der erzeugten Schichten werden in **Kapitel 5.1** dargestellt. Es konnte mittels Strukturuntersuchungen gezeigt werden, dass stabile Hydrogelschichten erzeugt wurden. Durch das Herstellungsverfahren wurden simultan Mikrostrukturen auf den Hydrogeloberflächen generiert und untersucht, welche im weiteren Verlauf wichtige Zusammenhänge in Bezug auf Funktionalität, Reizantwort und Sensitivität liefern. Die Parameter für die Abscheidungen wurden dann, im Hinblick auf sensorische Anwendungen, auf Goldelektroden übertragen, was in **Kapitel 5.2** beschrieben wird. Dabei wurden Grenzflächen-Wechselwirkungen in Flüssigkeiten mit unterschiedlichen pH-Werten untersucht, um die Frage zu klären, ob die Hydrogelschichten als Funktionsschicht dienen können.

Veränderungen in der Morphologie, der Benetzung und des elektrochemischen Ansprechverhaltens deuteten auf ein pH-sensitives Verhalten in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses der Monomere. Einen weiteren Untersuchungsgegenstand stellte die Anwendbarkeit der Hydrogelschichten in der elektrochemischen Biosensorik, dar. Die Ergebnisse dazu werden in **Kapitel 5.3** gezeigt. Zwei Modellenzyme wurden ausgewählt und unter verschiedenen Gesichtspunkten analysiert. Zum einen wurde ein Glucoseoxidasensoren zur Detektion von Glucose entwickelt, zum anderen wurde die Inhibitorwirkung von Eserin auf Acetylcholinesterase dargestellt. Abschließend erfolgt ein Fazit der wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit sowie ein Ausblick für weiterführende Untersuchungsmöglichkeiten in **Kapitel 6**.

3 Grundlagen und Stand des Wissens

Dieses Kapitel soll unter Berücksichtigung des aktuellen Forschungsstandes eine theoretische Einführung in die oben erwähnte Zielstellung der vorliegenden Arbeit geben. Zunächst werden die Hydrogele definiert und ihre Eigenschaften genau beschrieben. Des Weiteren wird auf verschiedenen Synthesewege eingegangen, unter anderem auch auf die Herstellung mittels Plasmaverfahren und deren Besonderheiten. Ein weiterer Punkt ist die mannigfaltige Verwendung von Hydrogelen. Für die Beschreibung der Grenzflächenwechselwirkungen werden verschiedene Analysemethoden genauer erläutert. Im Anschluss wird auf die Bedeutung der Immobilisierung im Kontext dieser Arbeit eingegangen sowie auf die Definition und Funktionsweise eines Biosensors. Dies erfolgt an zwei Beispielen, welche dieser Arbeit zugrunde liegen.

3.1 Hydrogele

Gele sind feindispersierte, dreidimensionale Polymernetzwerke, die in einem entsprechenden Lösungsmittel nicht mehr löslich sind. Die Aufnahme des Lösungsmittels durch das Gel wird Quellung genannt; handelt es sich dabei um Wasser, spricht man von Hydrogelen. Die „moderne“ Geschichte der Hydrogele für biomedizinische Anwendungen geht auf das Jahr 1936 zurück [40]. In ersten Arbeiten wurde über (poly)HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) als sprödes, transparentes Polymer gesprochen. 1960 wurde dann erstmals über die Polymerisation von HEMA mit Vernetzern und Wasser als Lösungsmittel berichtet, mit dem Ergebnis eines wassergequollenen, elastischen Gels [40]. Aus diesen Beobachtungen ergaben sich neue Forschungs- und Entwicklungsfelder für natürliche und synthetisch hergestellte Hydrogele. Die Vorteile von Gelen auf Naturstoffbasis, wie Gelatine und Kollagen, sind ihre biologische Abbaubarkeit, Biokompatibilität sowie ihr reichhaltiges Vorkommen. Des Weiteren sind sie ungiftig und kostengünstig. Der große Nachteil ist jedoch die schlechte mechanische Festigkeit. Aus diesem Grund wurden natürliche Hydrogele weitestgehend durch synthetische ersetzt, um eine höhere Lebensdauer, eine bessere Gelfestigkeit und eine gesteigerte Wasseraufnahmekapazität zu erreichen [41].

Hydrogele können hinsichtlich ihrer Zusammensetzung in Homopolymere, Copolymere oder Multipolymere klassifiziert werden. Homopolymerbasierte Hydrogele bestehen aus einem Monomer und Copolymere aus zwei oder mehr verschiedenartige Monomere, in denen häufig eines der beiden Monomere hydrophile Gruppen bereitstellt [41-43]. Multipolymer-Netzwerke, auch Hybridnetzwerke genannt, umfassen interpenetrierende (IPNs) und semi-interpenetrierende

Netzwerke (Semi-IPNS). Bei diesen erfolgt die Polymerisation durch zwei oder mehr Polymere, üblicherweise durch Einbringen des vopolymerisierten Hydrogels in eine polymere Netzwerklösung aus Monomeren und einem Polymerisationsinitiator [41, 44]. Je nachdem, ob eine Vernetzungschemikalie verwendet wird oder nicht, entsteht ein vollständiges IPN oder ein Semi-IPN. Durch die Vielfalt an unterschiedlichen Materialien und Kombinationsmöglichkeiten entstehen somit einzigartige Netzwerktopologien mit einstell- und kontrollierbaren Eigenschaften, woraus ansprechende Kandidaten für Beschichtungsmaterialien resultieren können.

3.1.1 Eigenschaften

Wie bereits erwähnt sind Hydrogele dreidimensional verknüpfte Polymernetzwerke, bestehend aus einem oder mehreren wasserunlöslichen Monomeren. Die Vernetzung entsteht dabei entweder chemisch, durch kovalente Bindungen zwischen den Polymerketten, oder physikalisch aufgrund von Wasserstoffbrückenbindungen, Coulomb-Wechselwirkungen, Van-der-Waals-Kräften oder molekularen Verschlaufungen. Eine besondere Eigenschaft der Hydrogele ist ihre Viskoelastizität. Das heißt, sie besitzen durch ihren Polymer- und Wasseranteil sowohl feststoff- als auch flüssigkeitsähnliche Eigenschaften, wodurch sie die natürliche Umgebung und Transportvorgänge in biologischen Systemen nachahmen können [45-47]. Diese beiden Zustände können – je nach Anwendung – über den Grad der Vernetzung eingestellt bzw. optimiert werden. Es gilt dabei: Je stärker die Vernetzung, desto spröder und weniger flexibel/elastisch ist das Hydrogel [48].

Weiterhin sind sie in der Lage durch hydrophile Gruppen im Polymerrückgrat, wie beispielsweise $-COOH$, $-OH$, $-NH_2$, $-CONH-$ oder $-CONH_2$, Wasser unter beträchtlicher Volumenzunahme aufzunehmen (Quellung), ohne dabei ihre chemische Zusammensetzung zu verlieren. Das aufgenommene Wasser kann ebenso auch wieder aus dem Netzwerk abgegeben werden (Schrumpfen). Der Ausgangszustand des „trockenen“ Hydrogels wird als „glasig“ bezeichnet [49, 50]. Gelangen Wassermoleküle an die Hydrogeloberfläche, wird dieses hydratisiert, das heißt, dass es aufgrund elektrostatischer Kräfte zwischen den Wasser-Dipolen und den polaren Gruppen des Polymerrückgrates unter Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Anlagerung und Bildung einer Hydrathülle kommt. Die Maschen des polymeren Netzwerks beginnen sich zu lockern und auszudehnen, es entsteht ein weicher, „gummiartiger“ Übergang, wodurch das Wasser immer weiter eindringen kann [49, 50]. Des Weiteren dissoziieren sich im Polymer befindende funktionelle Gruppen, wodurch ein osmotischer Druck aufgebaut wird, der das Wasser in das Innere des Gels transportiert. Nicht nur der osmotische Druck beeinflusst das

Quellverhalten, sondern auch die Elastizität, welche durch die Vernetzung entsteht. Beide Faktoren wirken der Ausdehnung entgegen und verhindern eine Verformung des Gels. Das Quellen wird also durch das Gleichgewicht zwischen Osmose und Elastizität begrenzt [49, 51].

Hydrogele können je nach Art ihrer Zusammensetzung auf Umwelteinflüsse reagieren, darum werden sie auch als „stimuli-sensitiv“ bezeichnet. Es gibt drei verschiedene Arten von Umwelteinflüssen:

1. die physikalischen Stimuli – Licht, Druck, Temperatur oder elektrische Felder,
2. die chemischen Stimuli – Ionenstärke, pH-Wert, Redoxpotential, CO₂ oder Glucose,
3. die biologischen Stimuli – Enzyme, Antigene oder DNA.

Die Reaktion auf einen oder mehrere dieser Reize sind die reversiblen Volumen-Phasenübergänge, also das bereits oben beschriebene Quellen oder Schrumpfen/Kollabieren. Die Geschwindigkeit der Reaktion hängt unter anderem von der Größe, der Form, dem Grad der Vernetzung und der Anzahl der ionischen Gruppen des Gels ab [52]. Dabei gilt, dass sich die Antwortrate erhöht/beschleunigt, je kleiner, dünner und weniger vernetzt das Hydrogel ist und je mehr ionische Gruppen vorhanden sind [52-54].

Unter den auf Umwelteinflüsse reagierenden Hydrogelen sind pH-empfindliche die am meisten untersuchten. Polyelektrolytische Hydrogele, welche anionische oder kationische dissoziierbare Gruppen tragen, sind in der Lage, besonders viel Wasser aufzunehmen. Das Quellverhalten kann durch die Polymerkonzentration, den Ionisationsgrad und durch den pH-Wert des Mediums kontrolliert werden. Der pK_a -Wert spielt dabei eine wichtige Rolle: Als negativer Logarithmus von K_a , der Säuredissoziationskonstante, ist der pK_a -Wert der Hydrogele (bzw. des pH-sensitiven Monomers) derjenige pH-Wert, bei dem die ionisierbaren Gruppen ein Proton abgeben [55]. Hydrogele mit kationischen Gruppen (z. B. Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester (DEAEMA), Poly(Ethylpyrrolidin Methacrylate) (PEP), Poly(N,N-dialkylaminoethyl Methacrylate), Poly(Lysin), Chitosan) quellen beispielsweise aufgrund der Protonierung von funktionellen Gruppen des tertiären Amins bei einem pH-Wert, der gleich dem pK_a ist bzw. unter diesem liegt. Dies führt zur Bildung positiv fixierter elektrischer Ladungen im Makromolekül [56]. Im Gegensatz dazu quellen Hydrogele mit anionischen Gruppen (Poly(Methacrylsäure) (PMAS) oder Poly(Acrylsäure) (PAS)) bei einem pH-Wert über dem pK_a . Dies führt zur Ionisierung der Säuregruppen wie beispielsweise -COOH und damit zur Bildung von negativ fixierten Ladungen in den Polymerketten. In beiden Fällen führt die Ausbildung von Ladungen zu einem Anstieg der Hydrophilie des Gels, sodass das Eindringen und die Anlagerung von

Wasser erleichtert werden. Weiterhin kommt es zu einer elektrostatischen Abstoßung der gleichgeladenen ionischen Gruppen zwischen den Polymerketten, was zu einer gestreckten Konformation führt, welche das Quellen begünstigt [55].

Weiterhin können bei der Herstellung von Hydrogelen Mikrostrukturierungen erzeugt werden, wie etwa „Knicke“ oder „Falten“. Diese werden entweder während des Prozesses durch Oberflächeninstabilitäten verursacht, oder nachträglich durch Oxidation und Versteifung der Schicht generiert [57]. Dieses Phänomen kann verglichen werden mit dem Verhalten menschlicher Hautschichten (Epidermis, Dermis und Hypodermis) bei mechanischer Verformung, wie beispielsweise Muskelkontraktion oder mechanischer Kompression [58]. Beim Aufbringen eines Hydrogels auf eine Substratoberfläche wird zunächst eine fundamentale Schicht, das Polymerbulk, gebildet. An der Grenzfläche des Polymerbulks zur Luft bildet sich eine starre Schicht, die sogenannte „Haut-“ oder Deckschicht, welche die Knick- und Faltenbildung begünstigt. Dabei kann jede auf diese Deckschicht ausgeübte Kraft, welche durch Erwärmung/Kühlung, mechanische Dehnung/Stauchung, Quellung, Strahlung oder auch Lösungsmittelverdampfung erzeugt wird, zu einer solchen Verformung führen [58]. Von den gebildeten Falten lassen sich die Wellenlänge und die Amplitude bestimmen, wodurch nicht nur Aussagen über die Oberflächenmorphologie getroffen, sondern auch bestimmte Anwendungen im Hinblick auf eine Oberflächenvergrößerung definiert werden können. Viele experimentelle Faktoren beeinflussen dabei die Faltendimensionen. Abhängig vom Herstellungsverfahren liegt der Wellenlängenbereich der Falten mittels Plasmamodifizierung beispielsweise im Submikrometerbereich, wohingegen eine UV-Ozon-Behandlung Falten in einem Bereich von 10–100 μm erzeugt [58, 59]. Weiterhin entscheidet die Behandlungszeit maßgeblich über den Grad der Vernetzung der Oberfläche und somit über die Ausprägung der Wellenlänge der Falten. Bei niedrigen Temperaturen wurden größere Falten beobachtet, während die Erhöhung der Temperatur zu einer Verkleinerung der Faltenwellenlänge führt [44]. Auch die Filmdicke oder die chemische Zusammensetzung wirken sich auf die Ausprägung der Wellenlänge der Falten aus [60, 61]. Die Amplitude der Falten hingegen ist direkt abhängig von der Intensität und der Art des einwirkenden Stressfaktors wie z. B. der Temperatur, Dehnung/Kompression oder der Quellung [62].

Nicht nur die Bildung von Knicken und Falten aufgrund von Oberflächeninstabilitäten auf den Hydrogelen ist möglich, sondern auch eine Blasenbildung. Diese kommt beispielsweise beim Übergang von einer gequollenen in eine nicht-gequollene Struktur zustande [63-65]. Matsuo und Tanaka [66] berichteten in ihren Studien über Blasenstrukturen auf Acrylamidgelen, welche in Aceton lagerten und danach getrocknet wurden. So bildete sich im frühen Stadium des

Schrumpfens eine dichte undurchlässige Schicht auf der Geloberfläche, welche den Einschluss von umgebender Flüssigkeit zur Folge hat [66]. Es findet ein Wettbewerb statt, zwischen Bereichen, die schrumpfen und solchen, die mit Flüssigkeit gefüllt sind. Dieser Mechanismus führt zu einer Phasenseparation zwischen gequollenem und geschrumpftem Gel, einhergehend mit der Blasenbildung [66].

Die Anwendungsgebiete aufgrund der Falten- und Blasenformation sind vielfältig und reichen von biologisch-medizinischen Plattformen für kontrollierbare Aktivitäten oberflächenimmobilisierender Enzyme über wirkstofffreisetzende Systeme [67, 68] bis hin zu technisch anwendbaren Oberflächen mit einstellbarer Benetzbarkeit und optischen Eigenschaften [69, 70].

3.1.2 Synthese

Die Entstehung eines dreidimensionalen Hydrogelnetzwerks wird überwiegend durch die Polymerisation realisiert, einer chemischen Reaktion, bei der Monomere unter Auflösung der Mehrfachbindungen zu Polymeren reagieren. Unterschieden wird dabei zwischen Kettenwachstumspolymerisation und Stufenpolymerisation. Bei der ersten Methode wächst die Kette durch die Aktivierung der Monomere mittels freier Radikale, welche vom Initiatormolekül unter Energiezufuhr wie Licht oder Temperatur bereitgestellt werden [71]. Beim Kettenwachstumsmechanismus handelt es sich um eine Polymerisationsreaktion, die in kurzer Zeit zu einem Polymer mit hohem Molekulargewicht führt. Diese Art der Polymerisation umfasst viele Techniken wie Bulk-, Lösungsmittel-, Suspensions- und die Emulsionspolymerisation [71]. Besondere Formen dieser kontrollierten radikalischen Polymerisation sind außerdem die ATRP (*atom transfer radical polymerization*) oder die RAFT-Polymerisation (*reversible-addition-fragmentation chain-transfer polymerization*). Die schrittweise Polymerisation ist dagegen ein langsamerer Prozess, bei dem funktionelle Gruppen miteinander reagieren und kovalente Bindungen ausbilden [71].

Ein weiterer Punkt der Hydrogelsynthese ist die Vernetzung, auch Quervernetzung genannt. Die Vernetzung kann dabei entweder direkt bei der Synthese des Polymers oder durch Reaktionen am bereits bestehenden Polymer erreicht werden. Wie oben bereits erwähnt wurde, erfolgt dies physikalisch oder chemisch. Physikalisch vernetzte Hydrogele durch „*self-assembly*“, Wasserstoffbrückenbildung oder Kristallisation können nur schlecht an Materialoberflächen gebunden werden, da keine Bindungsstellen vorhanden sind, die in das Netzwerk eingebaut werden können. Darüber hinaus weisen die meisten physikalisch vernetzten Hydrogele im Vergleich zu

kovalent vernetzten Netzwerken oft schlechtere mechanische Eigenschaften auf [72, 73]. Chemisch vernetzte Hydrogele werden oft mit multifunktionalen Monomeren copolymerisiert. Dafür werden ein Radikalinitiator und Vernetzungschemikalien benötigt, welche durch UV-Bestrahlung, Temperatur oder durch ein Redoxsystem aktiviert werden. Zusätzlich zur freien Radikalpolymerisation gibt es noch durch Click-Chemie und Schiffbasen-Reaktionen generierte chemisch vernetzte Hydrogele [71]. Die Vernetzung beeinflusst maßgeblich die physikalischen Eigenschaften des Gels wie beispielsweise Elastizität, Löslichkeit, Viskosität, Stärke, Härte usw. [74]. Mikrostrukturen auf der Oberfläche von Hydrogelschichten sind bei bestimmten Anwendungen wie Biosensoren oder „*tissue engineering*“ wünschenswert und werden meist in einem zusätzlichen Schritt – während oder nach der Synthese – erzeugt. Konventionelle Methoden dafür sind Lithographie- oder Elektronenstrahltechnologien [75, 76] sowie UV-Bestrahlung [77] und Vakuumtechniken [57, 78].

Eine unkonventionelle Methode zur Synthese von Hydrogelen ist die Herstellung mittels Plasmaverfahren. Ein physikalisches Plasma, definiert durch Irving Langmuir im Jahr 1928 [79], ist ein (teilweise) ionisiertes Gas, bestehend aus Elektronen, Ionen und neutralen Komponenten (Atome, Moleküle, Radikale), welche sich im Grund- oder im angeregten Zustand befinden. Durch die Zufuhr von Energie können Phasenübergänge, von fest über flüssig zu gasförmig und schließlich zu Plasma, erzeugt werden (Abbildung 1). So werden physikalische Plasmen auch oft als „vierter Aggregatzustand“ bezeichnet [80]. Technisch genutzte Plasmen werden in der Regel durch elektrische Energie erzeugt, beispielsweise durch Gleichstrom (DC), Wechselstrom (AC), Hochfrequenz, oder Mikrowellen.

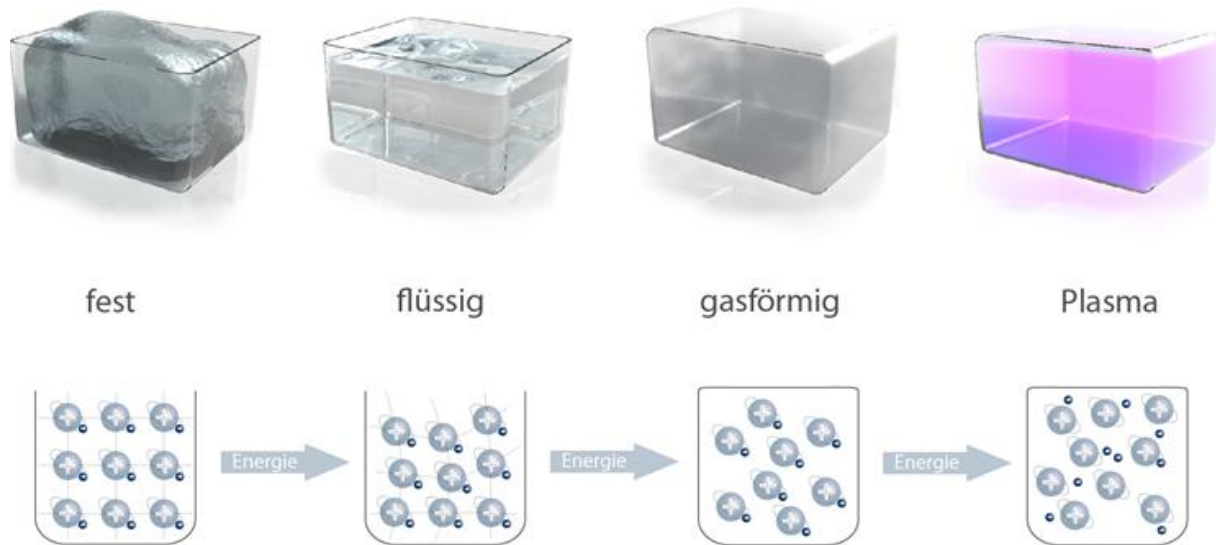


Abbildung 1: Phasenübergänge von fest über flüssig zu gasförmig. Durch weitere Energiezufuhr auf den gasförmigen Zustand entsteht Plasma (Bild: INP Greifswald).

Die Plasmapolymersation ist ein lösungsmittelfreier Schichtbildungsprozess, bei dem mittels eines physikalischen Plasmas dünne Schichten direkt auf die Oberflächen der Substrate abgeschieden werden – ohne jegliche Verarbeitung und ohne zusätzliche Vernetzermittel [35]. In der Gasphase und an der Oberfläche des Substrats bilden sich Radikale, welche die Polymerisation eines oder mehrerer Monomere initiieren. Durch die Einwirkung von Ionen, Elektronen und elektromagnetischer Strahlung kann es zu Rekombinations- und Umlagerungsprozessen der Monomerfragmente kommen, wodurch ungeordnete, stark vernetzte Plasmapolymere mit verschiedenen funktionellen Gruppen entstehen [35, 81, 82]. Plasma-produzierte Radikale und Radikalfragmente, die unterschiedlich verteilt sind – beispielsweise nur an der Oberfläche oder in tieferen Polymerschichten eingebaut – initiieren eine klassische Kettenwachstumspolymerisation zu Polymermolekülen (siehe Abbildung 2). Zusätzlich kommt es zu Nebenreaktionen mit dem umgebenden Luftsauerstoff, wodurch Peroxyradikale, Alkoxyradikale sowie Sauerstoffbiradikale entstehen [81, 82]. Diese sind Zwischenstufen im Oxidationsprozess und damit Startpunkte für die Bildung verschiedener funktioneller Gruppen wie beispielsweise Hydroxyl- oder Carbonylgruppen [83].

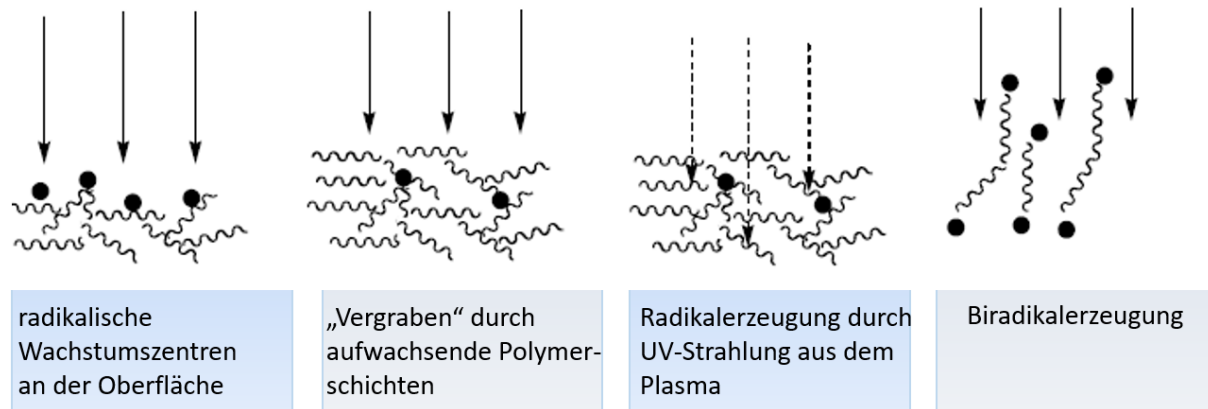


Abbildung 2: Radikale im Plasmapolymer (Abbildung aus [81]).

Es findet also keine Polymerisation im eigentlichen chemischen Sinne statt, sondern eine unspezifische Polymerisation, bei der das Ausgangsmaterial nicht in seiner ursprünglichen Form erhalten bleibt. Eine besondere Herausforderung für die verschiedensten Anwendungen von Hydrogelen besteht darin, eine gute Haftung zwischen Hydrogelen und anderen Materialien zu erreichen. Die schwache und spröde Bindung zwischen Hydrogelen auf festem Untergrund, wie Glas, Silizium, Silikon oder keramischen Wafern, behindert oft ihre Integration und Funktion in Vorrichtungen und Systemen [2, 84]. Ein weiterer Vorteil beim Einsatz eines physikalischen Plasmas zur Oberflächenmodifikation und Schichtherstellung sind die sehr guten Hafteigenschaften auf die verschiedensten Substratmaterialien wie Kunststoffen, Glas und Metallen, wobei die Abscheidung unabhängig von der Struktur des Substrats ist [85-87]. Durch die Variation der Prozessparameter wie beispielsweise Behandlungszeit, Druck oder Eingangsleistung sind die chemischen und physikalischen Eigenschaften gut einstellbar [81, 82]. Dennoch gibt es auch einige Nachteile: Die Struktureinheiten sind im Vergleich zu konventionellen Polymeren nicht regiospezifisch und regelmäßig [82, 83]. Auch die Multifunktionalität, die durch den Plasmaschichtungsprozess entsteht, wie etwa die Reaktionen mit dem umgebenden Sauerstoff, kann mitunter unerwünscht sein [82].

Es gibt einige Arbeiten, die sich mit der Herstellung von plasmapolymerisierten Hydrogelbeschichtungen beschäftigen. So wurden beispielsweise acrylatbasierte Monomere wie DMA-EMA (2-Dimethylaminoethylmethacrylat) und HEMA mittels eines Plasmaverfahrens im Niederdruckbereich polymerisiert. Veuillet et al. [88] verfeinerten dabei die Plasmaparameter so, dass hydrogelartige Schichten mit gut einstellbaren mechanischen Oberflächeneigenschaften entstanden sind. Bhattacharyya et al. [89] berichteten über die Erzeugung thermisch ansprechender, alkanolaminbasierter Hydrogelschichten, welche ebenfalls mittels Plasmaprozesse im Niederdruck hergestellt wurden.

Eine Plasmapolymerisation im Atmosphärendruckbereich vermeidet eine Schutzumgebung und Inertgasbedingungen, außerdem gilt das Verfahren als besonders materialschonend [90, 91], weshalb es vermehrt zur Synthese unter diesen Bedingungen kommt. Alavi et al. [37] zeigten beispielsweise eine Behandlung bzw. Aktivierung von Polymeren aus Polyethylen und Poly- ϵ -caprolacton mittels eines Atmosphärendruck-Plasmajets zur Erzeugung funktioneller Gruppen für die Biomolekülanbindung. Moreno-Couranjou et al. [92] verwendeten ein Atmosphärendruckplasma mit dielektrischer Barriereentladung (DBD) sowie die Monomere N-Vinylcaprolactam (NVCL) und Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA) zur Erzeugung wärmeempfindlicher Hydrogele. Sie untersuchten weiterhin die chemischen und mechanischen Oberflächeneigenschaften und entwickelten hochskalierbare, substratunabhängige Hydrogelbeschichtungen, welche als chemo-mechanische Ventile oder Aktoren eingesetzt werden könnten. Eine der neuesten Arbeiten im Bereich Plasmapolymerisation mittels eines Atmosphärendruck-Plasmajets entstand durch Buxadera-Palomero et al. [38], welche eine biokompatible HEMA-Beschichtung in einem einstufigen Plasmaprozess entwickelten. Jedoch wiesen diese Schichten zum Teil Stabilitätsprobleme auf.

3.1.3 Verwendung

Aufgrund der Vielfalt ihrer chemischen Zusammensetzung und der einzigartigen Eigenschaften entsteht ein abwechslungsreiches Anwendungsspektrum für Hydrogele. Nachfolgend werden einige Beispiele in Bezug auf die Eigenschaften der Hydrogele aus dem (bio-)medizinischen und technologischen Bereich aufgeführt. Hydrogele sind attraktive Kandidaten für den Einsatz als Träger in Wirkstoffabgabesystemen mit definiertem Wirkstoffort und kontrollierter Freisetzungsgeschwindigkeit, damit eine genaue Wirkstoffzuordnung und weniger Nebenwirkungen realisiert werden können [2]. Dabei sind vor allem ihre antibakterielle, antikoagulierende und entzündungshemmende Wirkung gute Gründe, um Hydrogele und Arzneistoffe miteinander zu kombinieren [93]. Dadurch, dass die Hydrogele in der Lage sind, auf Umweltreize zu reagieren, kommen nicht nur arzneimittelbeladene, transdermale Hydrogelpflaster zum Einsatz, sondern auch sogenannte Mikrogele, welche oral oder pulmonal verabreicht werden können und dann an einem anderen Ort im Körper den Wirkstoff freisetzen. Der pH-Wert und die Temperatur gehören dabei zu den wichtigsten Kontrollfaktoren, sodass konformations- und löslichkeitsabhängiges Quellen und Schrumpfen stattfinden können. Für die Wirkstofffreisetzung gibt es drei verschiedene Wege: diffusions-, quellungs- und chemisch kontrolliert [94, 95]. Dabei kommt der diffusionskontrollierte Weg am häufigsten vor, das heißt, die Diffusion kontrolliert die Geschwindigkeit der Freisetzung. Bei der quellungskontrollierten Reaktion ist die Diffusion des

Wirkstoffes schneller als die Quellungsrate. Der chemisch kontrollierte Mechanismus hingegen setzt den Wirkstoff aufgrund einer chemischen Reaktion frei, beispielsweise durch eine Reaktion mit der Polymerkette oder durch eine hydrolytische/enzymatische Spaltung [71].

Mit dieser Anwendung verbunden sind auch die injizierbaren Hydrogele, durch welche minimal invasive Eingriffe für Gewebetechniken oder die Wirkstoffabgabe ermöglicht werden. Außerhalb des Körpers befinden sich die Gele in der Form einer kolloidalen Lösung (Solphase), bei Injektion an der Zielstelle erfolgt die Umwandlung in die festere Gelphase. Dieser Phasenübergang wird ebenfalls wieder durch einen externen Stimulus (Temperatur, pH-Wert, Licht etc.) initiiert [71]. Injizierbare Hydrogele sind besonders attraktive Biomaterialien zur Verwendung in Weichgeweben wie Gehirn und Rückenmark, da sie viskoelastische und rheologische Eigenschaften aufweisen, welche die mechanischen Eigenschaften von Weichgeweben nachahmen können [96]. Weiterhin spielen sie in der Krebstherapie eine wichtige Rolle, da sie Chemotherapeutika ortsspezifisch in das Krebsgewebe einbringen und gesundes Gewebe nicht angegriffen wird [96].

Ein weiteres Anwendungsbeispiel ist die Verwendung von leitfähigen Hydrogelen als Elektrodenmaterialien. Die Leitfähigkeit kann dabei auf verschiedene Weise in das Hydrogel eingebracht werden, beispielsweise in-situ über die Polymerisation mit leitfähigen Monomeren (z. B. Poly-(3,4-Ethylendioxythiophen) (PEDOT), Polyanilin (PANI) oder Thiophen), über eine Kompositherstellung, indem z. B. Kohlenstoff beigemischt wird, oder durch bewegliche Ionen, die durch Auflösen von Salz in der Wasserkomponente der Hydrogele aufgenommen werden [97]. Heo et al. [18] entwickelten beispielsweise eine mit einem PEG-Hydrogel beschichtete Manschettenelektrode, um den elektrischen Kontakt zwischen Elektrode und peripherem Nervengewebe zu verbessern. Die Hydrogelschicht dient dazu, die Unterschiede in den mechanischen Eigenschaften zwischen biologischem Gewebe und starrer Elektrode auszugleichen und dadurch die Kommunikation zwischen den beiden Systemen zu vermitteln.

Die Entwicklung von Anti-Foulingstrategien, die sich gegen das Bewachsen von Organismen an technischen Oberflächen richten, z. B. an Schiffsrümpfen oder wasserbaulichen Anlagen, ist ein Anwendungsbeispiel aus dem nicht (bio-)medizinischen Bereich. Das Anhaften an Schiffen hat zahlreiche Auswirkungen, so kommt es beispielsweise zu einer geringeren Lebensdauer, da die anhaftenden Organismen Korrosionsprozesse fördern. Außerdem kommt es durch den Bewuchs zu Verwirbelungen an der Schiffsoberfläche, die zu einem erhöhten Energieverbrauch führen [2]. Dadurch ist die Erforschung von umweltfreundlichen, langlebigen Anti-Fouling-

Beschichtungen von großer Bedeutung. Beispiele für solche funktionellen Beschichtungen umfassen natürliche Antifouling-Verbindungen, Silikon- und Fluorkohlenstoff-Polymere mit niedriger Oberflächenenergie und Hydrogele [2, 98]. So weisen beispielsweise Polyethylenglycol und zwitterionische Hydrogele aufgrund ihrer hoch hydratisierten Oberfläche Inhibierungseffekte gegen das Anhaften von Organismen auf [99].

3.2 Grenzflächenwechselwirkungen

Als Grenzfläche oder Phasengrenze wird der Berührungspunkt zwischen zwei Phasen bezeichnet. Weiterhin ist der Begriff der Grenzfläche ein Oberbegriff, der die Oberflächen von Flüssigkeiten und Festkörpern einschließt. In dieser Arbeit werden die Wechselwirkungen der plasma-polymerisierten Hydrogeloberfläche mit den umgebenden Medien (Luft, Wasser und Pufferlösungen) mittels verschiedener Analysemethoden betrachtet. Die Oberflächen eines festen/flüssigen Materials unterscheiden sich per Definition physikalisch und chemisch von ihrem Bulkmaterial. Ein Molekül oder Atom im Bulk ist von gleichartigen Teilchen umgeben, an der Grenzfläche ist dies jedoch nicht der Fall. Die Wechselwirkung mit den „andersartigen“ Teilchen ist die Ursache von zahlreichen Grenzflächenphänomenen wie z. B. der Oberflächenenergie/-spannung, dem Krümmungsdruck, der Ausbildung von elektrochemischen Doppelschichten sowie der Oberflächenladung oder der Benetzbarkeit [100]. Nachfolgend wird auf die für diese Arbeit wichtigsten Grenzflächenwechselwirkungen genauer eingegangen.

3.2.1 Oberflächenenergie und Benetzbarkeit

Die freie Oberflächenenergie (SFE, *surface free energy*) bestimmt die Benetzbarkeit von Festkörpern durch Flüssigkeiten und ist definiert als Arbeit, die aufgewendet werden muss, um die Oberfläche einer festen Phase zu vergrößern [101]. Die freie Oberflächenenergie der Hydrogelschichten hat einen direkten Einfluss auf die Stabilität, Benetzbarkeit und Adhäsionseigenschaften. Dadurch könne Aussagen über das Verhalten der Hydrogele in biologischen Systemen getroffen werden, zum Beispiel über die Integrität in lebenden Geweben. So neigen Hydrogele mit niedriger Oberflächenenergie dazu, eine geringe Benetzbarkeit und daher schlechte Adhäsionseigenschaften mit anderen Oberflächen zu besitzen [7]. Die freie Oberflächenenergie in Hydrogelen tritt dabei durch die Wechselwirkung der hydrophilen Polymerketten und den Molekülen mit der umgebenden Flüssigkeit auf. Je höher die Oberflächenenergie, desto wahrscheinlicher können z. B. Wassermoleküle angezogen werden. In Bezug auf Biosensoren kann

durch die Oberflächenenergie der Hydrogele die Fähigkeit der Biomoleküladsorption bestimmt werden.

Thomas Young definiert die Festkörperbenetzung wie folgt:

$$\sigma_s = \sigma_{ls} + \sigma_l \cdot \cos\theta \quad (3.1)$$

Die Oberflächenenergie des Festkörpers σ_s resultiert aus der Beziehung zwischen Oberflächenspannung der Flüssigkeit σ_l und der Grenzflächenspannung zwischen Festkörper und Flüssigkeit σ_{ls} sowie dessen Kontaktwinkel θ [101], schematisch dargestellt in Abbildung 3.

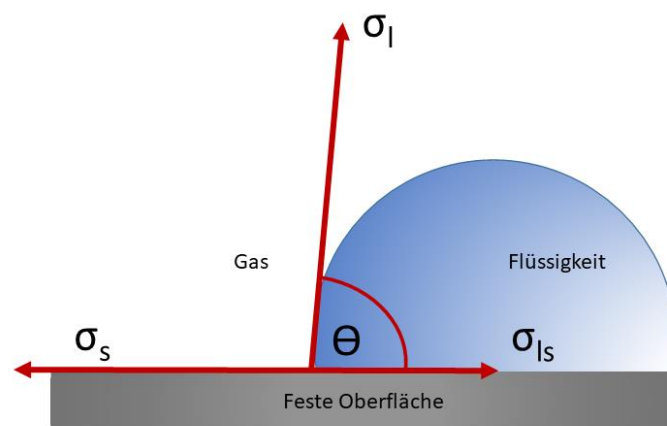


Abbildung 3: Festkörperbenetzung nach Young (Abbildung aus [101, 102]).

Vereinfacht lässt sich die SFE aus den Kontaktwinkeln und der Grenzflächenspannungen berechnen. Dabei treten Grenzflächenwechselwirkungen auf, die in polare und dispersive Anteile aufgeteilt werden. Polare Wechselwirkungen werden durch permanente positive und negative Partiaalladungen in Molekülen verursacht, wodurch es zu elektrostatischen Anziehungen kommt. Glas bildet beispielsweise starke polare Wechselwirkungen aus [101]. Die dispersiven Anteile sind schwächer und werden durch temporäre Ladungsdifferenzen an verschiedenen Orten im Molekül verursacht. Beispiele für die Ausbildung von dispersiven Wechselwirkungen sind Polypropylen und Polyethylen, welche durch eine schlechte Benetzbarkeit gekennzeichnet sind [101]. Für die Bestimmung der SFE sind mindestens zwei Flüssigkeiten mit bekannter Oberflächenspannung und bekannten polaren und dispersiven Wechselwirkungsanteilen nötig [101]. Das am häufigsten verwendete Berechnungsmodell dafür wurde von Owens, Wendt, Rabel und Kaelble definiert (OWRK) [103, 104].

Um einen Zustand möglichst geringer freier Energie anzunehmen, bilden Festkörper mit Flüssigkeiten eine Grenzfläche aus; sie werden also benetzt. Die Benetzbarkeit ist demnach die Fähigkeit von Flüssigkeiten, den Kontakt an der Berührungsfläche mit einer festen Oberfläche aufgrund intermolekularer Wechselwirkungen aufrechtzuerhalten.

Im Zusammenhang mit Hydrogelen bezieht sie sich auf die Fähigkeit von Wasser oder anderen Flüssigkeiten, die in die Oberfläche des Hydrogels eindringen können oder diese benetzen. Hydrogele können je nach chemischer Zusammensetzung, Vernetzungsdichte und Oberflächenmodifikation unterschiedliche Benetzbarkeitsgrade aufweisen. Daher spielt die Benetzbarkeit eine entscheidende Rolle bei der Bestimmung der Eignung von Hydrogelen für bestimmte Anwendungen. Hydrogele müssen bei der Medikamentenverabreichung in der Lage sein, mit Körperflüssigkeiten so zu interagieren, dass eine effiziente Medikamentenfreisetzung auf der Zielseite ermöglicht wird [105]. Ebenso müssen Hydrogele mit Zellen und biologischen Flüssigkeiten interagieren, um dadurch die Regeneration beschädigter Gewebe zu unterstützen [106]. In einem hydrogelbasierten Biosensor hat die Benetzbarkeit einen Einfluss auf die Interaktion zwischen Analyten und Sensorelementen. Hydrogele haben einen hydrophilen Charakter, welcher durch ihre chemische Zusammensetzung bestimmt wird. Ist das Hydrogel beispielsweise mit nur wenigen polaren Gruppen ausgestattet, kann es zu wasserabweisenden Effekten kommen, sodass Analyt und sensorisches Element nicht miteinander in Wechselwirkung treten können. Andererseits kann, wenn das Hydrogel zu hydrophil ist, unter Umständen zu viel Wasser aufgenommen werden, was die Antwort der sensorischen Elemente dämpfen könnte. Die chemische Zusammensetzung und Oberflächenstruktur der Hydrogele spielen demzufolge eine große Rolle in der Biosensorik.

Weiterhin ist die Benetzbarkeit direkt abhängig von der Oberflächenenergie. Beschrieben wurde diese Grenzflächenwechselwirkung, wie bereits erwähnt, durch Thomas Young [102]. Durch die Art der Flüssigkeit und des Materials der Oberfläche wird der Grad der Benetzung bestimmt, als Maß dient der Kontaktwinkel. Die Größe des Kontaktwinkels hängt von der Wechselwirkung (z. B. Wasserstoffbrückenbindung oder Dipol-Dipol-Wechselwirkungen) zwischen den Stoffen an der Berührungsfläche ab. Je geringer die Wechselwirkung, desto größer ist auch der Winkel (siehe Abbildung 4) [97]. Bei Kontaktwinkeln über 90° zieht sich die Flüssigkeit zu einem kugelförmigen Tropfen zusammen und man spricht von einer hydrophoben Oberfläche. Bei Winkeln unter 90° breitet sich die Flüssigkeit linsenförmig aus, die Oberfläche ist hydrophil. Läuft die Flüssigkeit auf der Oberfläche auseinander, kann kein Kontaktwinkel gemessen werden und eine vollständige Benetzung ist erreicht.

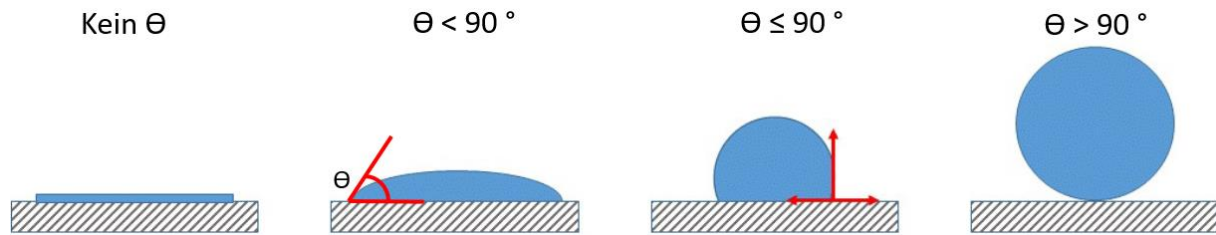


Abbildung 4: Schema der Benetzbarkeit von Flüssigkeiten auf einer Oberfläche. Ist der Kontaktwinkel (Θ) eines Tropfens größer als 90° , ist die Oberfläche hydrophob; unter 90° bedeutet, die Oberfläche ist hydrophil. Bei vollständiger Benetzung ist kein Kontaktwinkel messbar (Abbildung aus [101, 102]).

3.2.2 Elektrokinetisches Potential (Zetapotential)

Das Zetapotential, auch elektrokinetisches Potential genannt, beschreibt das Ladungsverhalten an Grenzflächen und ist eine wichtige Kenngröße für das Verständnis des Verhaltens von Materialien in flüssigen Systemen. Im Kontakt mit einer wässrigen Lösung nimmt die Oberfläche eines Körpers eine Oberflächenladung an. Durch funktionelle Gruppen auf der Oberfläche oder durch Adsorptionseffekte erfolgen Reaktionen mit dem umgebenden Medium, wodurch eine Ladungsänderung erzeugt wird, welche unterschiedlich zu der in der flüssigen Phase ist [107]. Die Definition des Zetapotentials wird durch das Modell der elektrochemischen Doppelschicht (EDL) erklärt (siehe Abbildung 5). Die EDL ist eine an Phasengrenzen auftretende doppelte Schicht von Ladungsträgern (Elektronen, Ionen). Sie besteht aus einer stationären, immobilen Schicht an der Festkörperoberfläche und einer diffusen, mobilen Schicht mit Gegenionen, welche die Oberflächenladung Ψ_0 kompensieren. Durch den Übergang der Ladungsträger zwischen den Phasen tritt eine Potentialdifferenz auf [107]. Dieser Übergang wird Scherebene oder Scherschicht genannt. Das elektrische Potential an dieser Stelle ist das Zetapotential ζ , also die Summe aus anfänglicher Oberflächenladung und der akkumulierten Schicht.

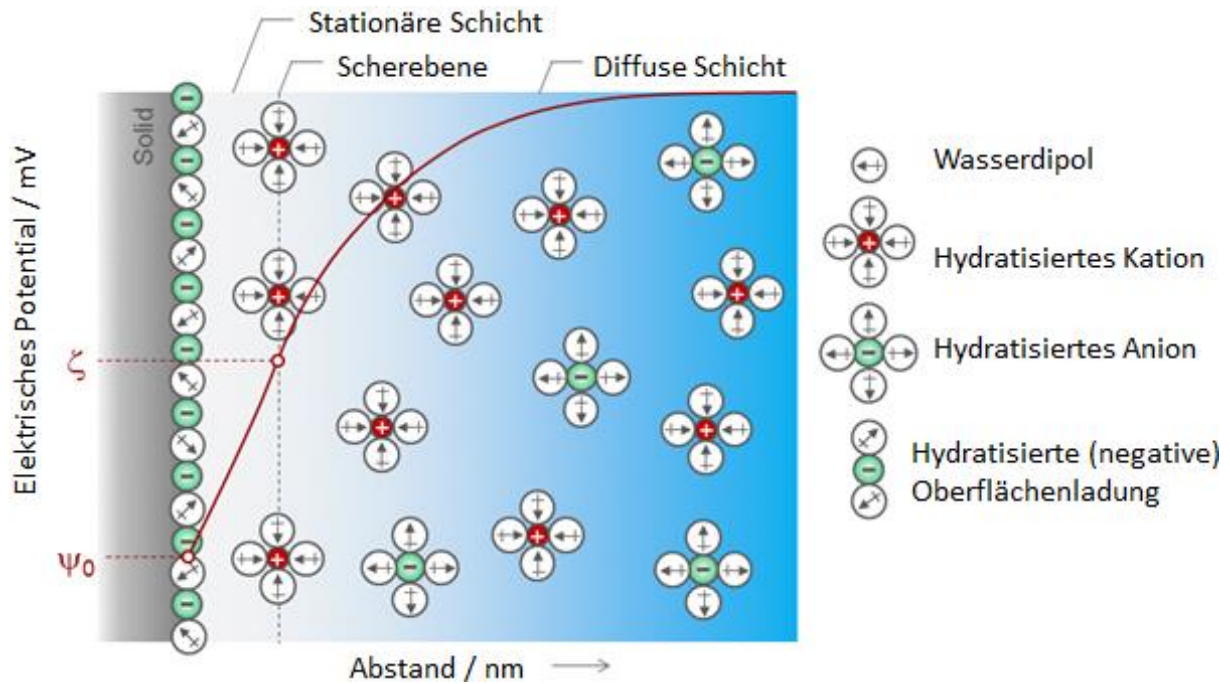


Abbildung 5: Schematische Darstellung einer elektrochemischen Doppelschicht an einer fest-flüssig Grenzfläche mit ψ_0 als Oberflächenpotential und ζ als Zetapotential (Abbildung aus [107]).

Die funktionellen Gruppen auf einer Festkörperoberfläche bestimmen maßgeblich das Zetapotential. So liegen saure Gruppen wie Carboxyl-, Sulfonyl- oder Hydroxylgruppen im Wasser dissoziiert mit negativer Ladung vor. Basische Gruppen wie beispielsweise Amine werden dagegen protoniert und liegen positiv geladen vor. Der pH-Wert steuert die Säure-Base-Reaktionen. Je höher der pH-Wert, desto stärker werden Säuregruppen dissoziiert und die Protonierung der Basengruppen abgeschwächt. Bei niedrigem pH-Wert sind die Reaktionen umgekehrt. Des Weiteren kann eine hohe Oberflächengruppendichte die vollständige Dissoziation saurer Gruppen oder die Protonierung basischer Gruppen und ihrer Nachbarn hemmen [107, 108]. Der pH-Wert ist der wichtigste und am ausführlichsten untersuchte Parameter, welcher Einfluss auf das Zetapotential hat. Mit der pH-Titration, also dem pH-Scan von sauer zu basisch oder umgekehrt, lässt sich der isoelektrische Punkt (IEP) ermitteln. Der IEP ist der Punkt, an dem sich das Vorzeichen des Zetapotentials umkehrt [107]. Die Oberflächenladung verschwindet in dem Sinne nicht, sondern die elektrokinetische Ladungsdichte nimmt einen Wert von 0 C/m^2 an. Es stellt sich ein Gleichgewicht der positiven und negativen Oberflächenladungen ein und die durchschnittliche Nettoladung beträgt 0 mV . Der IEP von festen Materialoberflächen wird hauptsächlich untersucht, um Aussagen über die heterogene Zusammensetzung von funktionellen Gruppen auf der Oberfläche zu treffen und um damit den hydrophilen oder hydrophoben

Charakter herauszustellen. Des Weiteren können durch diesen Indikator Proteine und Peptide auf einer Oberfläche charakterisiert werden.

Die Messung des Zetapotentials beruht auf einem elektrokinetischen Effekt, der auftritt, wenn eine feste Phase und eine flüssige Phase relativ zueinander bewegt werden [107]. Durch eine Kapillare mit zwei festen Oberflächen (entweder zwei gleiche Probenoberflächen oder eine Probenoberfläche mit einer Referenzoberfläche) strömt eine wässrige Lösung. Dadurch wird auf der Probenoberfläche eine Ladung generiert, die durch Gegenionen in der Lösung kompensiert wird. Auf die Gegenionen wirken Scherkräfte, welche diese in Richtung des Flüssigkeitsstroms bewegen, wodurch eine Ladungstrennung entsteht. Infolgedessen wird eine elektrische Kraft erzeugt, die dem Flüssigkeitsstrom entgegenwirkt [107]. Dieser elektrokinetische Effekt kann unter anderem als Strömungspotential detektiert werden. Die Grundgleichungen, die das Strömungspotential mit dem Zetapotential in Beziehung setzen, wurden von Hermann von Helmholtz und Marjan von Smoluchowski hergeleitet [107, 109]. Für flache Proben, bei denen die Geometrie des Strömungskanal (Länge und Fläche der Zelle) genau bekannt ist, gilt:

$$\zeta = \frac{dl_{str}}{d\Delta p} \cdot \frac{\eta}{\varepsilon \cdot \varepsilon_0} \cdot \frac{L}{A} \quad (3.2)$$

Das Zetapotential ζ wird demnach beschrieben durch den Strömungsstromkoeffizienten $dl_{str}/d\Delta p$ in Bezug auf die Zellkonstante L/A (L = Länge des Spalts in der Messzelle und A = Querschnitt, Breite und Spalthöhe) und $\eta/\varepsilon \cdot \varepsilon_0$, der Viskosität durch die Dielektrizitätskonstanten der Elektrolytlösungen.

3.2.3 Cyclovoltammetrie

Die Cyclovoltammetrie ist ein analytisches Verfahren zur Untersuchung von Elektrodenprozesse. Der Messaufbau besteht aus einer Dreielektrodenanordnung (Arbeits-, Gegen- und Referenzelektrode), welche über einen Potentiostat miteinander verbunden sind und in eine (ionenleitende) Messlösung getaucht werden. An der Arbeitselektrode wird eine Dreiecksspannung angelegt, bestehend aus einem ansteigenden oder abfallenden und anschließend einem rückläufigen Potential [110]. In Abhängigkeit der vorgegebenen Spannung wird der zwischen Arbeits- und Gegenelektrode fließende Strom erfasst. Laufen an der Arbeitselektrode elektrochemische Reaktionen in einem ausgewählten Potentialbereich ab, werden Extremwerte in der Strom-Spannungscharakteristik beobachtet [110].

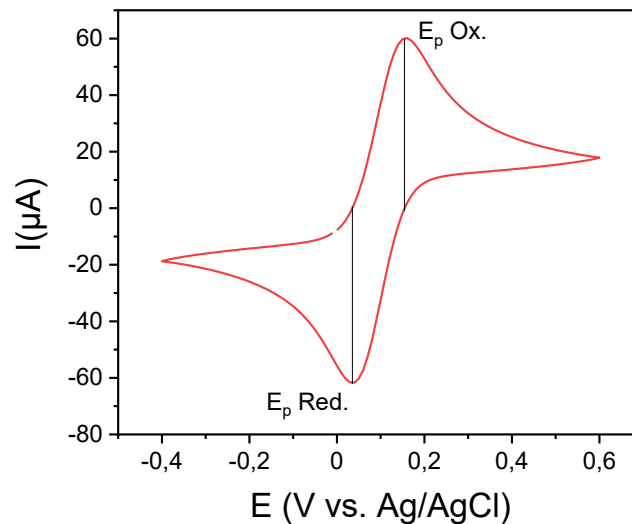
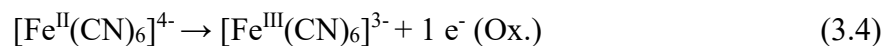
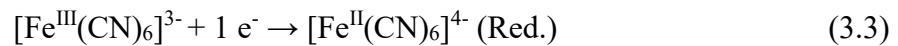


Abbildung 6: Beispiel eines Cyclovoltammogramms; gemessen in $K_3[Fe(CN)_6]:K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1)-Lösung als Redoxsonde (5 mmol/l in NIST Pufferlösung pH 7.01, Hanna Instruments GmbH).

Diese Stromspitzen sind die Peakpotentiale E_p der Oxidations- und Reduktionsreaktion, an welchen der Maximalwert des anodischen und des kathodischen Stromes gemessen werden kann (siehe Abbildung 6). Bei dem Beispiel aus Abbildung 6 handelt es sich um nachfolgende Teilreaktionen, die erfasst worden sind:



In dieser Arbeit werden die strukturellen Änderungen der plasma-polymerisierten, acrylamid-basierten Hydrogelschichten an der Elektrodenoberfläche durch den Elektronentransfer aus der Redoxreaktion von Kaliumhexacyanoferrat (II/III) untersucht. Die Veränderungen der Peakströme auf eine äußere Einflussgröße wie den pH-Wert stehen im direkten Zusammenhang mit dem Zugang der Redoxspezies zur Elektrodenoberfläche [111]. Dabei können bestimmte Polymerbeschichtungen einen gequollenen oder kollabierten/ geschrumpften Zustand einnehmen [111, 112]. Des Weiteren werden in dieser Arbeit biokatalytische Reaktionen mit dieser Methode untersucht. So können Aussagen getroffen werden, ob beispielsweise durch die strukturelle Veränderung der Hydrogelschicht der Substratzugang für ein immobilisiertes Enzym erschwert oder erleichtert wird.

3.3 Enzymimmobilisierung

Seit vielen Jahren ist es das Ziel der Forschung, Trägermaterialien so zu modifizieren, dass die Fixierung von Enzymen vereinfacht bzw. optimiert wird, um aufwendige und teure Isolierungs- und Aufarbeitungsschritte einzusparen. Eine Immobilisierung bietet große Vorteile: Die Enzyme sind wiederverwendbar und zeigen eine verbesserte Stabilität in einem breiteren Temperatur- und pH-Bereich. Außerdem bleiben die Endprodukte von kontinuierlichen Prozessen frei vom eingesetzten Biokatalysator [113]. Es gibt verschiedene Immobilisierungsmöglichkeiten (siehe Abbildung 7). Die einfachste und schonendste Form ist die physische Adsorption bzw. das Aufwachsen auf dem Träger. Dies führt zu einer hohen Effizienz der Katalyse. Nachteilig ist jedoch die meist schwache Bindung. Durch eine kovalente Anbindung kann eine stabile Anknüpfung erreicht werden, jedoch kann der Biokatalysator an Aktivität verlieren. Eine Vielzahl an funktionellen Gruppen kann für die kovalente Bindung genutzt werden, dazu zählen Amino-, Carboxyl-, Hydroxyl- oder phenolische Gruppen. Eine weitere Technik ist der Einschluss in polymeren Matrizen oder Membranen, wodurch die Enzyme in einer Art Schutzumgebung eingebettet werden. Durch die Verwendung von porösen oder quervernetzten Materialien wird die Bindungsfläche zusätzlich vergrößert [113]. Hydrogele mit ihren dreidimensionalen Strukturen bieten ideale Bedingungen für biomolekulare Wechselwirkungen. Gleich mehrere Eigenschaften sprechen für ihre Verwendung [114]: die Vergrößerung der Oberflächenmatrix, der hohe Wassergehalt sowie die minimale Eigenfluoreszenz.

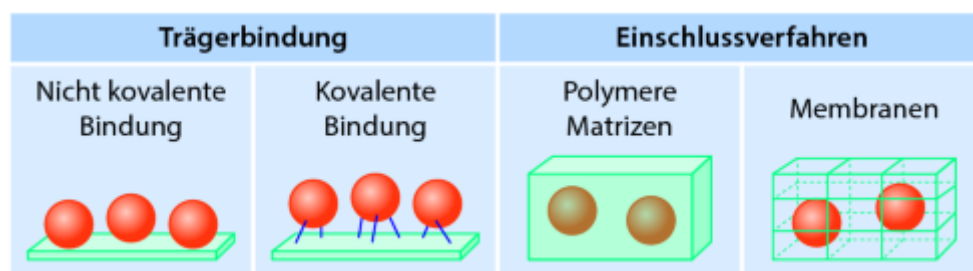


Abbildung 7: Schematische Übersicht einiger ausgewählter Immobilisierungstechniken (Abbildung aus [115]).

3.4 Biosensor

Hydrogele sind geeignete Kandidaten für Funktionsschichten in Biosensoren. Sie können sowohl als Immobilisierungsplattform verwendet werden, als auch als Barrierschicht dienen, um Diffusionsprozesse zu kontrollieren. In dieser Arbeit wurden die plasma-polymerisierten Hydrogele auf ihre Anwendbarkeit in der elektrochemischen Biosensorik geprüft. Dafür wurden zwei verschiedene Enzyme – Glucoseoxidase (GOx) und Acetylcholinesterase (AChE) – auf

den Hydrogelschichten, welche auf kommerziellen Goldelektroden aufgebracht wurden, immobilisiert. Anschließend erfolgte der Nachweis von Glucose bzw. des parasymphomimetischen Alkaloids Eserin. Die Definition für einen Biosensor durch die IUPAC lautet:

„Ein Biosensor ist eine in sich geschlossene, reversible Einheit, der ein biologisches Erkennungselement verwendet, welches in direktem räumlichen Kontakt mit einem Transduktionselement steht.“ [116]

In dieser Definition sind zwei wichtige Sensorbestandteile genannt (siehe Abbildung 8): das biologische Erkennungselement (z. B. Enzyme, DNA, Antikörper), immobilisiert auf einer biokompatiblen Schicht (z. B. Hydrogele), und die Transduktionseinheit, deren Funktion hauptsächlich über elektrochemische, optische, thermometrische oder mechanische Prinzipien realisiert wird [114].

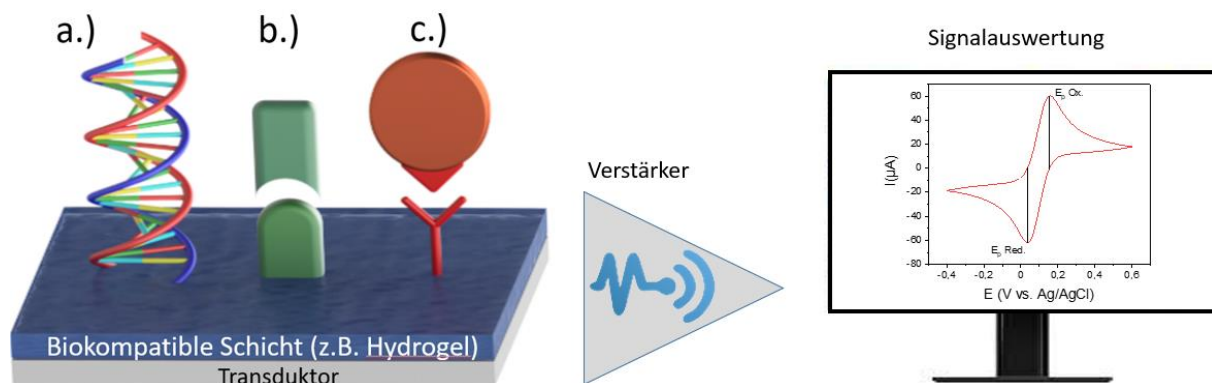


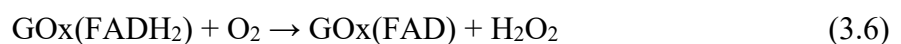
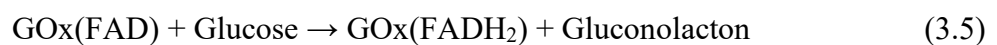
Abbildung 8: Schematische Darstellung eines Biosensors mit drei verschiedenen Biorezeptorkategorien: a.) Nukleinsäuren und DNA, b.) Antigen/Antikörper, c.) Enzyme auf einer biokompatiblen Schicht (z. B. Hydrogel) (Abbildung aus [117]).

Biosensoren auf Hydrogelbasis können biologische Ereignisse auf zwei Arten detektieren. Zum einen ohne Biorezeptoren, das heißt, deren Quelleigenschaften ändern sich als Reaktion auf einen ausgewählten Umgebungsreiz [118]. Beispielsweise können pH-sensitive Hydrogele, wie im theoretischen Teil beschrieben, ionisiert werden. Das heißt, die funktionellen Gruppen innerhalb der Polymerketten werden protoniert oder deprotoniert, was zu einer Konformationsänderung des Hydrogelnetzwerkes führt und damit zu einer Quellung oder Entquellung (Schrumpfen des Gels) [117, 119]. Des Weiteren können biochemische und biologische Wechselwirkungen detektiert werden, indem auf dem Hydrogel Biorezeptoren immobilisiert werden. Dabei sind für das Design von Biosensoren vor allem stabile Oberflächenbindungsstrategien nötig sowie die Verhinderung einer unspezifischen Proteinadsorption an die Hydrogeloberfläche [117].

Am weitesten verbreitet sind enzymbasierte Biosensoren. Enzyme sind hauptsächlich Proteine, welche eine biochemische Reaktion als Katalysator beschleunigen. Die katalytische Reaktion wird durch die Bindung eines Substrats¹ an das aktive Zentrum des Enzyms ausgelöst. Auf diese Weise können verschiedene Veränderungen detektiert werden, wie beispielsweise die Bildung eines Enzym-Substrat-Komplexes, die Erfassung von Produkten aus der Enzymreaktion oder die auftretende Stoffmenge bei der Enzymhemmung. Die Substratbindung senkt dabei die Aktivierungsenergie der chemischen Umwandlung, indem die Reaktanten in einer energetisch günstigen Orientierung zusammengebracht werden [114]. Somit ermöglicht die Kombination aus extremer Selektivität und hoher Effektivität bei der biochemischen Umwandlung die Entwicklung hochpräziser Sensoren [114].

Seit dem Jahr 1962, in dem der erste Biosensor von Clark [120] vorgestellt wurde, stieg die Forschung im Bereich der Biosensoren rasant an. Gerade auf dem Gebiet miniaturisierter, smarter Systeme, auch Biomikrosysteme genannt, für analytische und therapeutische Behandlungen ist ein steigender Bedarf zu verzeichnen. Ein prominentes Beispiel hierfür sind Glucosesensoren. Viele Menschen müssen durch eine Erkrankung an Diabetes mellitus (Zuckerkrankheit) regelmäßig ihren Blutzuckerspiegel messen. Durch implantierbare Glucosesensoren ist ein kontinuierliches Monitoring möglich, wodurch der Alltag enorm erleichtert wird. Über dem Sensor wird ein Transmitter auf die Haut geklebt, der die Daten an eine App übermittelt und dort auswertet.

Die Glucoseoxidase (GOx) gehört zu den Redoxenzymen und katalysiert die Oxidation von Glucose zu Gluconolacton und weiter zu Wasserstoffperoxid. Dabei ist die prosthetische Gruppe der Glucoseoxidase das Flavin-Adenosin-Dinukleotid (FAD), welches die Elektronen der Glucose aufnimmt.



Das reduzierte Flavin wird daraufhin mithilfe von Sauerstoff reoxidiert. Das entstandene Wasserstoffperoxid kann dann elektrochemisch gemessen werden. Fast alle kommerziell erhältlichen Biosensoren sind amperometrische Biosensoren [121]. Durch Anlegen eines spezifischen

¹ In der Biochemie werden die Ausgangsstoffe einer Reaktion als Substrate bezeichnet, in der Plasmaphysik jedoch die zu beschichtenden Trägermaterialien.

4 Apparativer Aufbau und Messmethoden

Nachfolgend werden die in dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden sowie die Plasmaquelle mit dem Versuchsaufbau beschrieben. Teile der Methodenbeschreibung stammen aus den bereits veröffentlichten Publikationen.

4.1 Hydrogelsynthese mittels Plasmapolymerisation

Vorarbeiten von Buxadera-Palomero et al. [38] konnten zeigen, dass ein Atmosphärendruck-Plasmajet in der Lage ist, HEMA in kurzer Zeit zu polymerisieren, weshalb mit diesem Jet weitergearbeitet und die Prozessparameter optimiert wurden. Für den Depositionsprozess wurden die zu beschichtenden Substrate unter den mit 27,12-MHz gesteuerten Atmosphärendruck-Plasmajet (siehe Abbildung 9; ausführlich beschrieben von Schaefer et al. [126]) positioniert. Dabei wurde der Arbeitsabstand auf 5 mm zwischen Substrat und dem untersten Ende der Jetkapillare eingestellt. Als Substrate wurden Silizium (Si)-Wafer (MikroChemicals GmbH, Ulm) mit einer durchschnittlichen Größe von $1 \times 1 \text{ cm}^2$ verwendet sowie die kommerziell erhältlichen Elektroden SPE (*screen printed electrodes*) DropSens C220AT und 250AT (Metrohm, Schweiz). Die Hydrogelbeschichtungen wurden aus den Monomeren HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) und DEAEMA (Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester) (beide Chemikalien von Sigma Aldrich) hergestellt. Für das Ermitteln der physikochemischen Eigenschaften und des Ansprechverhaltens wurden HEMA:DEAEMA (HD) mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (Vol./Vol.) von 1:4 (HD14), 1:1 (HD11) und 4:1 (HD41) verwendet. Der Herstellungsprozess umfasst dabei drei aufeinanderfolgende Schritte [127]:

1. Vorbehandlung der Substratoberfläche unter Verwendung von Ar-Plasma für 30 s
2. Aufbringen der flüssigen Monomermischung auf die aktivierte Substratoberfläche
3. Anschließende Plasmapolymerisation durch Behandlung mittels Ar-Plasma für 30 s

Konstante Parameter waren dabei die Plasmaeingangsleistung mit 5 W und die Argonflussrate mit 1 slm. Plasma-polymerisierte Hydrogelbeschichtungen unterschiedlicher Dicke wurden unter Verwendung von zwei in Abbildung 10 schematisch gezeigten Aufbauten erzeugt. Das Tropfenverfahren wurde zur Abscheidung von Beschichtungen mit Dicken $> 0,5 \mu\text{m}$ verwendet, indem $0,1 \mu\text{l}$ der HD-Mischung auf die plasmaaktivierte Substratoberfläche pipettiert wurden. Hingegen führte das Verneblerverfahren (1 slm Ar-Flussrate und 1 s Zerstäubungszeit) zum Abscheiden von Schichten mit Dicken $< 0,5 \mu\text{m}$. Gemäß der angewandten Methodik werden

die erhaltenen Filme als d-HD oder n-HD bezeichnet, wenn die Tropfen- ($d = \text{droplet}$) oder Vernebler- ($n = \text{nebulizer}$)-Konfiguration verwendet wurden.

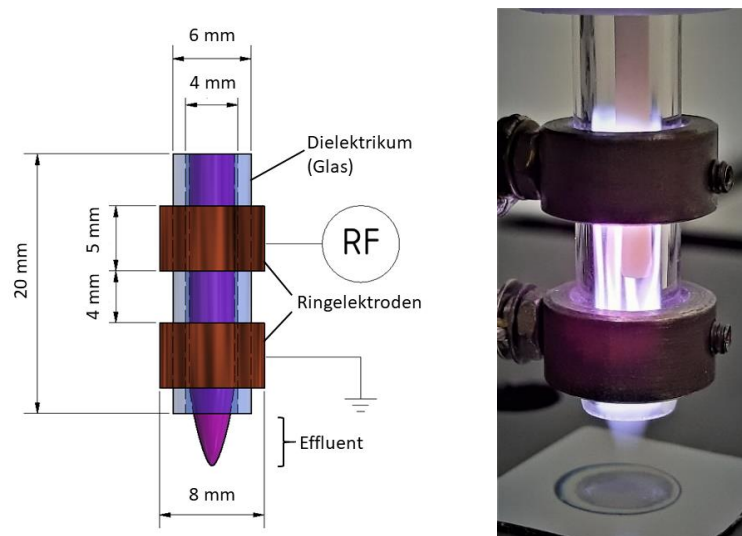


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Atmosphärendruck-Plasmajets (links), beschrieben in [126] und fotografische Aufnahme des Jets mit Hydrogelmischung auf einem Siliziumwafer (rechts).

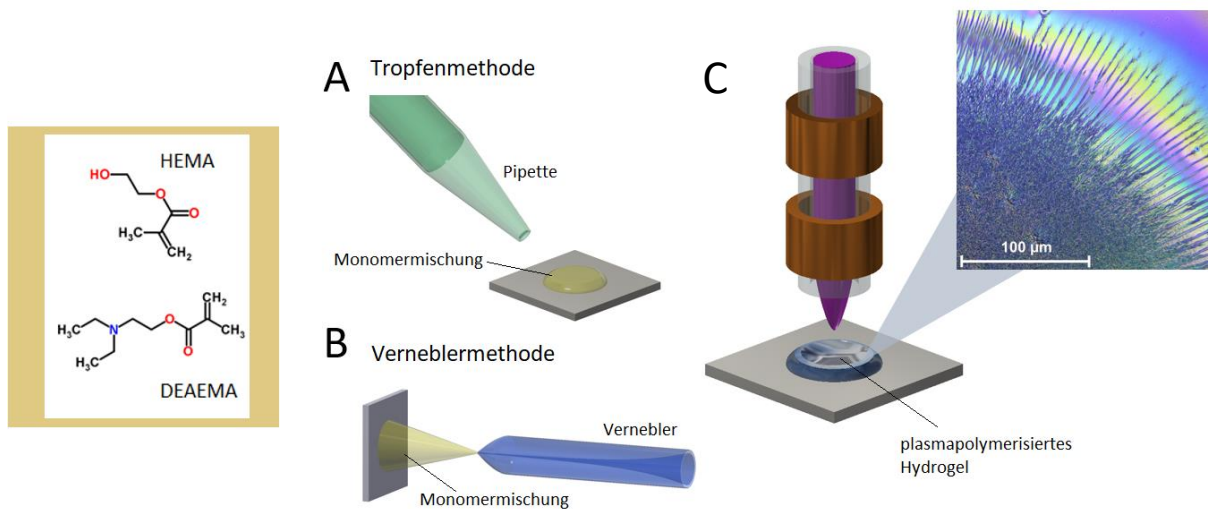


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der zwei Methoden zur Herstellung unterschiedlicher Hydrogelschichtdicken. A: Tropfenmethode mit einem Tropfenvolumen von $0,1 \mu\text{l}$ Monomermischung HEMA:DEAEMA auf das durch Plasma vorbehandelte Substrat, B: Verneblermethode mit einer Sprühzone von $1 \times 1 \text{ cm}$ Monomermischung HEMA:DEAEMA auf das durch Plasma vorbehandelte Substrat. C: anschließende Polymerisation zum Hydrogel mittels Atmosphärendruck-Plasmajet mit mikroskopischer Aufnahme des entstandenen Hydrogels (100x-Vergrößerung).

4.2 Oberflächenanalytik

4.2.1 Chemische Zusammensetzung

Die XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy oder Röntgenphotoelektronenspektroskopie) erlaubt Aussagen über die chemische Zusammensetzung und über Bindungszustände der abgetrennten Schichten [128]. Das Messprinzip beruht dabei auf dem äußeren Photoeffekt (Photoemission). Treffen Röntgenstrahlen einer definierten Wellenlänge auf eine Festkörperfläche, werden Elektronen aus den inneren, kernnahen Atomorbitalen herausgelöst. Dabei wird, vereinfacht gesagt, das Elektron zunächst durch die Photonen angeregt, weiter zur Oberfläche transportiert und schlussendlich als Photoelektron freigesetzt [128]. Die vom Elektronenspektrometer experimentell gemessene Größe ist die kinetische Energie (E_{kin}) der Elektronen, die von der Photonenenergie abhängt und somit keine intrinsische Materialeigenschaft ist [129] (siehe Gleichung 4.1). Die Bindungsenergie (E_B) ist elementspezifisch für das Orbital der inneren Schale, aus dem das Elektron stammt. Somit ist eine qualitative Aussage über auftretende Elemente möglich. Es ergibt sich folgende Beziehung zwischen den am XPS-Experiment beteiligten Parametern:

$$E_{kin} = h\nu - E_B - W \quad (4.1)$$

Die kinetische Energie E_{kin} wird bestimmt aus der Differenz der auslösenden Strahlung $h\nu$ mit der Bindungsenergie E_B der Elektronen und der Austrittsarbeit W des Spektrometers, also der Energie, die mindestens aufgewandt werden muss, um ein Elektron aus einem ungeladenen Festkörper zu lösen. Die Energie der emittierten Photoelektronen wird dann vom Elektronenspektrometer analysiert und die Daten als Intensitätsdiagramm dargestellt, normalerweise als Zählungen/Zählrate (*counts*) gegen die Bindungsenergie der Photoelektronen [129]. Die Zählrate ist proportional zur Häufigkeit des Auftretens der verschiedenen Elemente in der Probe, wodurch Informationen über jeweilige Elementverhältnisse in der Probe gewonnen werden können. Darüber hinaus hängen die Bindungsenergien der freigesetzten Elektronen von ihrer chemischen Umgebung ab. Dies lässt Aussagen über chemische Bindungen, Oxidationszustände oder Bindungspartner zu. Da es hauptsächlich zu Wechselwirkungen mit kernnahen Elektronen kommt und der Wirkungsquerschnitt der Valenzelektronen zu gering ist, können alle Elemente (außer Wasserstoff und Helium) mit einem Anteil von $> 0,05$ At. %, gemessen werden [130]. Die Informationstiefe der XPS-Messung wird durch die mittlere freie Weglänge der Elektronen im Festkörper bestimmt und liegt gewöhnlich im Bereich von 1–8 nm [131].

In dieser Arbeit wurde ein Axis Supra DLD-Elektronenspektrometer (Kratos Analytical) mit einer monochromatischen Al $K\alpha$ -Quelle (1486,6 eV) verwendet. Die Elementspektren wurden bei einer Leistung von 150 W mit einer Passenergie von 80 eV und einer Schrittweite von 0,1 eV gemessen. Das Spektrometer wurde auf den Linsenmodus mittlerer Vergrößerung (Sichtfeld 2) und den Schlitzmodus eingestellt, was einen Analysebereich von ungefähr 250 μm im Durchmesser bereitstellt. Die Datenerhebung und -verarbeitung erfolgte mit der Software CasaXPS, Version 2.14dev29 (Casa Software Ltd.). Konzentrationen sind in Atomprozent (At. %) angegeben.

Weiterhin wurde zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung die **Infrarotspektroskopie** angewandt. Moleküle werden mit Licht aus dem Infrarotbereich bestrahlt, die Absorption der Strahlung führt zu einer molekularen Schwingungsanregung des bestrahlten Festkörpers. Die Energien bzw. Frequenzen sind charakteristisch für die Bindungen und erlauben damit Aussagen zur Strukturaufklärung. Bei einem einfachen Infrarotspektrometer wird die spektrale Auflösung durch ein Gitter als dispersives Element erreicht. Bei der Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FT-IR) wird diese durch ein Interferometer generiert; der Detektor gibt die spektrale Information als sogenanntes Interferogramm aus. Durch eine Fourier-Transformation erfolgt die Umwandlung der vorliegenden Zeitdomäne in eine Frequenzdomäne und damit in ein Spektrum, in dem die Durchlässigkeit der Probe gegen die Wellenzahl aufgetragen wird. Weitere Informationen zur FT-IR-Spektroskopie finden sich in [132, 133]. Die Auswertung und Zuordnung der Peaks bezieht sich unter Zuhilfenahme der Tabellen in [134].

In dieser Arbeit wurde ein Spectrum One FT-IR-Spektrometer (PerkinElmer) verwendet, mit dem im abgeschwächten Totalreflexions-(ATR)-Modus gemessen wurde. Die Daten wurden mit einer Auflösung von 4 cm^{-1} und 20 Scans aufgenommen, wobei je drei Spektren jeder Probe nach der Hintergrundkorrektur gemessen wurden. Die Daten wurden anschließend mit der Software Spectrum 5.3.1 (PerkinElmer) ausgewertet.

4.2.2 Benetzbarkeit und Oberflächenenergie

Die Benetzbarkeit der Hydrogelschichten wurde untersucht, um Aussagen zum hydrophilen oder hydrophoben Charakter im Hinblick auf eine sensorische Funktionsschicht zu treffen. Der Wasserkontaktwinkel zur Bestimmung der Benetzbarkeit wurde unter Verwendung der statischen Methode mittels des DIGIDROP Contact Angle Meter (GBX Instrumentation Scientifique) bestimmt. Dafür wurde ein Wassertropfen mit definiertem Volumen von 0,5 μl am Ort der

lokal abgeschiedenen Plasmaschichten abgesetzt und mittels Tropfenkonturanalyse der Wasserkontaktwinkel berechnet (der Winkel zwischen Oberfläche des Festkörpers und der Tangente des Tropfens). Die Berechnungsgrundlage ist die Young'sche Gleichung (3.1), wie im theoretischen Teil Kapitel 3.2.1 beschrieben.

Um die freie Oberflächenenergie, *surface free energy* (SFE), der Beschichtungen zu bestimmen, wurden Kontaktwinkel von drei verschiedenen Flüssigkeiten (Millipore-Wasser, Ethylenglykol und Diiodmethan) mit bekannter Oberflächenspannung (siehe Tabelle 1) mit dem OCA 30-System und der SCA20-Software (DataPhysics Instruments GmbH) gemessen. Ein Tropfen (0,5 μl) jeder Flüssigkeit wurde unter Verwendung eines automatischen Mikrospritzensystems auf die plasma-polymerisierten Hydrogele aufgetragen. Nachdem die Tropfenkontur gezeichnet wurde, wurde die freie Oberflächenenergie unter Verwendung der Owen/Wendt-Rabel-Erbil (OWR)-Methode [104] berechnet. Die Messungen erfolgten auf zwei Wegen. Zum einen direkt nach der Abscheidung der Hydrogelschichten und zum anderen wurde ein weiteres Probenet 24 h in Millipore-Wasser bzw. in Pufferlösungen (NIST-Puffer: 4,01, 7,01 und 10,01 von Hanna Instruments GmbH) gelagert, danach 6 h an der Luft getrocknet und anschließend der Kontaktwinkel gemessen.

Tabelle 1: Oberflächenenergien der Testflüssigkeiten in mN/m [135].

	Oberflächenspannung (mN/m)	Dispersiver Teil (mN/m)	Polarer Teil (mN/m)
Wasser	72,8	21,8	51
Ethylenglycol	47,7	26,4	21,3
Diiodmethan	50,8	48,5	2,3

4.2.3 Topographie und Morphologie

Die Topographiemessungen beziehen sich auf die Untersuchung der Oberflächenmerkmale der Hydrogelschichten, wie z. B. Rauheit und Textur. Diese spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion zwischen dem Biosensor und der biologischen Umgebung. Die Vergrößerung der Oberfläche durch die Hydrogelschichten verändert die Bindungsaffinität und Spezifität des Biosensors. Weiterhin wird auch das Diffusionsvermögen des Analyten in und durch die Hydrogelmatrix beeinflusst. Speziell der Einfluss des umgebenden pH-Wertes kann die Topographie in Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung des Hydrogels verändern.

Um Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit und die Oberflächenrauheit der erhaltenen Hydrogelbeschichtungen treffen zu können, wurde die Rasterkraftmikroskopie (AFM) angewandt. Mittels einer an einem Cantilever befindlichen, nanoskopischen Spitze (aus Siliziumnitrid) wird die Probenoberfläche in einem definierten Raster gescannt. In Abhängigkeit der Oberfläche der Probe biegt sich der Cantilever aufgrund atomarer, oberflächennaher Kräfte, welche auf die Spitze wirken. Diese Kräfte können beispielsweise Van-der-Waals-Kräfte, Kapillarkräfte, elektrostatische Kräfte oder magnetische Kräfte sein [136]. Dabei kann die Messspitze unter anderem im Kontaktmodus (siehe Abbildung 11) verwendet werden, das heißt, die Spitze findet sich in direktem, mechanischem Kontakt mit der Probenoberfläche. Ein weiterer Modus, der auch in dieser Arbeit verwendet wurde, ist der tippende (intermittierende) Modus, ein dynamischer Kontakt-Modus, bei dem der Cantilever mit einer Frequenz nahe der Resonanzfrequenz des Federbalkens schwingt [136] (siehe Abbildung 11). Dieser Modus erlaubt das zerstörungsarme „Abtasten“ der weichen Hydrogeloberfläche.

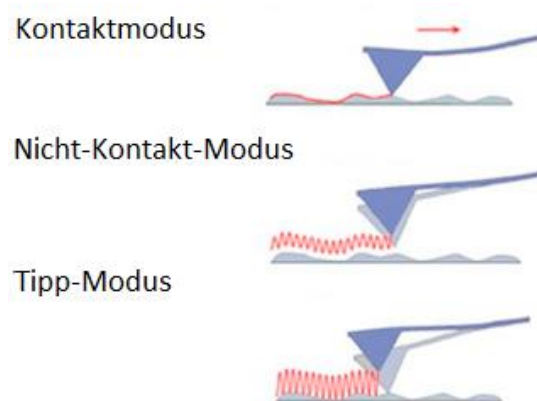


Abbildung 11: Schematische Darstellung der verschiedenen AFM-Modi (Abbildung aus [137]).

Durch die atomaren Kräfte nahe der Oberfläche ändert sich die Resonanzfrequenz, wodurch sich auch die Schwingungsamplitude ändert. Die Änderung der Schwingungsamplitude wird als „Feedback“-Kontrolle genutzt. Beispielsweise wird mittels Abstandsanpassung zwischen Spitze und Probe versucht, die Amplitude konstant zu halten (detaillierte Beschreibung in [136]). Ein Laserstrahl, fokussiert auf der Rückseite des Cantilevers, reflektiert die jeweilige Position in Richtung eines Fotodetektors und es erfolgt die Änderung in ein elektrisches Signal.

In dieser Arbeit wurde ein coreAFM von Nanosurf verwendet. Die AFM-Bilder wurden im kontaktlosen Modus unter Verwendung der PPP-XYNCHR-Spitze mit einer Federkonstante von 42 N/m aufgenommen. Die Änderungen der Morphologie in Wasser und in Lösungen mit

unterschiedlichem pH-Wert (NIST-Puffer: 4,01, 7,01 und 10,01 Hanna Instruments GmbH) wurden mit einer 150Al-G-Spitze (Federkonstante 5 N/m) untersucht. Des Weiteren wurde die Charakteristik der Falten (Wellenlänge λ und Amplitude A) bestimmt und der quadratische Mittelwert der Oberflächenrauheit (R_q) untersucht, um Aussagen über die Vergrößerung der Oberfläche und damit Rückschlüsse auf Reizantwort und Sensorsensitivität ziehen zu können. Die Auswertung und Verarbeitung der AFM-Bilder erfolgte mit dem Freeware-Programm Gwyddion (Version 2.55; 2019) [138].

Die Morphologie der Hydrogelmatrix kann auch die Verteilung der Analyten innerhalb des Hydrogels beeinflussen, was Auswirkungen auf die Analytbindung und -detektion hat. **Optische Mikroskopiemessungen** mit 400-facher Vergrößerung wurden ergänzend zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit mit einem Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss Microscope GmbH) durchgeführt. Weiterhin wurde ein 3D-Laser-Scanning-Mikroskop VK-X 3000-Serie (Keyence GmbH) verwendet bei einer Vergrößerung von 1500x. Die Faltenbreite wurde mit der Software Multifile Analyzer, Version 3.3.1.85 (Keyence GmbH) ausgemessen, dafür wurden 10 Faltenbreitenmessungen an jeder Probe durchgeführt und gemittelt.

4.2.4 Profilometrie

Zur Bestimmung der Schichtdicken der abgeschiedenen Hydrogelschichten wurde ein Oberflächenprofiler (DEKTAK3ST-Oberflächenprofiler von Bruker) verwendet. Um eine scharfe Kante für die Messung zu erzeugen, wurde vor dem Beschichtungsprozess ein Teil des Si-Substrates mit Kapton-Band maskiert, welches nach der Beschichtung wieder entfernt wurde. Die Messspitze zeichnet das Profil des Hydrogels über eine Länge von 10 mm mit einer Kraft von 2 mg und einer Geschwindigkeit von 50 s/cm auf. Jede Messung wurde dreimal durchgeführt und anschließend gemittelt.

4.2.5 Oberflächenladung

Die Oberflächenladung von Hydrogelen wird üblicherweise durch Ermittlung des Zetapotentials gemessen, bei dem es sich um die elektrische Potentialdifferenz zwischen der Oberfläche des Hydrogels und dem umgebenden Medium handelt. Es ist ein Maß für die Nettoladung auf der Hydrogeloberfläche, bestimmt durch die ionisierbaren Gruppen in der Polymermatrix. Dadurch können Aussagen über Abstoßung oder Anziehung zwischen dem Hydrogel und anderen geladenen Einheiten, wie z. B. Zellproteinen und anderen Biomolekülen, getroffen werden.

Das Zetapotential wurde mittels eines elektrokinetischen Analysators (SurPASS 3, Anton Paar GmbH) mit dazugehöriger Spalzmesszelle gemessen. Dazu wurden HD-Filme unterschiedlicher Mischungsverhältnisse auf 3 x 2,5 cm Glasobjektträger aufgebracht. Die Kalibrierung des Gerätes wurde mit kommerziell erhältlichen Kalibrierlösungen durchgeführt (NIST-Puffer: 4,01, 7,01 und 10,01 von Hanna Instruments GmbH). Die Bestimmung der Zetapotentiale erfolgte als Funktion des pH-Wertes in einer 1 mM KCl-Elektrolytlösung, wobei der pH-Wert der Lösung von 4 bis 9 variiert wurde, indem 0,05 M HCl oder 0,05 M NaOH durch die automatische Titrationseinheit des Instruments zugegeben wurden. Für die saure und basische Titration wurden getrennte Probenpaare verwendet, um Artefakte durch Oberflächenreaktionen während der Messung zu vermeiden. Für jeden pH-Wert wurden drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Als Referenzfläche wurden Messungen auf unbeschichteten Objektträgern aus Glas (ebenfalls drei Proben für jeden pH-Wert, Mittelwertbildung) durchgeführt. Das Zetapotential wurde in der SurPASS-Software nach den Gleichungen von Helmholtz-Smoluchowski [107] berechnet.

4.3 Elektrochemische Charakterisierung

Amperometrische Sensoren sind weit verbreitet in der Biosensorik, durch ihre Fähigkeit geringe Konzentrationen eines Analyten schnell und präzise zu detektieren. Für die Entwicklung eines solchen Sensors muss im Voraus die biokompatible Trägerschicht elektrochemisch charakterisiert werden, sodass der Durchtritt der Redoxspezies durch das Hydrogel zur Elektrodenoberfläche bewertet werden kann.

Die elektrochemischen Eigenschaften der plasma-polymerisierten Hydrogele wurden durch Cyclovoltammetrie (CV) unter Verwendung eines PalmSens4-Potentiostaten (PalmSens) untersucht. Dabei wurden die Voltammogramme mit einem konventionellen Drei-Elektroden-Aufbau (SPE DropSens C220AT, Metrohm) mit einer Goldarbeitselektrode (WE; 3 mm Durchmesser) und Platingegenoelektrode (CE) sowie einer Silber-Referenzelektrode (RE) aufgenommen. Die Proben wurden einer zyklischen Spannung von -300 bis 400 mV bei einer Abtastrate von 10 mV/s ausgesetzt. CV-Studien der pp HD-Filme wurden durchgeführt in Pufferlösungen mit pH 4, 7 und 10 (NIST-Puffer, Hanna Instruments GmbH) in Gegenwart einer 10 mM Kaliumferricyanidlösung $K_3[Fe(CN)_6]:K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) (Carl Roth GmbH) als Redox-Sonde. Für alle elektrochemischen Versuche wurden die Platingegenoelektrode sowie die Silberreferenzelektrode mit Kaptonklebeband während der Plasmapolymerisation abgeklebt und anschließend vorsichtig mit Isopropanol gereinigt, sodass eine Kontamination mit dem Polymer und damit eine Verfälschung des Messsignals ausgeschlossen werden kann.

Weiterhin werden auch die Enzymversuche auf den Hydrogelen elektrochemisch charakterisiert. Damit können Aussagen über die Substratzugänglichkeit der immobilisierten Enzyme getroffen werden. Für die Immobilisierungs- und Aktivitätsversuche der Hydrogele wurden ebenfalls die SPEs DropSens in der Drei-Elektroden-Konfiguration verwendet. Die Experimente mit GOx (Glucoseoxidase) wurden auf SPEs DropSens des Typs 250AT (Metrohm) durchgeführt und mit dem Potentiostat Autolab PGSTAT302N (Metrohm) gemessen. Hingegen erfolgten die Versuche mit AChE (Acetylcholinesterase) auf SPEs DropSens des Typs C220AT und dem Potentiostat PalmSens4 (PalmSens).

4.4 Enzymimmobilisierung

Neben der Entwicklung und Charakterisierung der plasma-polymerisierten Hydrogelschichten war die Überprüfung der Anwendbarkeit in der Biosensorik ein weiteres Ziel. Deshalb wurden zwei unterschiedliche, gut untersuchte Modellenzyme für die Immobilisierungsexperimente auf den Hydrogelschichten verwendet: Glucoseoxidase, GOx (aus *Aspergillus niger*, 10 kU/mg, Sigma-Aldrich) und Acetylcholinesterase, AChE (aus *Electrophorus electricus*, type V-S, 2049 U/mg, Sigma-Aldrich). So wurde mittels Immobilisierung von Acetylcholinesterase ein Biosensor entwickelt, der die Substratumsetzung von Acetylthiocholinchlorid zum Produkt Thiocholin zeigt. Außerdem wurde die Hemmung der Substratumsetzung mittels Eserin überprüft. Durch die Immobilisierung von Glucoseoxidase wurde die Substratumsetzung von Glucose als zweite biosensorische Anwendung untersucht.

Die physikalische Adsorption ist die einfachste und schnellste Immobilisierungsmöglichkeit von Enzymen, weshalb sie in dieser Arbeit verwendet wird. Nachdem die plasma-polymerisierte Hydrogelfilme mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (HD14, HD11 und HD41) auf den Arbeitselektroden der SPEs DropSens abgeschieden wurden, wurden diese fünf Minuten mit PBS-Puffer (50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.4) gewaschen, anschließend mit destilliertem Wasser gespült und mit Druckluft getrocknet. Eine Lösung von 5 µl AChE (20 µkat/ml in PBS) wurde auf die Arbeitselektrode der beschichteten SPEs getropft. Nach einer Inkubation von 6 h bei 4 °C wurden die Elektroden dreimal mit PBS gespült, getrocknet und vor der Verwendung bei 4 °C gelagert.

4.5 AChE-basierte Biosensorik

Zur amperometrischen Messung des Substratumsatzes wurden unterschiedliche ATChCl (Acetylthiocholinchlorid)-Konzentrationsstufen ($10 \mu\text{M} - 1 \text{mM}$) in Abständen von 50 s in kontinuierlich gerührtem Phosphatpuffer (PB; 50 mM Phosphat, pH 7,4) zugegeben, mit einem angelegten Elektrodenpotential von 0,42 V vs. Ag. Zur Messung der Hemmung wurden unterschiedliche Eserinkonzentrationen zu der Lösung mit 0,5 bzw. 1 mM ATChCl in PB ins Rührgefäß gegeben. Nach der Hemmung wurden die Sensoren durch Inkubation in PB regeneriert; der erfolgreiche Regenerationsprozess wurde anhand der aktuellen Veränderungen nach einer weiteren ATChCl-Zugabe bestätigt. Um die Visualisierung der Hemmsignalspuren zu verbessern, wurden normalisierte Signale (amperometrisch detektiertes Spurensignal dividiert durch das Signal vor der Zugabe des Inhibitors) aufgetragen. Die Hemmraten H wurden bestimmt durch:

$$H = \left(1 - \frac{I_2}{I_1}\right) \cdot 100 \% \quad (4.2)$$

I_1 bezeichnet den stationären Strom vor der Eserinzugabe und I_2 den Strom 900 s nach der Eserinzugabe. Die Daten wurden durch eine 4-Parameter-Log-Funktion gefittet, näher beschrieben in [139].

4.6 Glucose-Biosensor

Die Versuche mit GOx wurden ebenfalls auf den Arbeitselektroden der SPEs, beschichtet mit plasma-polymerisierten Hydrogelen, durchgeführt. Dafür wurde die Mischung HD14 sowie ein dreischichtiger Film HD14-3 (drei aufeinanderfolgende Schichten aus HD14, mit den gleichen Prozessparametern) verwendet. Danach wurden die Elektroden dreimal mit PB (pH 7,0) gewaschen und 100 μl einer Lösung von GOx (10 mg/ml) in PB auf die Elektrodenoberfläche getropft. Nach 6 h Inkubation bei 4 °C wurden die Elektroden erneut dreimal mit PB gespült, um schwach adsorbierte Moleküle zu entfernen. Cyclische Voltammogramme wurden in Gegenwart von 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ in PB mit einer Scanrate von 10 mV/s aufgenommen. Für die amperometrischen Experimente wurden Glucose-Aliquots in Abständen von 30 s in das kontinuierlich gerührte PB gegeben, um Endglucosekonzentrationen von 0,2–1,2 mM zu erzielen. Die Messung wurde mit einem angelegten Elektrodenpotential von 0,6 V vs. Ag durchgeführt.

5 Ergebnisse und Diskussion

In diesem Kapitel werden die experimentellen Ergebnisse der hier vorliegenden Forschungsarbeit beschrieben und diskutiert. Das Ziel der Arbeit war die neuartige Herstellung plasma-polymerisierter Hydrogele mittels Atmosphärendruck-Plasmajets sowie deren Charakterisierung und Eignungsprüfung im Hinblick auf eine Funktionsschicht und Immobilisierungsplattform von Biomolekülen für biosensorische Anwendungen.

Dabei wurden folgende drei Schwerpunkte bearbeitet: Im **ersten Teil** (vgl. Kapitel 5.1) wird die Herstellung und Entwicklung plasma-polymerisierter Hydrogele beschrieben. Darauf aufbauend erfolgt die chemische und morphologische Charakterisierung sowie die Beurteilung von Oberflächenladungen in Abhängigkeit vom pH-Wert auf dem Modellsubstrat Silizium. Der **zweite Teil** (vgl. Kapitel 5.2) befasst sich mit der Charakterisierung dieser Hydrogelschichten auf Goldelektroden im Hinblick auf biosensorische Anwendungen. Dafür werden die Benetzbarkeit und die Oberflächenenergien der Hydrogele auf den Goldoberflächen analysiert sowie die morphologischen Veränderungen in Pufferlösungen mit verschiedenen pH-Werten herausgestellt. Ein weiterer Punkt ist die Untersuchung des elektrochemischen Ansprechverhaltens bzw. des pH-abhängigen Ladungstransfers. Am Ende des zweiten Kapitels befasst sich ein kurzer Abschnitt mit dem Versuch, noch dünnere Hydrogelschichten mit der Verneblermethode herzustellen. Im **dritten Teil** der Arbeit (vgl. Kapitel 5.3) werden die plasma-polymerisierten Hydrogele auf ihre Anwendbarkeit in der Biosensorik mit zwei verschiedenen Enzymen geprüft.

Teile der Ergebnisse und daraus abgeleitete Schlussfolgerungen stammen aus den bereits veröffentlichten Publikationen [127, 140-142].

5.1 Teil 1: Herstellung und Charakterisierung der Hydrogelschichten

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt die Herstellung der plasma-polymerisierten Hydrogelschichten aus den acrylatbasierten Monomeren HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) und DEA-EMA (Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester) mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen. Die Darstellung der Schichten erfolgte mittels eines unter Atmosphärendruck betriebenen Plasmajets. Für die Auswahl der Monomere wurden dafür im Vorfeld intensive Literaturrecherchen durchgeführt, um deren Eignung für biomedizinische Anwendungen zu gewährleisten. HEMA ist eine gut untersuchte Hydrogelkomponente, welche sich durch Biokompatibilität und gute Elastizität auszeichnet [143, 144]. Außerdem konnten die Vorarbeiten von Buxadera-Palomero

et al. [38] bereits zeigen, dass eine Polymerisation mittels Plasmajet möglich ist. Als weiteres biokompatibles Monomer wurde DEAEMA ausgewählt, welches mit einer tertiären Aminogruppe ausgestattet ist [145]. Diese kann durch Änderung des pH-Werts protoniert oder deprotoniert werden, wodurch eine Strukturänderung aufgrund eines Umgebungsreizes ermöglicht wird [146]. Die chemische und morphologische Charakterisierung soll dabei ein grundlegendes Verständnis der Hydrogelzusammensetzung durch den Plasmapolymerisationsprozess liefern.

5.1.1 Depositionsprozess plasma-polymerisierter Hydrogele

Die Plasmapolymerisation bietet viele Vorteile wie die einfache Prozessführung, die hohe Reaktivität der plasmainduzierten Radikale, die niedrige Behandlungstemperatur und den Verzicht auf aggressive Chemikalien, wodurch eine lösungsmittelfreie Herstellung von funktionellen Schichten ermöglicht wird [147-149]. Wie in der Einleitung und Zielstellung erwähnt, wurde an die Vorarbeiten von Buxadera-Palomero et al. [38] angeknüpft, um funktionelle Hydrogelschichten für biosensorische Anwendungen herzustellen. Die Herausforderung bestand zunächst darin, geeignete Parameter zu finden, welche einerseits Haftung und andererseits Funktionalität für die Hydrogelschichten aus HEMA und DEAEMA gewährleisten können. Für die Abscheidung wurden dafür systematisch die Prozessparameter wie Gasflussrate (500 sccm–1 slm), Behandlungszeit (10–60 s), Arbeitsabstand (3–10 mm) und Leistungseintrag (5–10 W) ermittelt. Die Stabilität und Homogenität der abgeschiedenen Filme bilden die Grundlage für den weiteren Verlauf der Arbeit. Durch die Oberflächenaktivierung mittels Plasma für 30 s sollen die Benetzbarkeit und die Hafteigenschaften des Substrats verbessert werden, was bereits durch zahlreiche Studien belegt wurde [150, 151]. Bei der anschließenden Plasmapolymerisation der Mischungen auf den Substraten deutet eine milchig-trübe Schicht mit charakteristischen, farbigen Interferenzen [152, 153] auf eine hydrogelartige Schicht hin. Dabei wurde darauf geachtet, dass mit der Parameterauswahl die benötigte Schichtstabilität hinsichtlich Haftung und Löslichkeit im wässrigen Milieu erzielt wird. Die abgeschiedenen Schichten wurden deshalb unter fließendes Wasser gehalten und anschließend optisch auf Delaminationen/Waschstabilität geprüft. Bei einem Gasfluss von 1 slm Ar, einer Eingangsleistung von 5 W, einem Arbeitsabstand von 5 mm und einer Polymerisationszeit von 30 s konnten dadurch waschstabile Hydrogelschichten mit den Mischungsverhältnissen 1:4 (HD14), 1:1 (HD11) und 4:1 (HD41) generiert werden. Diese Werte wurden aus den systematischen Parameterstudien als „beste“ Prozessbedingungen bestimmt und über die gesamte Arbeit für alle Versuche verwendet. Die Charakterisierung der Hydrogelschichten wurden zunächst auf Si-Wafern durch-

geführt, da durch die glatte Oberfläche eine einfache Charakterisierung der Schicht wie beispielsweise die Schichtdickenbestimmung oder auch die Morphologie möglich ist. Zudem bietet ein Si-Wafer als Substrat einen guten chemischen Kontrast für die Analyse der Schichtzusammensetzung. Die fotografischen Aufnahmen in Abbildung 12 zeigen in der oberen Reihe die mittels Pipette abgesetzten Tropfen auf den Si-Wafern (siehe Herstellungsprozess unter 3.1). Das Auseinanderlaufen der Tropfen ist durch die unterschiedlichen Viskositäten von HEMA (6,8 mPa·s bei RT) und DEAEMA (1,5 mPa·s bei RT) bedingt. Die Monomermischung HD41 zeigt somit die geringste Fließfähigkeit. Anschließend erfolgte die Polymerisation der Hydrogelschichten mit den verschiedenen Mischungsverhältnissen durch den Plasmajet, dargestellt in der unteren Reihe in Abbildung 12. Zu sehen sind ringförmige Abscheidungsprofile, welche nicht exakt symmetrisch sind. Dies hat zwei mögliche Ursachen: zum einen begründet in einer geringen Abweichung in der Ausrichtung der inneren zur äußeren Kapillare des Jets. Zum anderen wurden die abgesetzten Tropfen der Hydrogelmischungen unter die laufende Plasmaquelle geführt, durch den Gasfluss und unspezifische Polymerisationsreaktionen kommt es zu einer asymmetrischen Verformung der Hydrogelschichten. Der Durchmesser der sichtbar beschichteten Fläche beträgt 8 mm, unabhängig vom Mischungsverhältnis. Die einfache Methodik ermöglicht somit eine schnelle und lösungsmittelfreie Herstellung von Hydrogelschichten mit variablen Schichtdicken, ohne mehrstufige Vorbereitung und ohne organische Abfallprodukte.

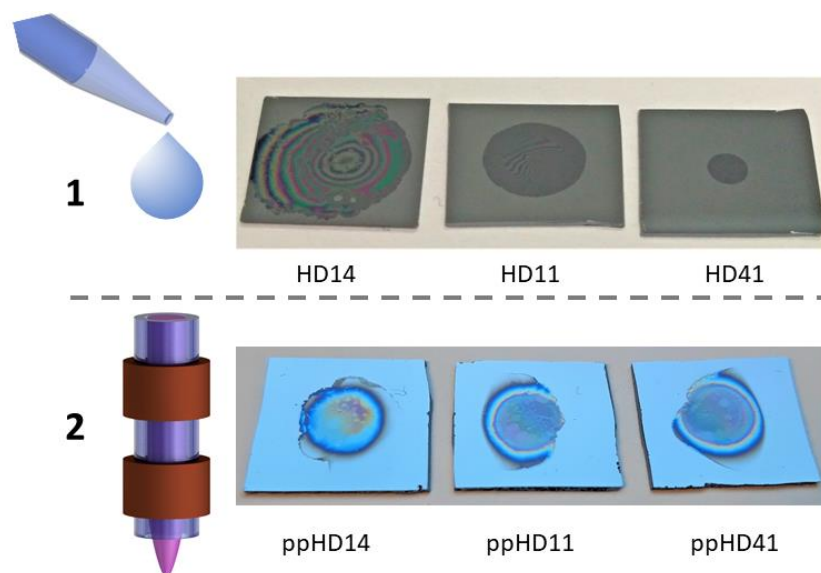


Abbildung 12: Fotografische Aufnahmen der mittels Pipette abgesetzten Monomermischungen auf den Si-Wafern (obere Reihe) sowie den anschließend plasma-polymerisierten Hydrogelschichten unterschiedlicher Mischungsverhältnisse (untere Reihe).

5.1.2 Chemische Hydrogelzusammensetzung FT-IR-Untersuchungen

Durch die Wechselwirkung reaktiver Plasmaspezies mit den Mischungen aus HEMA und DEAEMA kommt es zu Kettenwachstumsreaktionen sowie zu Rekombinationen und/oder Umlagerungsprozessen der Monomerfragmente, was zu ungeordneten, hochvernetzten Plasmapolymere mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen führt. Zur Bestimmung der chemischen Zusammensetzung wurden FTIR-Spektren für die verschiedenen plasma-polymerisierten HD-Filme (siehe Abbildung 13, a) sowie für die nicht plasma-polymerisierten, flüssigen Monomermischungen (siehe Abbildung 13, b) aufgenommen. In den Spektren gibt es mehrere Gemeinsamkeiten, welche die Grundstruktur der plasma-polymerisierten und nicht plasma-polymerisierten Monomere (siehe Anhang 1) beschreiben. HEMA und DEAEMA sind beispielsweise Vinylmonomere, die funktionelle Hydroxyl- bzw. (tertiäre) Aminogruppen enthalten. So zeigt eine breite Absorptionsbande im Bereich von $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ mit einem Maximum bei 3450 cm^{-1} die O-H-Streckschwingung der Hydroxylgruppe des HEMA-Monomers, welche mit einem höheren HEMA-Gehalt in den Mischungen eine zunehmende Intensität aufweist. Ein Peak mit geringer Intensität bei $\sim 2800\text{ cm}^{-1}$ kann auf die tertiären Aminogruppen ($>\text{NCH}_n$) zurückgeführt werden, welcher größer wird je größer der DEAEMA-Anteil ist. Die Banden der C-H-Streckschwingung (2960 und 2850 cm^{-1}) und der C-H-Deformationsschwingung (1465 und 1355 cm^{-1}) entsprechen den aliphatischen Alkanfragmenten (CH_3 - und CH_2 -Gruppen) der Hydrogelketten. Weiterhin ist ein charakteristischer Absorptionspeak bei 1730 cm^{-1} zu beobachten, der den Carbonylstreckschwingungen der Estergruppen sowie der dazugehörigen C-O Streckschwingungen bei 1160 cm^{-1} zuzuordnen ist. Eine weitere signifikante Bande, die bei 1296 cm^{-1} auftritt, kann der C-H-Biegung außerhalb der Ebene in aliphatischen Ketten zugeordnet werden.

Der Unterschied in den Spektren besteht im Intensitätsverlust und im Fehlen einiger Peaks, nachdem die Monomermischungen plasma-polymerisiert wurden. Im Spektrum Abbildung 13 b sind die strukturellen Einheiten, die den stärksten Rückgang aufweisen bzw. fast verschwunden sind, mit einem Kreis versehen. Dies sind die für Vinylmonomere charakteristische C=C-Bindung bei 1630 cm^{-1} wie auch die =C-H-Bindung bei 1320 cm^{-1} sowie -C=CH bei 816 cm^{-1} . Der Verlust der Peakintensität ist bei ppHD41 geringer als bei ppHD14, wo die Peaks fast verschwunden sind. Weiterhin konnte bei den plasma-polymerisierten Verbindungen eine Verschiebung der C=O Streckschwingung von 1718 cm^{-1} auf 1730 cm^{-1} beobachtet werden, was auf das Fehlen der konjugierten Estergruppen hinweist. Die Abnahme der Intensität der Banden bei 1630 cm^{-1} und 816 cm^{-1} sind ein Indiz, dass sich die endständigen Vinylgruppen ($\text{CH}_2=\text{CH}-$) zu Methylene-

gruppen (-CH₂-) umgewandelt haben. Diese Veränderungen deuten auf die Spaltung der Vinyl-doppelbindungen verbunden mit Vernetzungsreaktionen hin, welche durch den Plasmapolymerisationsprozess hervorgerufen werden [88, 154, 155]. Über einen Vergleich des Vinylpeaks (C=C) vor und nach der Synthese gegen den internen Standard (C=O) [156] kann darüber hinaus der Polymerisationsprozess beurteilt werden. Dies erlaubt Aussagen darüber, wie viel der Monomermischung tatsächlich zum Polymer umgesetzt wurde. So wurde festgestellt, dass die Umwandlung für HD14, 11, 41 im abgeschiedenen Zustand 94 %, 93 % bzw. 90 % beträgt (siehe Abbildung Anhang 2). Nach der Lagerung in Wasser steigen die Werte leicht auf ein gemeinsames Niveau von 95 %, an, was darauf hinweist, dass ungebundene Polymerisationseinheiten während des Eintauchens und der Lagerung gewaschen werden. In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Plasmapolymere aus acrylatbasierten Monomeren die Funktionalitäten der ursprünglichen Monomere beibehalten [157-159]. Dennoch können einige Funktionalitäten durch Reaktionen von Monomermolekülen mit ROS (und RNS) und durch den Wiederausammenbau während des Plasmapolymerisationsprozesses verloren gehen oder neu gebildet werden [160].

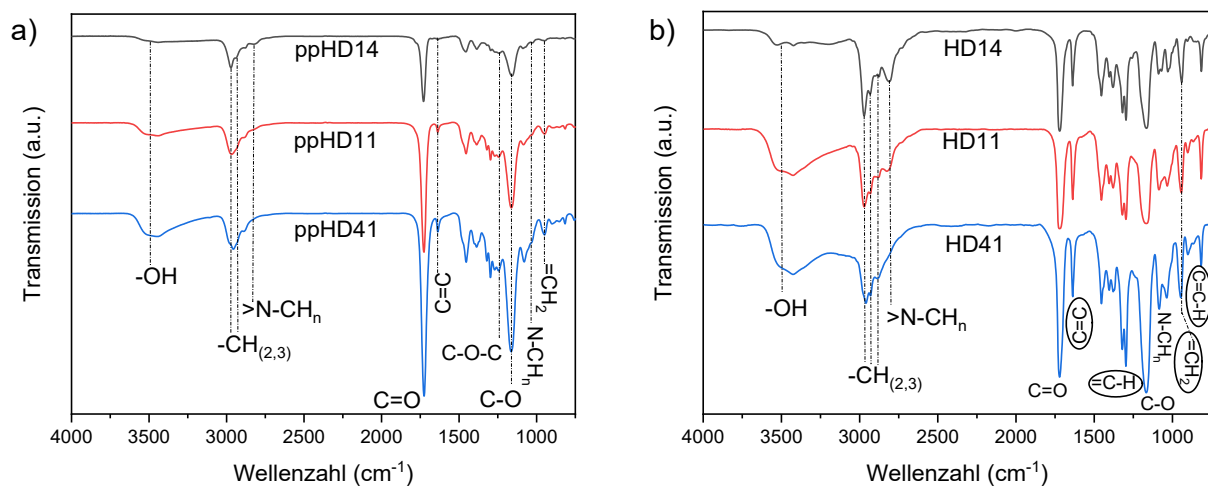


Abbildung 13: FT-IR-Spektren der plasma-polymerisierten (pp) HD-Filme (a) und der nicht-polymerisierten Monomermischungen (b). Die Kreise in b) zeigen die Peaks, die durch die Plasmapolymerisation am stärksten beeinflusst werden.

5.1.3 Chemische Hydrogelzusammensetzung XPS-Untersuchungen

Ergänzend zu den FT-IR-Studien wurden für die Untersuchung der elementaren Zusammensetzung und der Bindungszustände der abgeschiedenen Plasmapolymerschichten XPS-Messungen durchgeführt. Zu beachten ist, dass das Messsignal aufgrund der Informationstiefe bei den FT-IR-Messungen durch die gesamte Schichtdicke gemittelt wird, während die Untersuchungen

mittels XPS hingegen isolierte Punkte an der Oberfläche betrachten. Die Schichten wurden jeweils vor und nach der Lagerung in entionisiertem Wasser untersucht, um daraufhin die Stabilität zu beurteilen. In Abbildung 14 werden die Elementverhältnisse in Abhängigkeit der verschiedenen HEMA:DEAEMA-Mischungsverhältnisse gezeigt. Das Verhältnis von Sauerstoff zu Kohlenstoff, O/C, nimmt mit zunehmendem HEMA-Anteil zu, während das Verhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff, N/C, abnimmt. Nach der Lagerung in H₂O sind die Werte niedriger, da durch die Lagerung die nicht polymerisierten Monomereinheiten aus dem Netzwerk „herausgewaschen“ wurden. Auswaagen der Schichten direkt nach der Plasmapolymersation und nach Lagerung für 24 h in Wasser (mit anschließender Trocknung von 6 h) gegen den unbehandelten Si-Wafer haben einen initialen Massenverlust von ~ 30 % ergeben. Nach erneuter Lagerung in Wasser für weitere 24 h wurde kein weiterer Massenverlust beobachtet.

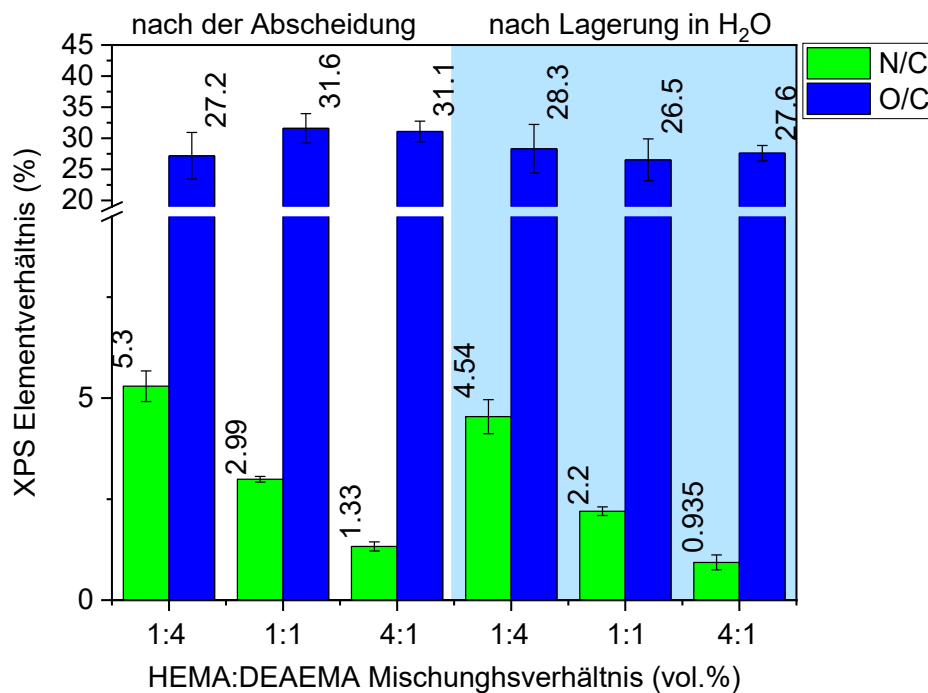


Abbildung 14: XPS-Elementaranalyse der verschiedenen Hydrogelmischungen direkt nach der Abscheidung und nach Lagerung in Wasser für 24 h ($n=3$).

Zum Nachweis und zur Interpretation funktioneller Gruppen wurden hochaufgelöste C1s-Spektren gemessen. Die Integration der Peaks ermöglicht eine Quantifizierung von gebundenen Elementen und Stoffklassen. Die hochaufgelösten C1s-Spektren wurden von fünf Hauptkomponenten bei Bindungsenergien von 285,0; 285,8; 286,5; 287,1 und 289,2 eV angepasst [161], die auf aliphatisches CH/CC, C-CO-O, CO, C=O/OCO und OC=O zurückgeführt werden können (siehe Tabelle 2). Aufgrund der strukturellen Komplexität der plasma-polymerisierten Schicht

können die genauen chemischen Bindungszustände nicht vollständig bestimmt werden [162]. Die signifikantesten Unterschiede liegen auch hier in der Zunahme des C-N-Anteils mit höherem DEAEMA-Gehalt in der Hydrogelmischung. Bei HD14 liegt der Wert bei ~18 %, während der Anteil bei HD11 und HD41 hingegen bei ~12 % liegt.

Nach 24 h Lagerung im Wasser nimmt der Anteil an C-N bei HD14 leicht ab, ebenso der Anteil an C-O-C=O bei allen Mischungsverhältnissen, was wiederum auf das Herauswaschen der nicht polymerisierten Monomereinheiten hindeutet. Der Anteil an C-O steigt zumindest bei der Mischung HD11 um 2 %. Dies kann durch die Einführung endständiger sauerstoffhaltiger Gruppen in die pp-Hydrogelfilme aufgrund der Lagerung in H₂O erklärt werden [163]. Insgesamt wurden jedoch keine signifikanten Veränderungen der chemischen Struktur sowie funktionaler Gruppen beobachtet. Die XPS-Ergebnisse zeigen somit die gute Stabilität der Hydrogelfilme in wässriger Umgebung.

Tabelle 2: Zuordnung chemischer Bindungen, dazugehörige Bindungsenergien und Atomprozentanteile der HD-Beschichtungen im abgeschiedenen Zustand und nach der Lagerung in Wasser, bestimmt mittels XPS-Messungen.

	C-C/H 285,0 eV	CC(=O)OR, C-N 285,8 eV	C-O 286,5 eV	COC=O 287,1 eV	C(=O)O 289,2 eV
HD14	50,6 ± 3,6	17,6 ± 2,7	17,3 ± 1,4	6,6 ± 0,9	8,1 ± 1,1
HD14 (H ₂ O)	57,6 ± 2,1	13,3 ± 1,2	16,9 ± 1,8	3,7 ± 0,6	8,5 ± 0,8
HD11	52,8 ± 2,4	12,1 ± 0,6	17,2 ± 1,4	7,6 ± 1,0	10,3 ± 1,0
HD11 (H ₂ O)	55,4 ± 1,7	12,5 ± 1,1	19,0 ± 1,3	3,5 ± 0,5	9,6 ± 0,5
HD41	55,7 ± 1,5	11,4 ± 0,6	15,0 ± 1,1	8,2 ± 0,9	9,7 ± 0,8
HD41 (H ₂ O)	57,2 ± 2,8	12,3 ± 1,4	15,9 ± 1,4	5,4 ± 0,3	9,3 ± 1,1

5.1.4 Morphologie und Schichtdicken

Durch die Plasmapolymersation wird das Hydrogelnetzwerk ausgebildet und gleichzeitig kann es durch Oberflächeninstabilitäten während des Herstellungsprozesses zu Strukturen wie Falten und Knicke auf der Oberfläche der Schichten kommen. In der Vergangenheit wurde die Oberflächenbeschaffenheit der Hydrogele, aufgrund fehlender Charakterisierung und der Schwierigkeit, die Strukturen vorherzusagen, weitestgehend ignoriert. Durch intensive theoretische und experimentelle Forschung [164-166] ist es jedoch gelungen, ein besseres Verständnis über

die Ursachen und die Eigenschaften der Faltenstrukturen und anderer Oberflächeninstabilitäten zu erlangen. Die Steuerung und Kontrolle der Morphologien auf der Mikro- und Nanometerskala ist heute eine gängige Praxis in der Oberflächenbeschichtung [167, 168]. Die Verwendung solcher strukturierten Hydrogele in Sensorsystemen kann beispielsweise eine schnellere Reizantwort ermöglichen oder einen positiven Einfluss auf die Zellproliferation, -ausbreitung und -differenzierung haben [169].

Abbildung 15 zeigt eine Übersichtsaufnahme des plasma-polymerisierten Hydrogels HD11 bei 100-facher Vergrößerung, stellvertretend für alle Hydrogelmischungen. Am Übergang zum Siliziumsubstrat (Abbildung 15 A) bilden sich feine Verzweigungen, während der mittlere Bereich aus einem dichten Netzwerk (Abbildung 15 B) des abgeschiedenen Hydrogels besteht. Die unterschiedlichen Farben entstehen durch unterschiedliche Schichtdicken, die mit dem Licht interferieren. Die Schicht zeigt eine einzigartige, definierte Gelstruktur.

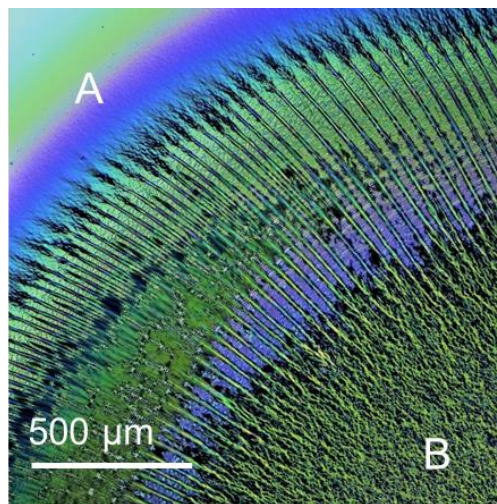


Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahme eines Hydrogels mit 100x-Vergrößerung [127]. A kennzeichnet dabei die Randregion und B den mittleren, vernetzten Teil der Hydrogelschicht.

Weitere detailreichere mikroskopische Aufnahmen der verschiedenen Hydrogeloberflächen mit stärkerer Vergrößerung sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt. Auf allen Bildern ist eine Faltenstruktur erkennbar. Bei konventionellen Beschichtungsverfahren, beispielsweise durch *Spin Coating*, werden die Falten auf den Hydrogelschichten durch einen zusätzlichen Schritt erzeugt. Dies erfolgt meist durch UV-, thermischer oder plasmagestützter Behandlung [77, 170, 171]. Durch das Einwirken des Plasmas auf die flüssige Monomermischung und des daraus resultierenden Polymers bilden sich simultan periodische Faltenstrukturen, welche sich in alle Richtungen ausbreiten. Die Bildung dieser Strukturen wird dabei durch mechanischen Stress

während des Plasmaprozesses verursacht. Das heißt, entlang der aufwachsenden Schicht entsteht ein Spannungsunterschied, was durch die Bildung von Falten ausgeglichen wird [172].

Mit zunehmendem HEMA-Anteil nimmt auch die Faltenausprägung zu. Faltenbreitenmessungen (siehe Tabelle 3) bestätigen die Beobachtungen, sodass die Falten der Mischung HD14 mit $1,3 \pm 0,18 \mu\text{m}$ am kleinsten sind und die Falten der Mischung HD41 mit $2,2 \pm 0,24 \mu\text{m}$ am breitesten. Schichtdickenmessungen mit dem Profilometer zeigen den gleichen Trend: Mit Zunahme des HEMA-Anteils nimmt die Schichtdicke zu. So wurden Schichtdicken von einigen hundert nm für HD14 und bis zu $1,5 \mu\text{m}$ dicke Hydrogelen mit HD41 erreicht. Auch nach der Lagerung in Wasser für 24 h bleiben die Werte für die Schichtdicken und Faltenbreiten in ähnlichen Bereichen, was eine gute Stabilität der Hydrogele beweist. Aufgrund der guten Gelierungseigenschaften gilt HEMA in der Literatur als „Rückgratbildende Einheit“ [13, 173]. Das heißt, je mehr HEMA in der Mischung vorhanden ist, bei ansonsten gleichbleibenden Prozessbedingungen, desto dicker wird die Schicht bei der Plasmapolymerisation.

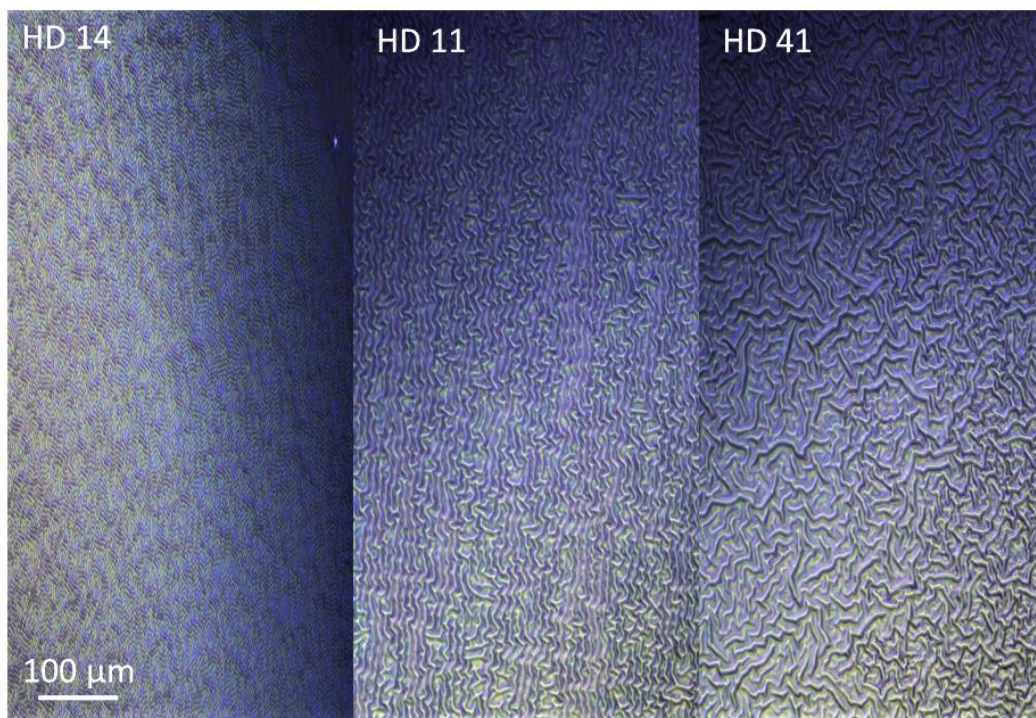


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme bei 400-facher Vergrößerung. Mit Zunahme von HEMA in den Mischungen zeigt sich eine stärkere Ausprägung der charakteristischen Faltenmorphologie.

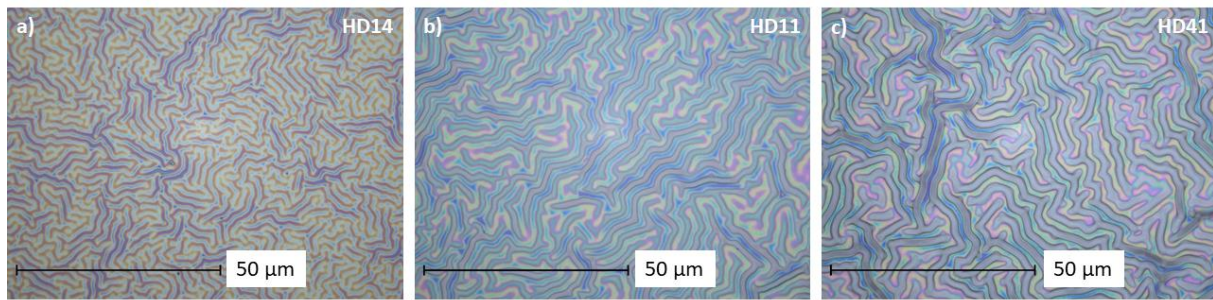


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme bei 1500-facher Vergrößerung.

Tabelle 3: Ermittelte Schichtdicken aus Profilometermessungen ($n=3$) und Faltenbreiten der Hydrogelschichten, gemessen aus den mikroskopischen Aufnahmen ($n=10$).

	Schichtdicke (μm)		Faltenbreite (μm)	
	Nach Abscheidung	Nach Lagerung in H_2O	Nach Abscheidung	Nach Lagerung in H_2O
HD14	$0,47 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,1$
HD11	$1,05 \pm 0,2$	$1,02 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$1,5 \pm 0,3$
HD41	$1,54 \pm 0,1$	$1,42 \pm 0,1$	$2,2 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,2$

In Abbildung 18 sind die verschiedenen Hydrogelfilme nach der Lagerung in Wasser gezeigt. Dabei wurde die untere Bildreihe mit 50-facher Vergrößerung aufgenommen und die oberen Bilder mit 400-facher Vergrößerung. Auffällig ist die Lochstruktur, die nach der Lagerung in Wasser auftritt. Bei genauerer Betrachtung sind jedoch keine Löcher entstanden, sondern blasenartige Strukturen, unter welchen die Falten erhalten geblieben sind (in der vergrößerten Aufnahme der HD14-Beschichtung deutlich zu erkennen). Aufgrund des Quellens und Schrumpfens durch den Kontakt mit Flüssigkeiten und des anschließenden Trocknens sowie der daraus resultierenden Phasenseparation können Hydrogele Form- und Volumenänderungen erfahren, wie im theoretischen Teil beschrieben [66]. Experimentelle Studien haben eine Vielzahl von Instabilitätsmustern in Hydrogelen beobachtet, ausgelöst durch Volumenwachstum und Druckspannungen in weichem Material [174-176]. Eine Teilerscheinung ist dabei die partielle Delaminierung, bei der sich aufgrund der mechanischen Fehlpaarung ein Teil der Schicht ablöst und blasenartige Strukturen bildet [177]. Diese Blasenmuster werden zufällig auf der Geloberfläche verteilt, während der Großteil der Masse homogen bleibt [66]. In Abbildung 18 erscheinen die Blasenstrukturen des Hydrogels mit der Mischung HD14 am ausgeprägtesten, ein Grund dafür kann die geringere Schichtdicke sein. Wie in Abschnitt 5.1.3 erwähnt, kommt es zu einem Massenverlust durch unpolymerisierte Einheiten, jedoch bleibt die Gesamtschichtdi-

cke erhalten. Die erhaltenen Ergebnisse zeigen den direkten Einfluss der Mischungszusammensetzung auf die Gesamtdicke der Schichten, die folglich die Morphologie beeinflusst. Aufgrund der auftretenden Blasenstrukturen nach dem Eintauchen in Wasser wurden die Hydrogelschichten vor den weiteren Experimenten mit Flüssigkeit gespült/gewaschen, um Artefakte in der Analyse aufgrund von anfänglichem Filmverlust zu vermeiden.

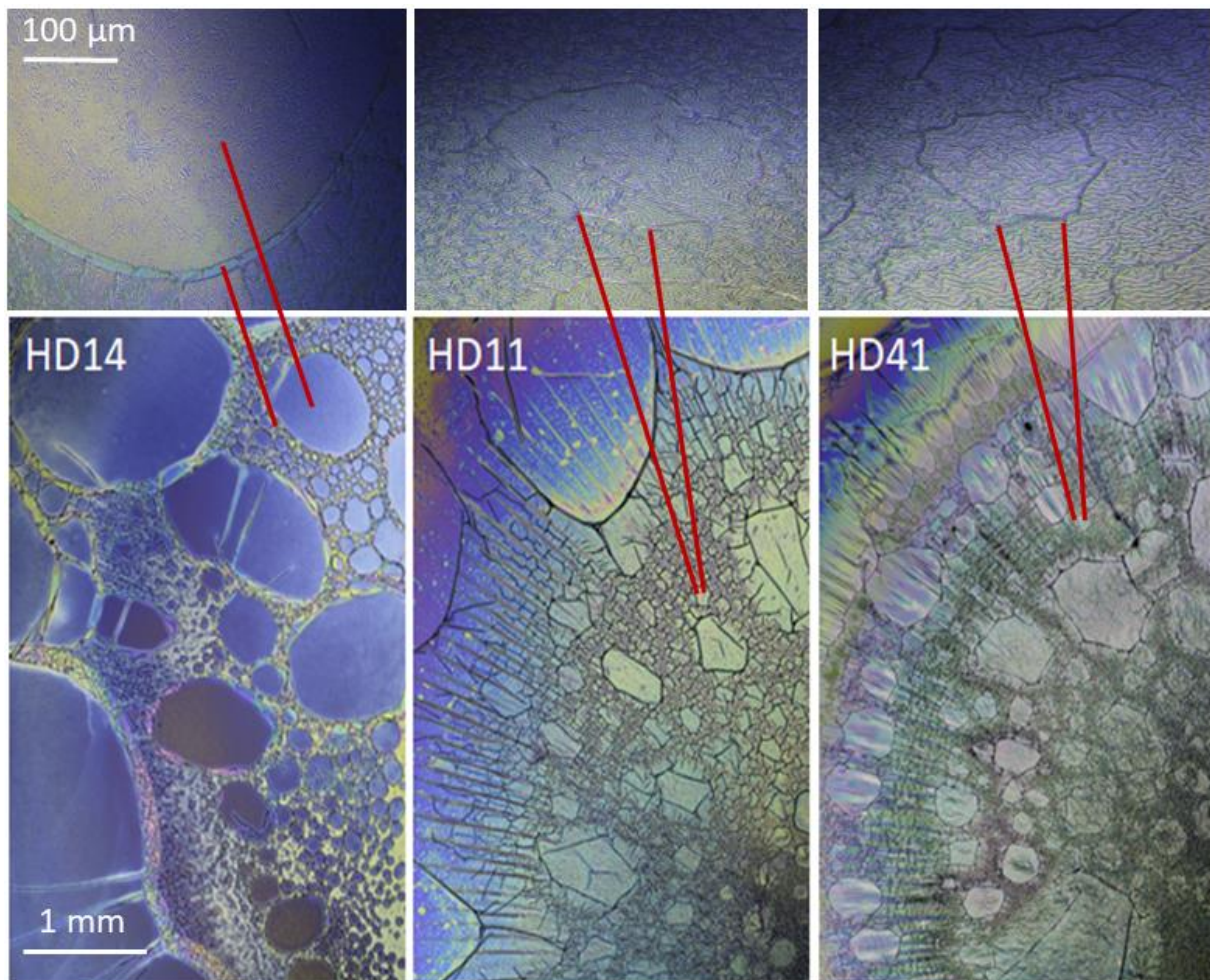


Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme mit Blasenstrukturen nach der Lagerung in Wasser. Untere Reihe: bei 50-facher Vergrößerung. Ausschnitte in der oberen Reihe: 400-fache Vergrößerung.

5.1.5 Topographie und Faltencharakteristik

Durch komplexe Faltenstrukturen kann die Oberfläche von Sensoren gezielt vergrößert werden, was für das Kontaktverhalten mit der Umgebung eine große Rolle spielt. So wird die Oberflächeninteraktion mit biologischer Materie (Zellen, Bakterien und Gewebe) stark von der Textur im Makro- und Mikromaßstab beeinflusst und bestimmt deren gesamte Biokompatibilität [178,

179]. Für die nähere Betrachtung der Faltencharakteristik wurden daher AFM-Analysen durchgeführt, um weitere Informationen über die topographischen Eigenschaften der Hydrogelfilme zu erhalten. Dabei wurde der Einfluss des Mischungsverhältnisses auf die Gesamtdicke und die Faltengröße (Faltenwellenlänge λ und Faltenamplitude/-höhe A) untersucht. AFM-Aufnahmen in Abbildung 19 zeigen, wie auch schon in den mikroskopischen Aufnahmen, die Bildung eines faltigen Oberflächenmusters. Auch hier ist deutlich zu erkennen, dass die Eigenschaften des Mikromusters durch das HD-Mischungsverhältnis beeinflusst werden. Mit zunehmendem HEMA-Anteil nimmt die Faltengröße und -breite zu, wie in den Höhenprofilen unter den AFM-Aufnahmen erkennbar. Der mittels AFM ermittelte Rauheitsparameter (R_q) nimmt ebenfalls zu.

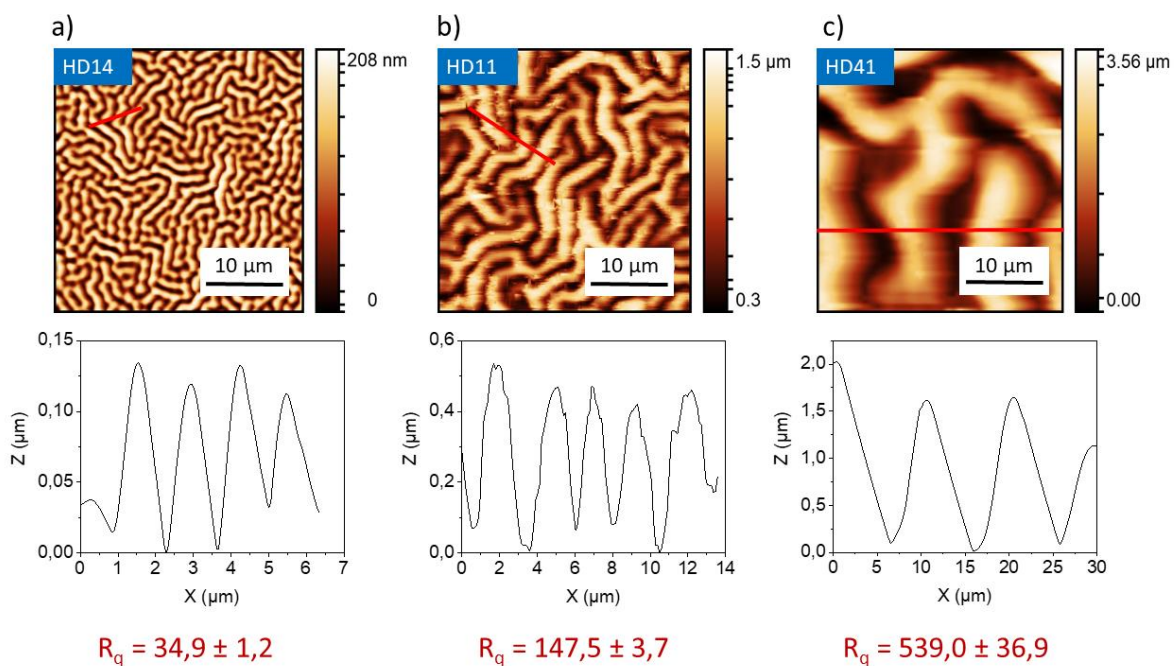


Abbildung 19: AFM-Bilder der Faltenstrukturen der HD-Filme in Abhängigkeit vom HD-Mischungsverhältnis und den entsprechenden Höhenprofilen mit Rauheitsparameter.

Die Faltenwellenlänge (λ) und -amplitude (A) der unterschiedlichen Mischungsverhältnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Bei Hydrogelfilmen im abgeschiedenen Zustand nehmen durch Verringerung der Menge an DEAEMA (Erhöhung des HEMA) im Mischungsverhältnis λ und A zu. Insbesondere steigt λ von $1,39 \pm 0,11 \mu\text{m}$ für HD14 auf $9,46 \pm 1,09 \mu\text{m}$, während für HD41 A von $0,12 \pm 0,01 \mu\text{m}$ auf $1,58 \pm 0,14 \mu\text{m}$ ansteigt. Die Falteigenschaften bleiben auch nach der Lagerung in Wasser 24 h vergleichbar, wie in auch schon in Tabelle 3 gezeigt. Die Wellenlänge (Breite) und Amplitude (Höhe) der Falten können durch Modifikation in der Zusammensetzung der Hydrogelmischungen verändert werden.

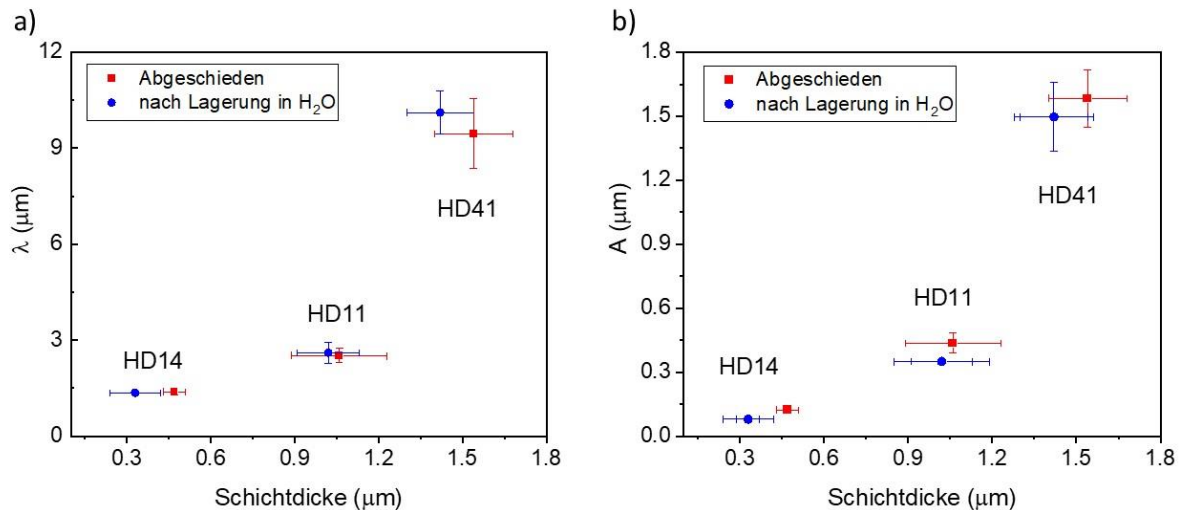


Abbildung 20: Faltenwellenlänge (λ) und Faltenhöhe (A) in Abhängigkeit der Schichtdicke bestimmt durch AFM-Messungen.

5.1.6 Oberflächenladung

Zetapotentialmessungen geben Aufschluss über das Oberflächenladungsverhalten im Kontakt mit wässrigen Elektrolyten. Darüber hinaus lässt sich der isoelektrische Punkt (IEP) bestimmen, also der pH-Wert, bei dem Moleküle und Beschichtungen in Flüssigkeiten elektrisch neutral erscheinen. Im Speziellen können weiterhin Aussagen über Oberflächenladungen in Abhängigkeit des pH-Wertes getroffen und damit Rückschlüsse über funktionelle Gruppen an der Fest-Flüssig-Grenzfläche gewonnen werden. Das Zetapotential ist somit eine wichtige Kenngröße für die Hydrogelschichten, damit die Adhäsionseigenschaften der Oberflächen charakterisiert werden können. Ein geeignetes Zetapotential kann die Biokompatibilität verbessern und unerwünschte Reaktionen und Bindungen reduzieren. Außerdem hilft die Oberflächenladung, bestimmte Ionen oder andere geladene Teilchen anzuziehen, wodurch die Funktionalität und die Performance in einem Biosensor beeinflusst wird. Enzyme beispielsweise sind abhängig vom pH-Wert ihrer Umgebung. Der isoelektrische Punkt einer Glucoseoxidase liegt bei 4,2; bei einem pH-Wert über diesem Punkt dissoziieren die Säuregruppen des Enzyms, die Summenladung des Moleküls wird negativ. Somit steigt die Tendenz, von einer positiv geladenen Oberfläche angezogen zu werden.

Im Fall von HD-Beschichtungen, die funktionelle Gruppen enthalten, treten ebenfalls solche Säure-Base-Reaktionen zwischen der flüssigen Umgebung und diesen Gruppen auf [180]. So kommt es in wässrigen Lösungen zur oben erwähnten Dissoziation eines Protons, wodurch die Oberfläche mit einer negativen Ladung zurückbleibt. Bei basischen Gruppen kommt es zur Protonierung und damit zu einer positiven Oberflächenladung. Dieses Ladungsverhalten an der

Fest-Flüssig-Grenzfläche stellt somit das im theoretischen Teil (siehe Abschnitt 3.2.2) dieser Arbeit beschriebene elektrische Potential an der Scherebene dar, die eine stationäre und eine bewegliche Ladungsschicht trennt.

Der pH-Wert einer Lösung ist maßgebend für Säure-Base-Reaktionen und damit der wichtigste Zetapotential-beeinflussende Parameter. In Abbildung 21 sind die Zetapotentialmessungen der verschiedenen HD-Hydrogele in Abhängigkeit des pH-Wert dargestellt. Wie zuvor in den IR-Spektren gezeigt, enthalten die Hydrogelbeschichtungen funktionelle Aminogruppen, welche protoniert und deprotoniert werden können. Bei HD14-Schichten werden die tertiären Aminogruppen bei niedrigeren pH-Werten unterhalb des pK_a -Werts von 7,3 [15-17] protoniert, was positive Zetawerte zur Folge hat, bis der IEP von $6,4 \pm 0,3$ erreicht ist. Bei HD11 werden aufgrund des niedrigeren DEAEMA-Gehalts bereits ab pH 6 negative Zeta-Werte erreicht, der IEP liegt bei $5,2 \pm 0,4$. Noch deutlicher ist dieser Trend bei HD41-Schichten zu beobachten. Der Grad an Ionisation ist hier aufgrund des noch geringeren DEAEMA-Anteils am geringsten. Dies führt über einen breiten pH-Wertbereich von 9–5 zu negativen Zetapotentialen und der isoelektrische Punkt liegt bei 4,5. Positive Zetawerte wurden für HD41 nur bei einem pH-Wert von 4 erreicht, mit jedoch wesentlich geringeren Werten als bei den Hydrogelen HD11 und HD14.

Bei Materialien ohne funktionelle Gruppen auf der Oberfläche, wie beispielsweise Glas, kommt es durch die physische Adsorption von Wassermolekülen trotzdem zur Ausbildung von Zetapotentialen und damit zu einer Grenzflächenladung. Die Oberflächen verhalten sich hydrophob, verdrängen Wassermoleküle und ziehen negativ geladene Ionen (OH^-) an. Es gibt verschiedene Ansätze, die dieses Verhalten erklären. Einerseits gibt es die Argumentation, dass OH^- -Ionen sich eher hydrophob verhalten als Hydroniumionen (H_3O^+) und Wasser, weshalb diese die Wassermoleküle an der hydrophoben Oberfläche substituieren [107]. Andererseits heißt es, dass Polarisierungseffekte der Oberfläche dazu führen, dass sich die Wassermoleküle eher sauer verhalten [107]. Da die unbeschichteten Objektträger aus Glas negative Zetapotentialwerte aufweisen, wurde somit bestätigt, dass die plasma-polymerisierten Hydrogele mit funktionellen Gruppen ausgestattet sind, die protoniert/deprotoniert werden und somit von Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten beeinflusst werden können. Basierend auf diesen Ergebnissen kann, je nach Mischungsverhältnis, der Zetapotentialwert eingestellt und optimiert werden und an die funktionellen Anforderungen eines Biosensors angepasst werden.

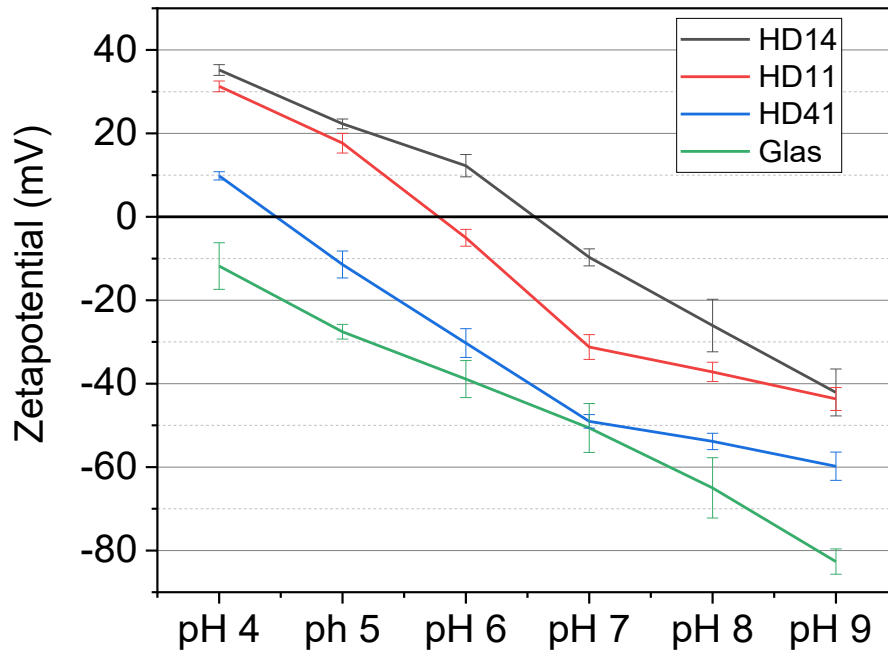


Abbildung 21: Zetapotentiale der verschiedenen Hydrogelmischungen und Glas als Referenzsubstrat, gemessen im Bereich von pH 4 bis pH 9.

5.1.7 Zusammenfassung Teil 1

Im ersten Teil der hier vorliegenden Arbeit konnten mittels Atmosphärendruck-Plasmajet Hydrogelschichten aus unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der Monomere HEMA (2-Hydroxyethylmethacrylat) und DEAEMA (Methacrylsäure-2-diethylaminoethylester) copolymerisiert werden. Der neuartige Herstellungsprozess bietet viele Vorteile gegenüber konventionellen und anderen plasmagestützten Methoden: von der einfachen Handhabung des Prozesses im Atmosphärendruckbereich, ohne mehrstufige Vorbereitung, ohne Beschädigung des Substrates und ohne Verwendung zusätzlicher Chemikalien, zur simultanen Oberflächenstrukturierung für mögliche Sensoranwendungen. Das Depositionsprofil ergab einen durchschnittlichen Durchmesser von 8 mm, sodass mit diesen Schichten beispielsweise herkömmliche Goldelektroden (z. B. DropSense von Metrohm) mit einem Durchmesser von 4 mm beschichtet werden können. Mit dem kleinstmöglichen Tropfenvolumen von 0,1 µl einer kommerziellen Pipette wurden Schichtdicken von einigen hundert nm bis ~1,5 µm gemessen. FT-IR- und XPS-Ergebnisse zeigten, dass die Hydrogele erfolgreich mittels Plasma polymerisierten und mit sauerstoff- und stickstoffhaltigen funktionellen Gruppen für die Biomolekülanbindung ausgestattet sind. Die Schichten sind dabei gekennzeichnet durch eine gute Stabilität nach der Abscheidung sowie nach 24-stündiger Lagerung in Wasser. Sowohl Elementanteile als auch funktionelle Gruppen weisen keine nennenswerten Änderungen auf. Die morphologischen Untersuchungen brachten ein charakteristisches Faltenmuster auf der Oberfläche der Hydrogele hervor, welche durch Oberflächeninstabilitäten während des Herstellungsprozesses entstanden sind. Die Faltenwellenlänge und -amplitude stehen dabei im engen Zusammenhang mit den unterschiedlichen Anteilen an HEMA und DEAEMA in den Mischungen sowie den sich daraus ergebenden unterschiedlichen Schichtdicken: Je weniger HEMA, desto feiner und weniger ausgeprägt sind die Faltenstrukturen. Neben den Falten entstanden nach der Lagerung in Wasser Blasenstrukturen, welche eine Folge des Herauswaschens nicht polymerisierter Monomereinheiten sind. In diesem Zusammenhang wurde nach dem Eintauchen in Wasser ein Massenverlust für alle Schichten von ca. ~30 % festgestellt, die Gesamtschichtdicke änderte sich dabei jedoch nicht. Da die Hydrogelschichten mit funktionellen Gruppen ausgestattet sind, unter anderem tertiären Aminogruppen, welche in Abhängigkeit des pH-Wertes protoniert und deprotoniert werden können, entstehen Oberflächenladungen bei unterschiedlichen Bedingungen. Die chemischen und physikalischen Eigenschaften der Hydrogelschichten können demnach in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses eingestellt werden.

5.2 Teil 2: Untersuchungen zur Topographie und Grenzflächenwechselwirkungen plasma-polymerisierter Hydrogelschichten auf Goldelektroden

Die Schichtzusammensetzung, die Morphologie und die pH-abhängigen Oberflächenladungen der abgeschiedenen Schichten wurden auf den glatten Si-Wafern hinreichend untersucht und damit ein grundlegendes, physikochemisches Verständnis der plasma-polymerisierten Hydrogele geschaffen. Im Hinblick auf eine Funktionsschicht für Sensoranwendungen wurden die Hydrogelschichten auf Goldelektroden transferiert und untersucht. Goldelektroden gelten in der Biosensorik aufgrund ihrer Biokompatibilität als Modellsubstrate für Molekülanbindungen. Außerdem weisen Goldsubstrate eine gute elektrische Leitfähigkeit und elektrokatalytische Aktivität auf. Dadurch wird ein effizienter Elektronentransfer ermöglicht und (enzymatische) Reaktion können präzise detektiert und kontrolliert werden. Für die Konditionierung mit Proteinen, Ionen, Zuckern und Lipiden als Funktionsschicht beispielsweise, oder für die direkte Immobilisierung, müssen die Oberflächeneigenschaften der Hydrogele auf den Goldelektroden charakterisiert werden, um die Sensitivität und Funktionalität herausstellen zu können. Im zweiten Teil der Ergebnisdarstellung und Diskussion werden daher weitere Grenzflächenuntersuchungen auf mit Hydrogelen beschichteten Goldelektroden vorgenommen. Der Fokus liegt hierbei auf der pH-Abhängigkeit der Hydrogele, charakterisiert durch das Benetzungsverhalten, die Topographie und das elektrochemische Ansprechverhalten.

5.2.1 Oberflächenenergie und Benetzbarkeit

Ein wichtiges Kriterium, um die plasma-polymerisierten Beschichtungen hinsichtlich biologischer oder medizinischer Anwendung zu beurteilen, ist die freie Oberflächenenergie und daraufhin die Benetzbarkeit. Die Oberflächenhydrophilie beispielsweise ist ein bedeutender Faktor, der die Biokompatibilität von Biomaterialien bestimmt und direkt abhängig von der Oberflächenenergie ist.

Polymersysteme und Hydrogele können ihre Löslichkeit, Volumen, Konfiguration und Konformation durch Änderungen des externen pH-Werts reversibel verändern. Das Verständnis und die Herstellung solcher funktionalen Oberflächen mit pH-gesteuerter Benetzbarkeit und Wasseraufnahme, die bei Bedarf kontrollierbar verändert und angepasst werden können, haben beispielsweise in der Mikro-/Nanofluidik [181], der Bioimmobilisierung [182] oder im Bereich der Antifouling-Oberflächen [183] eine große Bedeutung.

Zur Berechnung der freien Oberflächenenergie wurde die Methode von Owens, Wendt, Rabel und Kaelble [25] verwendet. Dabei wird in eine polare und eine disperse Komponente unterteilt. In der Literatur wird berichtet, dass eine höhere Oberflächenenergie (~ 57 mN/m, [184, 185]) sich positiv auf die Interaktion zwischen Implantatoberfläche und biologischer Umgebung auswirken kann [185]. Der gleiche Effekt zeigt sich bei der Zellausbreitung auf Substraten mit hoher Oberflächenenergie [184].

Abbildung 22 zeigt die verschiedenen Hydrogele mit ihren Oberflächenenergien direkt nach der Abscheidung und nach der Lagerung in Wasser. Bei den Messungen direkt nach der Abscheidung ist kein Trend erkennbar und die Oberflächenenergien schwanken zwischen 45–61 mN/m, was vermutlich an den unpolymerisierten, noch nicht abgewaschenen Polymerfragmenten liegt, wie in Abschnitt 5.1.3 diskutiert. Nach Lagerung in Wasser wurde für HD11 und HD41 ein Anstieg der freien Oberflächenenergie beobachtet, insbesondere für den polaren Anteil. Dies kann durch den Einbau polarer Gruppen (-OH) in die pp-Hydrogelfilme während des Eintauchens in Wasser erklärt werden, was zu einem erhöhten polaren Anteil führt [163]. Für HD14 wurde dagegen keine Veränderung in der Oberflächenenergie festgestellt. Weiterhin dominiert der polare Anteil im Vergleich zu seinem dispersiven Anteil in allen HD-Mischungen. Diese Beobachtung ist zu erwarten, da die Hydrogele mit hydrophilen, funktionellen Hydroxyl- und (tertiären) Aminogruppen ausgestattet sind. Für alle untersuchten HD-Mischungen liegt die freie Oberflächenenergie zwischen 55 und 61 mN/m nach dem Eintauchen, was in Übereinstimmung mit Literaturwerten für HEMA-basierte Hydrogele liegt [186]. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Hydrogele aufgrund ihrer vergleichsweise hohen polaren Anteile eine hohe Oberflächenenergie besitzen. Diese Oberflächeneigenschaft kann, wie eingangs in Kapitel 3.2.1 beschrieben, wichtig für die Interaktion mit Biomolekülen sein.

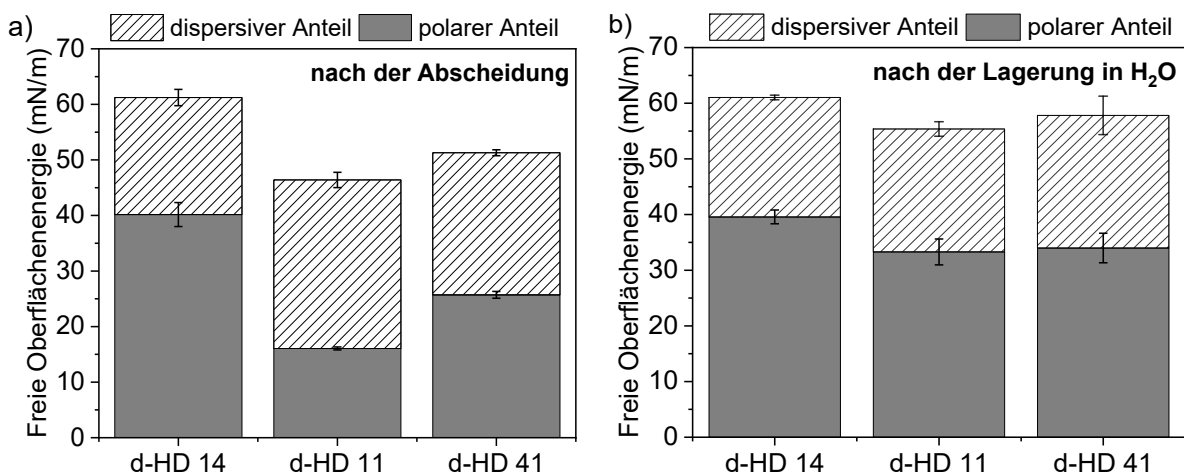


Abbildung 22: Freie Oberflächenenergie der Hydrogele, eingeteilt in polare und disperse Anteile a) direkt nach der Abscheidung, b) nach der Lagerung in Wasser für 24 h.

Weiterhin wurde auf den mit Hydrogelen beschichteten Goldelektroden das pH-Ansprechverhalten getestet. Dafür wurden Messungen der freien Oberflächenenergie der HD-Beschichtungen durchgeführt, die 24 h in Pufferlösungen von pH 4, 7 bzw. 10 gelagert wurden [187]. Kleine pH-Änderungen können zu einer signifikanten Änderung der räumlichen Anordnung in den Polymernetzwerken führen [187]. Bei kationischen Polymereinheiten wie dem DEAEMA führt ein pH-Wert, der geringer ist als der pK_a -Wert von 7,3 [15-17], zu einer Protonierung der tertiären Aminogruppen. Aufgrund der Bildung positiver, fixierter elektrischer Ladungen, die sich gegenseitig abstoßen, ändert sich die Konformation des Netzwerks und die Maschenweite wird größer. Daher kann durch Zugabe des pH-responsiven Monomers DEAEMA zu dem herkömmlichen HEMA ein pH-abhängiges Verhalten des Hydrogels eingestellt werden.

In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass der polare Anteil (in dunkelgrau dargestellt) aller untersuchten HD-Filme bei pH 4 und 7 zunimmt. Durch die oben beschriebene Konformationsänderung sind die polaren Gruppen des inneren Netzwerks leichter zugänglich, was eine stärkere Aufnahme von polaren Lösungen (wie Wasser und Ethylenglykol) ermöglicht. Daher sind die Kontaktwinkel der verwendeten Flüssigkeiten kleiner, was zu höheren polaren Anteilen führt [27, 188]. Bei pH 10 wird DEAEMA deprotoniert und die Maschenweite des Hydrogels verengt sich. Daraus folgt, dass die Beschichtungen hydrophober werden, mit geringeren polaren Anteilen. In der Literatur gibt es vergleichbare Arbeiten mit ähnlichen Beobachtungen, so wird über Superhydrophilie bei niedrigen pH-Werten und über Superhydrophobie bei höheren pH-Werten von Acrylatoberflächen in der Arbeit von Stratakis et al. [189] berichtet. Die Ergebnisse bestätigten, dass die durch den Atmosphärendruck-Plasmajet erzeugten, copolymerisierten Hydrogelschichten, ebenso wie die konventionell erzeugten, ein pH-responsives Verhalten zeigen. Somit können die Hydrogele auf den Goldelektroden als Funktionsschicht aufgebracht und beispielsweise als Aktoren/Mikroventile in der Mikrofluidik eingesetzt werden [190].

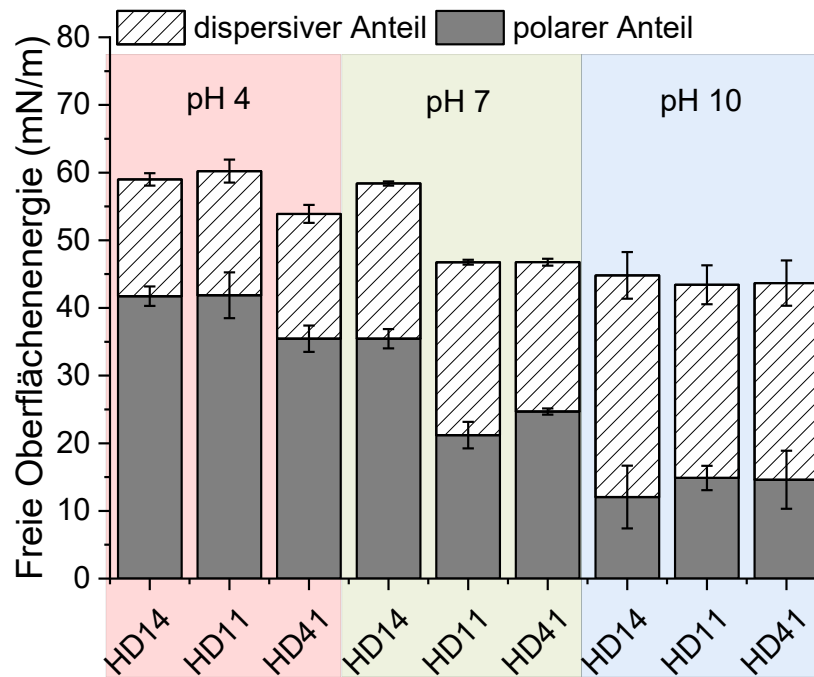


Abbildung 23: Freie Oberflächenenergie der in verschiedenen pH-Lösungen gelagerten HD-Filme ($n=3$).

Für die Beurteilung der Benetzung auf den plasma-polymerisierten Hydrogelen wurden die Wasserkontaktwinkel mittels der Methode des liegenden Tropfens bestimmt. Um darüber hinaus das Antwortverhalten in verschiedenen pH-Bereichen zu ermitteln, wurden nach einer Methode von Wang et al. [187] die Hydrogelschichten für 24 h in neutralen (pH 7), sauren (pH 4) und alkalischen (pH 10) Pufferlösungen gelagert, danach getrocknet und anschließend der Kontaktwinkel gemessen (siehe Tabelle 4).

Eine unbeschichtete Goldelektrode zeichnet sich durch eine hydrophobe Oberfläche mit einem Wasserkontaktwinkel von $\sim 94^\circ$ aus; die aus verschiedenen pH-Lösungen getrockneten Hydrogelschichten auf den Goldelektroden zeigen Kontaktwinkel im Bereich von 36° bis 77° nach dem Trocknen von pH 4 bzw. pH 10. Dabei konnte für alle Hydrogelmischungen ein Anstieg des Kontaktwinkels mit zunehmenden pH-Wert ermittelt werden. Dieser Trend in der Benetzbarkeit von einer sehr hydrophilen zu einer eher hydrophoben Oberfläche hängt ebenfalls mit der pH-abhängigen Konformationsänderung zusammen. In der Literatur wird erwähnt, dass eine pH-Erhöhung eine Abnahme der durchschnittlichen Ladung pro Segment bewirkt, wodurch sich ein eher hydrophobes Benetzungsverhalten einstellt, ausgelöst durch eine sogenannte „kollabierte“ Struktur im Polymer [27, 191]. Des Weiteren führt ein niedriger pH-Wert dazu, dass sich das Polymergerüst ausdehnt (Konformationsänderung), was die Aufnahme größerer Wassermengen ermöglicht und wiederum zu kleineren Wasserkontaktwinkeln führt [77, 188]. Im Speziellen zeigt die Hydrogelmischung HD14 die geringsten Kontaktwinkel bei niedrigem pH-Wert

sowie die größten Kontaktwinkel bei einem pH-Wert von 10. Dies wird durch den höheren Anteil an ionisierbaren Gruppen in der Mischung verursacht. So stellen sich bei der Hydrogelmischung HD41 im Vergleich höhere Kontaktwinkel bei niedrigem pH-Wert und andersrum niedrigere Kontaktwinkel bei pH 10 ein. Die Ergebnisse korrelieren mit den Oberflächenenergiewerten und bestätigen, dass höhere polare Anteile in Abhängigkeit vom pH-Wert eine höhere Hydrophilie bzw. eine stärkere Benetzung zur Ursache haben. Daraus ergibt sich, dass durch die Schichtzusammensetzung die Oberflächenenergie und damit die Benetzung verändert werden kann.

Tabelle 4: Wasserkontaktwinkel der plasma-polymerisierten Hydrogele nach Eintauchen in Pufferlösungen von pH 4, 7 und 10 für die verschiedenen HD-Mischungsverhältnisse (n=3).

	d-HD14	d-HD11	d-HD41
pH 4	$36^\circ \pm 5^\circ$	$42^\circ \pm 5^\circ$	$43^\circ \pm 5^\circ$
pH 7	$43^\circ \pm 5^\circ$	$53^\circ \pm 1^\circ$	$56^\circ \pm 2^\circ$
pH 10	$77^\circ \pm 5^\circ$	$68^\circ \pm 4^\circ$	$63^\circ \pm 3^\circ$

5.2.2 pH-abhängige Topographie

Die Oberflächenenergien und das Benetzungsverhalten haben gezeigt, dass die plasma-polymerisierten Hydrogelschichten in der Lage sind, wässrige Lösungen mit unterschiedlichen pH-Werten zu absorbieren bzw. zu desorbieren, aufgrund einer veränderten Konformation des Polymernetzwerkes. Daraus ergibt sich, dass sich die Mikrostrukturen auf der Oberfläche in wässriger Umgebung ebenfalls ändern könnten. Aus den vorangegangenen topographischen Untersuchungen auf den Si-Wafern (Abschnitt 5.1.5) wurden Falten auf den Oberflächen der Hydrogele festgestellt, welche die Biokompatibilität und Immobilisierung von Biomolekülen verbessern sowie die analytische Sensitivität in Sensoren steigern können [57, 58, 192]. Die Gründe sind zum einen die Vergrößerung des Verhältnisses von Oberfläche zu Volumen und zum anderen eine verbesserte Zugänglichkeit zum Analyt bzw. Substrat [193]. Um die Topographie und die Änderung der Oberflächenmerkmale in wässriger Umgebung zu untersuchen, wurden pH-abhängige AFM-Analysen durchgeführt. Dafür wurden die Hydrogele auf den Goldelektroden zunächst ohne Flüssigkeiten (d. h. an der Luft) untersucht und im Anschluss in Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert betrachtet (beschrieben in Kapitel 4.2.3). Zum Vergleich sind zunächst die topographischen Gegebenheiten und das Höhenprofil einer unbeschichteten Goldelektrode in Abbildung 24 dargestellt, die Rauheit (R_q) beträgt $0,89 \pm 0,02 \mu\text{m}$.

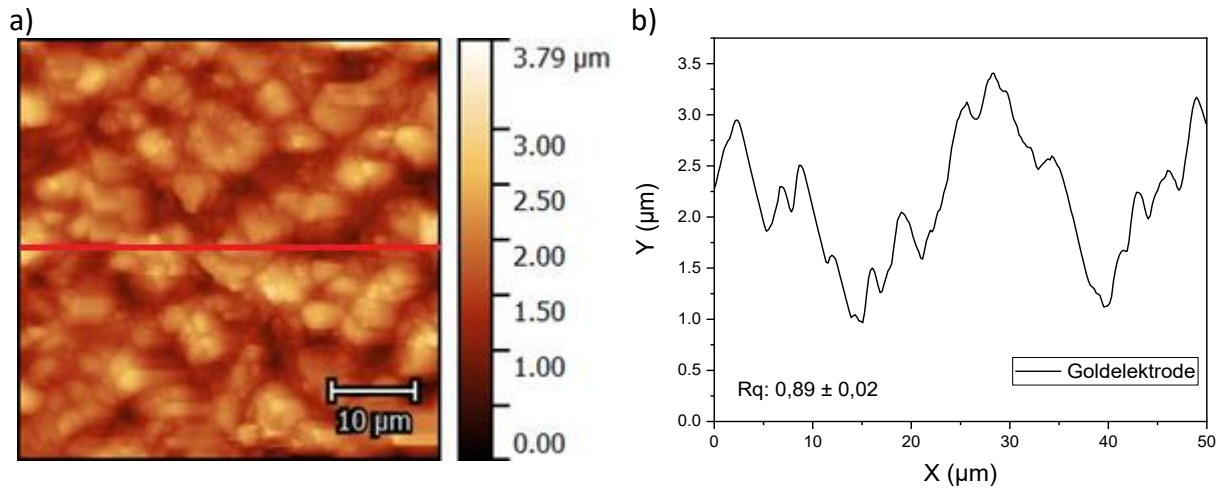


Abbildung 24: Topographie (a) und Höhenprofil (b) einer unbeschichteten Goldelektrode. Die rote Linie zeigt die Position des Höhenprofils an.

Mit den Hydrogelfilmen auf der Goldelektrode ändert sich die Topographie auf der Goldelektrode (siehe Abbildung 25). Durch den Plasmapolymersationsprozess wird die Goldoberfläche mit den verschiedenen Hydrogelen überdeckt und die Zwischenräume werden „aufgefüllt“. Auf den Goldelektroden nehmen die Falten eine andere Form an als auf den glatten Si-Wafern. Dies ist zum einen durch die höhere Rauheit der Goldelektrode (R_q : 890 nm) im Vergleich zum Si-Wafer (R_q : 2 nm) zu erklären und zum anderen werden unterschiedliche Bindungen auf den Substraten eingegangen, welche die Faltenformationen beeinflussen können. Im Vergleich zur unbeschichteten Goldelektrode (siehe Abbildung 24) zeigen die Beschichtungen eine unregelmäßige hügelige und wellige, kissenartige Struktur. Bei HD14 (siehe Abbildung 25 a) sind die Falten nicht stark ausgeprägt, gleichzeitig weist die Oberfläche glatte Bereiche auf, die Faltenstrukturen von HD11 (siehe Abbildung 25 b) und HD41 (siehe Abbildung 25 c) erscheinen dagegen dichter gepackt [77, 194]. Die Rauheitsmessungen ergaben darüber hinaus, dass die Rauheit bei allen Hydrogelbeschichtungen abnimmt (siehe Tabelle 5). Die Beschichtungen haben also einen glättenden Effekt auf die Oberfläche und Unregelmäßigkeiten werden abgedeckt. Die Höhenprofile unter den AFM-Aufnahmen weisen ebenfalls Unterschiede auf. So sind die Höhenunterschiede der Oberflächenmerkmale bei HD14 am stärksten und mit zunehmendem HEMA-Anteil geringer werdend, da die Falten an Kompaktheit zunehmen. Wie zuvor erwähnt, gilt HEMA als „rückgratbildende“ Einheit von Hydrogelen [13, 173], sodass die Zugabe von mehr HEMA in der Mischung (bei konstanten Prozessparametern) auch auf den Goldelektroden zu einer stärkeren Faltenbildung führt [173, 194]. Diese Ergebnisse korrelieren ebenfalls mit den Schichtdickenmessungen (siehe Tabelle 3).

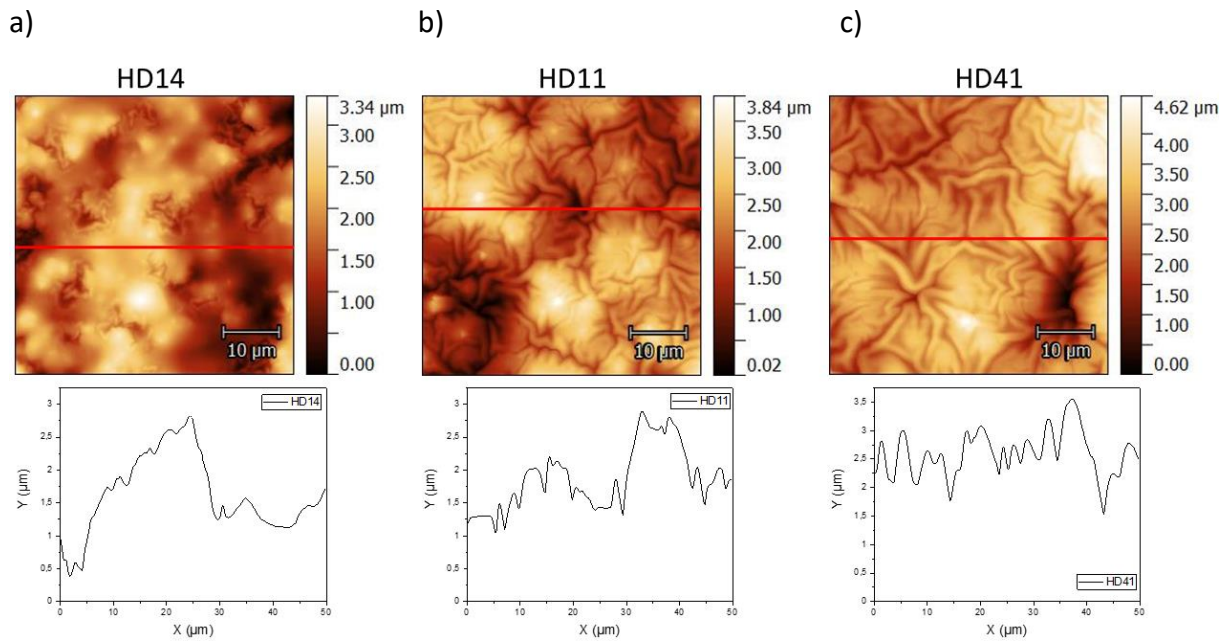


Abbildung 25: AFM-Aufnahmen mit den entsprechenden Höhenprofilen der plasma-polymersierten Hydrogelbeschichtungen a) HD14, b) HD11 und c) HD41 auf Gold-elektroden an Luft. Die roten Linien zeigen die Position des Höhenprofils an.

Tabelle 5: Mittlere quadratische Oberflächenrauheiten (R_q) von Hydrogelen an Luft und in verschiedenen Pufferlösungen mit einer unbeschichteten Goldelektrode als Referenz ($n=3$).

	Luft	pH 4	pH 7	pH 10
HD14 (μm)	0.67 ± 0.05	1.08 ± 0.2	0.65 ± 0.02	0.83 ± 0.04
HD11 (μm)	0.69 ± 0.05	0.73 ± 0.05	0.78 ± 0.05	1.25 ± 0.20
HD41 (μm)	0.68 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.79 ± 0.09	1.36 ± 0.24
Goldelektrode (μm)	0.89 ± 0.02			

Das Eintauchen der mit dem Hydrogel beschichteten Goldelektroden in Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten führte zu verschiedenen Erkenntnissen über die pH-abhängige Topographie der Hydrogele, die nachfolgend aufgezeigt werden. Bei der Mischung HD14 traten dabei die stärksten Veränderungen auf (siehe Abbildung 26). Im pH-Bereich unterhalb des pK_a von DEAEMA nimmt die Struktur eine blasenartige Gestalt an, zudem nimmt die Höhe der Oberflächenmerkmale stark zu, von $\sim 3 \mu\text{m}$ im trockenen Zustand auf 8 und $5 \mu\text{m}$ bei pH 4 und pH 7. Die tertiären Aminogruppen von DEAEMA werden in wässrigen Medien mit diesen pH-Werten protoniert und nehmen eine gestreckte Konformation an [195-197]. Damit verbunden ist eine höhere Absorption von Flüssigkeiten, wie im Abschnitt 5.2.1 unter Benetzung und Oberflächenenergie erläutert. Die Blasenstruktur bestätigt die Annahmen der mikroskopischen Aufnahmen

(siehe Abbildung 18), dass die Verteilung der Blasenstruktur zufällig auf der Oberfläche erfolgt. Diese Indizien belegen den Zustand einer gequollenen Hydrogelbeschichtung. Die Rauheitsmessungen zeigen ebenfalls diesen Trend (siehe Tabelle 5). So konnte eine erhöhte Rauheit der gequollenen Struktur unter pH 4 festgestellt werden, mit einem Wert von $1.08 \pm 0.21 \mu\text{m}$. Jedoch kommt hier eine hohe Standardabweichung zustande, da die gequollenen Blasenstrukturen, wie in Abschnitt 5.1.4 erwähnt, zufällig auf der Oberfläche verteilt werden. Bei pH 7 nähert sich die Rauheit den Werten der Proben im trockenen Zustand an. Die Blasenstruktur ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei pH 4 und hat damit womöglich keinen stärkeren Effekt auf die Rauheit. In der Literatur wird von einem „Zwischenzustand“ gesprochen, in dem der Grad an ionisierten, tertiären Aminogruppen im nahen Bereich des pK_a -Werts geringer ist. HD14 zeigt unter pH 7 demnach eine nicht so stark gequollene Struktur [27, 197]. Unter dem Einfluss von pH 10 werden die Oberflächenstrukturen der HD14-Beschichtung kleiner und es treten wieder deutlichere Faltenmuster auf, ähnlich dem trockenen Zustand. Außerdem ist der R_q mit $0,83 \pm 0,04 \mu\text{m}$ höher als bei pH 7 und niedriger als bei pH 4 (siehe Tabelle 5). Durch die Deprotonierung der tertiären Aminogruppen kommt es zum „Kollabieren“ der Strukturen, die Blasen schrumpfen. Neue Faltenstrukturen werden gebildet und die Oberfläche erscheint dadurch rauer als bei pH 7.

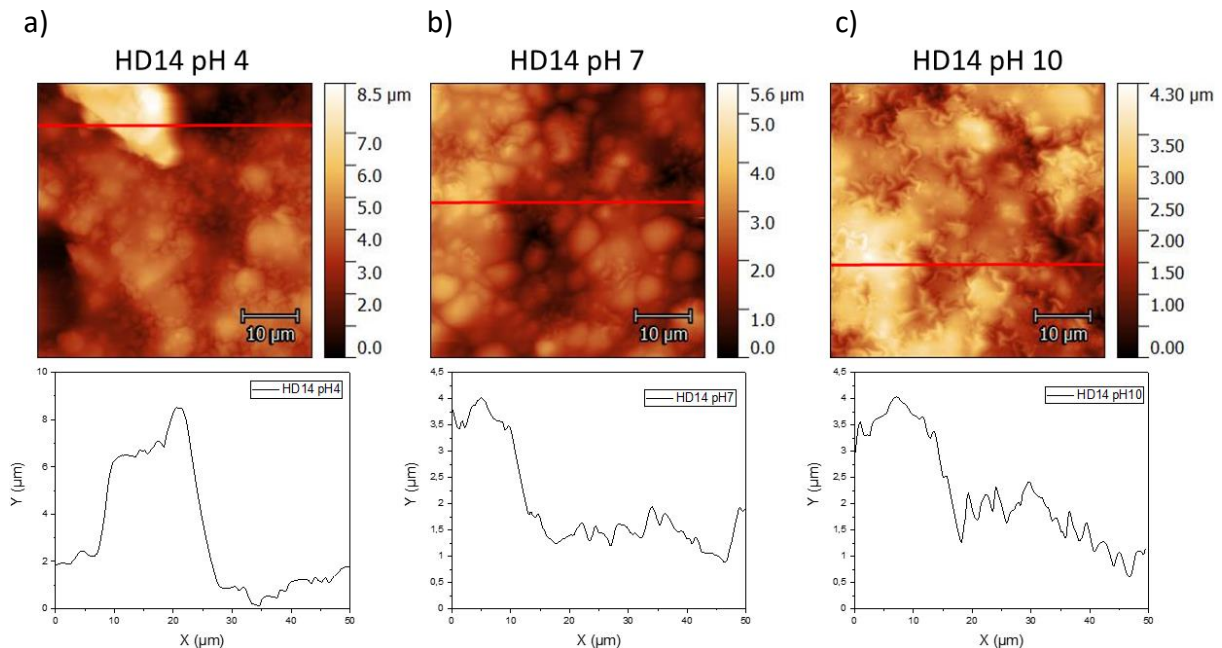


Abbildung 26: AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhenprofile der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtung **HD14** auf Goldelektroden in a) saurer (pH 4), b) neutraler (pH7) und c) alkalischer (pH 10) Lösung. Die roten Linien zeigen die Position des Höhenprofils an.

Bei den Beschichtungen HD11 und HD41 ist der DEAEMA-Anteil geringer, dadurch ist auch der Ionisationsgrad geringer, was Auswirkungen auf die Topographie hat. Zunächst erfolgt die Betrachtung für HD11 (siehe Abbildung 27). In den Lösungen mit pH 4 und pH 7 werden die Oberflächenmerkmale größer ($4,5 \mu\text{m}$) im Vergleich zum trockenen Zustand ($3,8 \mu\text{m}$), dennoch sind keine Blasenstrukturen erkennbar, sondern die oben beschriebenen welligen, kissenartigen Strukturen. Die Rauheit der Oberflächen steigt an, bleibt aber bei einem ähnlichen Wert wie im trockenen Zustand. Der geringere Ionisationsgrad führt in diesen beiden Fällen zu einem wenig ausgeprägten Quellverhalten. Bei pH 10 steigt die Rauheit der Oberfläche um $\sim 33\%$ an, was auf stark geschrumpfte Strukturen hindeutet. Ein Grund dafür könnte sein, dass bei fehlender Protonierung der DEAEMA-Anteile und gleichzeitiger Ausbildung von Wasserstoffbrücken der OH-Gruppen in den HEMA-Einheiten die Strukturen stärker komprimiert werden. Ähnliche Beobachtungen im Zusammenhang mit der Vernetzung durch Hydroxylgruppen und ein dadurch erzeugtes Zusammenziehen des Polymernetzwerkes wurden auch von Maleki et al. dokumentiert [198].

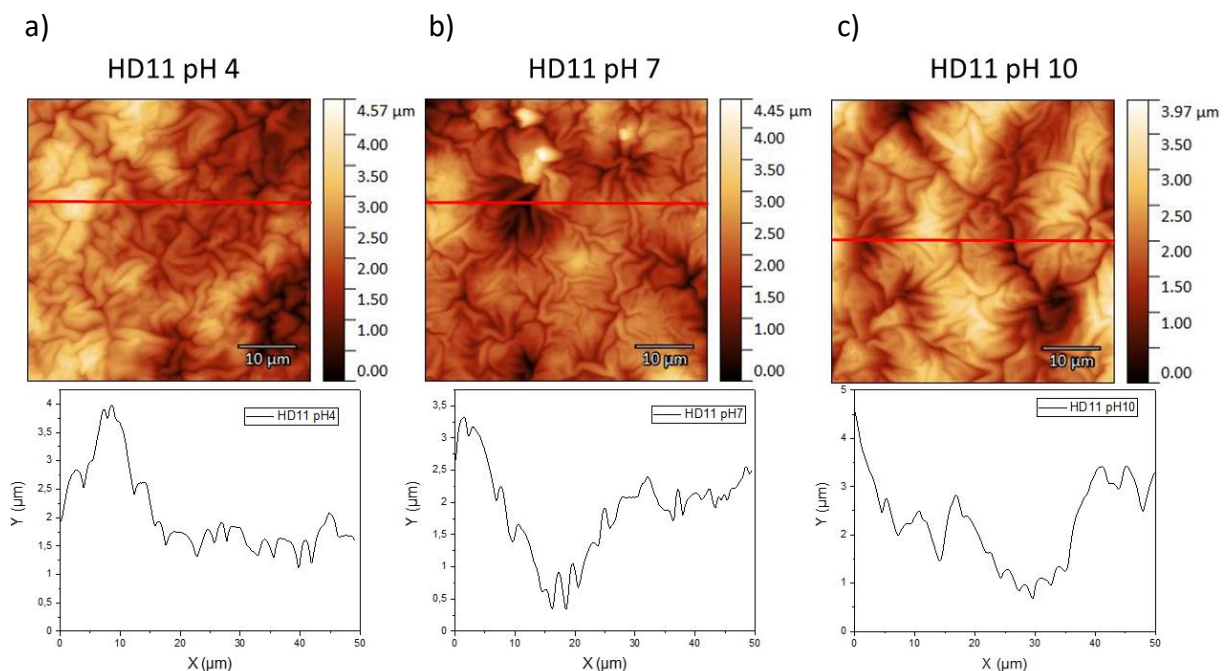


Abbildung 27: AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhenprofile der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtung **HD11** auf Goldelektroden in a) saurer (pH 4), b) neutraler (pH 7) und c) alkalischer (pH 10) Lösung. Die roten Linien zeigen die Position des Höhenprofils an.

In den AFM-Aufnahmen der Beschichtung HD41 ist der Effekt des geringen Ionisationsgrades und das Vorhandensein vieler OH-Gruppen (siehe auch FT-IR Untersuchung Abbildung 13) noch deutlicher erkennbar (siehe Abbildung 28). Die Faltenstrukturen sind kompakter als bei

der Beschichtung HD11. Die Höhe der Oberflächenmerkmale zeigt ähnliche Werte wie die im trockenen Zustand (4–4,5 μm), unabhängig vom pH-Wert. Auch die Rauheiten der Oberflächen steigen an (siehe Tabelle 5), wie bei der Beschichtung HD11. Bei pH 10 zeigt sich ein starker Sprung in der Rauheit von $\sim 0,79 \mu\text{m}$ bei pH 7 auf $\sim 1,3 \mu\text{m}$, der gleiche Trend, der auch bei der Beschichtung HD11 beobachtet wurde. Das Quellen und Schrumpfverhalten der Hydrogele hängt also vom Grad der Ionisierung sowie von der Dichte der Vernetzung ab. Je stärker eine plasma-polymerisierte Hydrogelschicht vernetzt ist und je mehr HEMA-Anteil zugemischt wurde, desto geringer ist demnach die Quellrate [198].

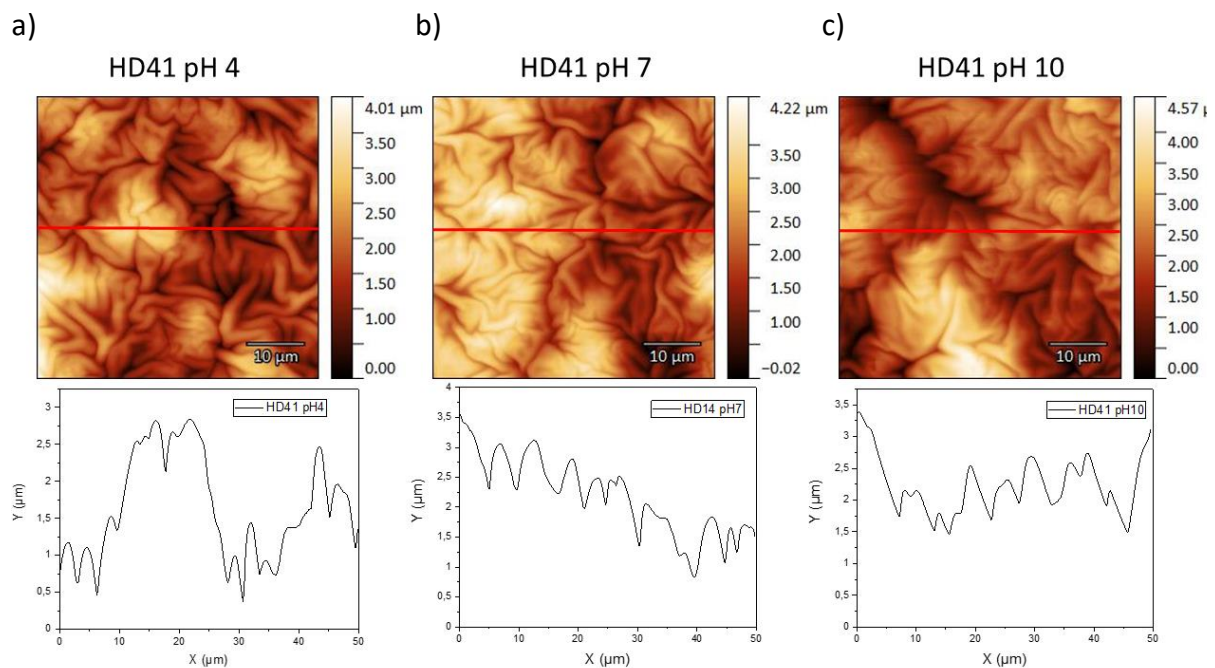


Abbildung 28: AFM-Aufnahmen und die entsprechenden Höhenprofile der plasma-polymerisierten Hydrogelbeschichtung **HD41** auf Goldelektroden in a) saurer (pH 4), b) neutraler (pH7) und c) alkalischer (pH 10) Lösung. Die roten Linien zeigen die Position des Höhenprofils an.

Die Ergebnisse der AFM-Messungen in Flüssigkeiten zeigen deutlich, dass das HD-Mischungsverhältnis auf den Goldelektroden einen direkten Einfluss auf die Topographie und die Höhe der Oberflächenmerkmale hat. Die Reaktion auf die verschiedenen pH-Werte bestätigt nochmals das pH-responsive Verhalten der Hydrogelmischung und die Erkenntnis, dass dieses durch die Zumischung des pH-abhängigen Monomers DEAEMA eingestellt bzw. kontrolliert werden kann. Ähnliche Beobachtungen machten González-Henríquez et al. [77] bei HEMA- und Poly(ethylenglycol)diacrylat (PEGDA)-Hydrogelen, welche durch ein *spin-coating*-Verfahren hergestellt wurden. Durch das Quellen und Schrumpfen bei unterschiedlichen pH-Werten

konnte gezeigt werden, dass die plasma-polymerisierten Hydrogelschichten beispielsweise auch als Funktionsschichten in *drug-delivery*-Systemen Anwendung finden können [199].

5.2.3 Untersuchungen zum elektrochemischen Ansprechverhalten

Für die Entwicklung eines elektrochemischen Sensors ist es wichtig, vorher den Durchtritt der Redoxspezies durch das Hydrogel als Trägerschicht zur Elektrodenoberfläche zu bewerten. In diesen Untersuchungen soll die Frage geklärt werden, ob die Hydrogele in der Lage sind, eine Stromantwort in Abhängigkeit des angelegten Potentials zu geben oder ob sie die Elektrodenoberfläche einfach nur blockieren. Darüber hinaus soll in Flüssigkeiten mit unterschiedlichem pH-Wert überprüft werden, ob Stromantworten durch Quellungs- bzw. Schrumpfeffekte verstärkt bzw. unterdrückt werden können. Ein Anwendungsbereich für Hydrogelschichten stellen implantierbare Biosensoren dar, welche möglichst klein sein sollten und dabei gleichzeitig eine hohe Empfindlichkeit sowie geringe Nachweisgrenzen und Reaktionszeiten aufweisen müssen. Für diesen Einsatzbereich müssen die Elektroden spezielle Geometrien haben, welche hinsichtlich des Einsatzzwecks und -orts angepasst werden müssen. Zu den neusten Entwicklungen gehören unter anderem Mikroscheiben und Mikroquadrate [200]. Ein großes Problem stellen Gewebeeinkapselungen im Körper an diesen Elektroden dar, welche zu einer erhöhten Elektrodenimpedanz führen. Die Konsequenz ist eine höhere Strombelastung zur Kompensation [201]. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass es auch zum Verlust von Neuronen in der Nähe der Elektroden kommt, wodurch wichtige Informationen verloren gehen [201]. Durch Hydrogelschichten auf den Biosensoren können die Gewebereaktionen im Körper und die Elektrodenimpedanz an der Grenzfläche reduziert werden. Einer der Gründe hierfür ist die Minimierung von unspezifischen Proteinadsorptionen, wodurch das Gewebe besser mit der hydrophilen Hydrogeloberfläche in Wechselwirkung treten kann. Zum anderen können Hydrogele Elektronen und Ionen leiten und dadurch den Kontakt zur Arbeitselektrode herstellen, was zur Verringerung der Elektrodenimpedanz führt [201]. Elektrochemische Techniken wie etwa die Cyclovoltammetrie oder die Amperometrie werden aufgrund ihrer Zuverlässigkeit, der direkten Kopplung mit der Mikroelektronik, der erleichterten quantitativen Kontrolle und der einfachen Anbindung an komplizierte Systeme häufig in der chemischen und biochemischen Sensorik verwendet [202].

Da die Eigenschaften eines elektrochemischen Biosensors von der gesamten Messoberfläche abhängen, ist die Vergrößerung der Oberfläche für eine verbesserte analytische Sensitivität ein wichtiger Faktor. Zu diesem Zweck wurden die beschichteten Goldelektroden mittels zyklischer Voltammetrie untersucht, um Informationen über das Durchdringverhalten der elektroaktiven Spezies $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ durch die plasma-polymerisierte Hydrogelschicht zu erhalten. Abbildung

29 A–D zeigt die zyklischen Voltammogramme (CVs) der Hydrogelschichten auf den Gold-elektroden in Gegenwart der redoxaktiven Spezies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (10 mM) sowie in Pufferlösungen mit unterschiedlichen pH-Werten. Für eine bessere Vergleichbarkeit ist die unbeschichtete Goldelektrode als Referenz in Schwarz dargestellt. Die unbeschichtete Goldelektrode weist kein pH-abhängiges Verhalten in Gegenwart von $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (siehe Abbildung 29 A) [203], bei Spitzenströmen von $60 \mu\text{A}$ bzw. $-60 \mu\text{A}$ (anodisch bzw. kathodisch), auf. Die Beschichtung HD14 auf der Goldelektrode hingegen zeigt bei pH 4 (rote Kurve) und pH 7 (grüne Kurve) einen deutlichen Anstieg des reduktiven Peakstroms auf $-100 \mu\text{A}$ (siehe Abbildung 29 B).

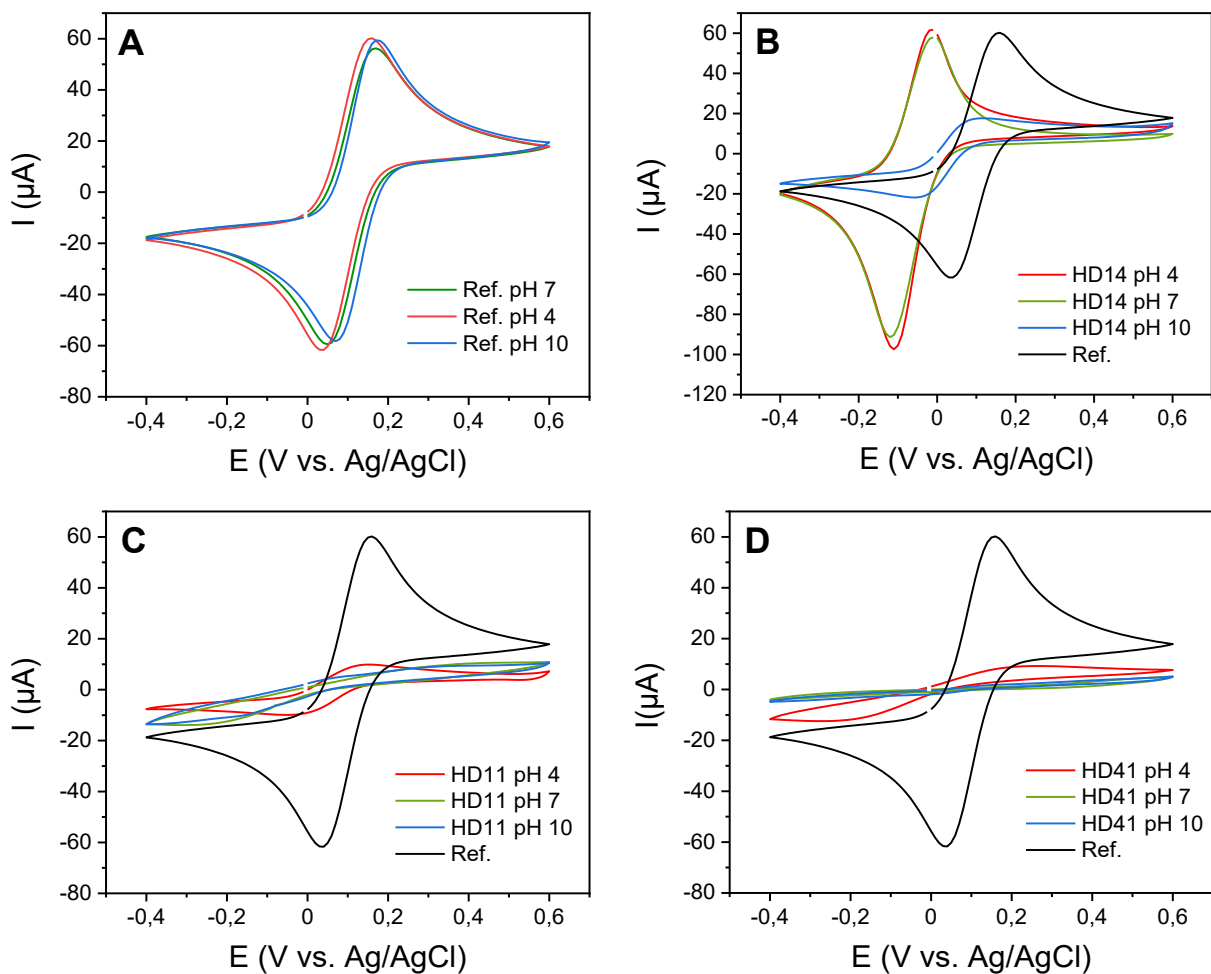


Abbildung 29: Zyklische Voltammogramme. A: $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ an der unbeschichteten Goldelektrode bei Lösungen mit unterschiedlichem pH-Wert (4, 7 und 10). B–D: Die plasma-polymerisierten HD-Filme in Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert (4, 7 und 10).

Dies wird der pH-responsiven Eigenschaft der DEAEMA-Einheiten im Hydrogel zugeschrieben [204-206]. Die gequollene Struktur des HD 14-Polymers mit den positiven Ladungen kann die negativen Spezies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ anziehen, wie durch die Zetapotentialmessungen (siehe Abschnitt 5.1.6) bestätigt wurde. Die reduzierte Spezies $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ kann dabei aufgrund von Brückenprotonen stärker am Polymerrückgrat binden, wodurch es zu einer höheren reduktiven Stromantwort kommt. Dieses Phänomen wurde bei den nass-chemisch hergestellten Polyaminschichten von Wang et al. [207] ebenfalls beobachtet und beschrieben. Darüber hinaus wurde eine Potentialverschiebung von 0,03 V der Referenzelektrode auf -0,12 V auf der mit HD14 beschichteten Goldelektroden detektiert (siehe Abbildung 29 B). Der Grund hierfür ist die Ausbildung eines Donnan-Potentials – auch Membranpotential genannt – zwischen dem Elektrolyten und der abgeschiedenen Hydrogelbeschichtung. Die redoxaktive Spezies hat demnach einen erschwerten Zugang zur Elektrodenoberfläche durch das Hydrogel, um die Elektronentransferreaktion durchzuführen. Dieses elektrische Grenzflächenpotential hängt mit dem Vorhandensein von pH-abhängigen festen Ladungen in der Beschichtung zusammen, wie von Anson [208, 209] und Doblhofer [210, 211] beschrieben. Bei pH 10 kommt es zur Deprotonierung der DEAEMA-Anteile in der Hydrogelschicht, die Peakströme nehmen drastisch ab und erreichen mit 20 μA und -20 μA (anodisch und kathodisch) nur noch ein Drittel der Stromantwort im Vergleich zur Referenz. Die Deprotonierung des DEAEMAs führt zu hydrophoberen Eigenschaften, sodass die elektrostatische Abstoßung zwischen den positiven Ladungen auf den Polymerketten geschwächt wird bzw. vollständig verschwindet. Ohne die protonierten tertiären Amine nimmt die Anziehungskraft der innerhalb des Polymernetzwerkes zu (wie auch in Abschnitt 5.2.2 „Topographie“ beschrieben), sodass sich die Polymerketten verdrillen [198]. Diese kollabierte, geschrumpfte Struktur der HD-Beschichtung bei pH 10 ist weniger flexibel und blockiert die Elektrodenoberfläche. Das Ergebnis ist eine geringere Übertragung der elektroaktiven Spezies durch das Hydrogel auf die Elektrodenoberfläche [195]. In Abbildung 29 C sind die CVs für die Beschichtung HD11 gezeigt. Beobachtet wurde der gleiche Trend wie bei der Beschichtung HD14, jedoch mit auffallend geringerer Stromantwort bei allen pH-Werten. Während die Strompeaks bei pH 4 noch zu sehen sind, sind sie bei pH 7 fast abgeflacht und bei pH 10 nicht mehr messbar. Das Verhalten lässt sich mit dem geringeren DEAEMA-Gehalt und dem damit einhergehenden geringeren Protonierungsgrad erklären. Bei pH 10 wird die Elektrodenoberfläche stark blockiert, sodass fast keine Stromantwort zu beobachten ist. Der Einfluss eines sehr niedrigen DEAEMA-Gehalts (HD41) wird noch deutlicher in Abbildung 29 D, in der nur eine sehr geringe Stromantwort bei pH 4 zu erkennen ist. Dagegen sind bei pH 7 und pH 10 keine Oxidations- und Reduktionspeaks und damit keine Stromantworten beobachtbar.

Die Ergebnisse zeigen, dass durch die Erhöhung des DEAEMA-Gehalts in den Schichten die elektrostatische Adsorption der negativ geladenen Redoxsonde auf dem Hydrogel verstärkt wird, was einen höheren Strom im dazugehörigen CV erzeugt. Insgesamt zeigten die Ergebnisse, dass aufgrund der Quelleigenschaften und der Stromantwort sowie der damit verbundenen, womöglich besseren Zugänglichkeit zu Analyt und Substrat HD14 eine geeignete Funktions- und Immobilisierungsschicht für Biosensoren darstellt.

5.2.4 Herstellung und Untersuchungen dünnerer plasma-polymerisierter Hydrogelschichten

Im theoretischen Teil dieser Arbeit (siehe Abschnitt 3.1.1) wurde erwähnt, dass sich die Antwortrate der Hydrogelschichten für einen Sensor erhöht, je kleiner, dünner und weniger vernetzt das Hydrogel ist [52-54]. Aus diesem Grund wurde auch versucht, dünnere Hydrogelschichten mittels der im experimentellen Teil (siehe Abschnitt 4.1) erwähnten Verneblermethode zu erzeugen. Dabei wurden Depositionsprofile mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 5 mm erhalten (siehe Anhang 3). Für die Schichtdicken wurden Werte im Bereich von 150–600 nm generiert, in Abhängigkeit vom Mischungsverhältnis (siehe Anhang 4). Die Oberflächenstrukturierung in Form von Faltenmustern ist weniger stark ausgeprägt, bei der Schicht HD14 konnten keine Faltenmuster beobachtet werden (siehe Anhang 5). Anhand der FT-IR Untersuchungen (siehe Anhang 6) wurde festgestellt, dass die funktionellen Gruppen den dickeren Schichten ähnlich sind. Ein Rückgang des C=C Peaks bei 1638 cm^{-1} wurde ebenfalls festgestellt. Auffällig war die Einführung eines neuen Peaks bei $\sim 1150\text{ cm}^{-1}$, welcher asymmetrischen C-O-C-Streckschwingungen von Ethergruppen zugeordnet werden kann. Diese wurden vermutlich durch die Reaktionen der Monomere mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) des Plasmas generiert. Die dünneren Schichten wurden dann auf die Goldelektroden aufgebracht sowie Untersuchungen zur Benetzbarkeit (Anhang 7) durchgeführt. Die Schichten zeigten dabei ein ähnliches Verhalten hinsichtlich der Hydrophilie. Für die pH-Abhängigkeit, welche mittels Oberflächenenergiewmessungen durchgeführt wurde, konnten jedoch keine Trends im Vergleich zu den dickeren Schichten festgestellt werden (siehe Abbildung 30).

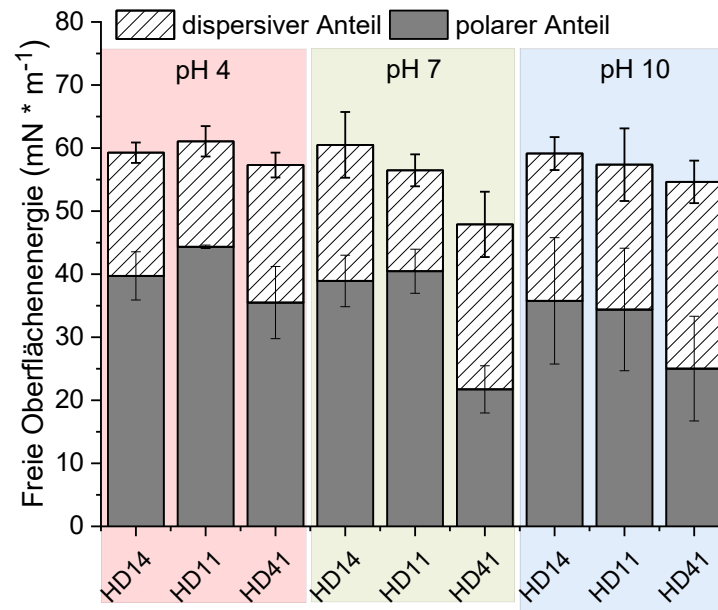


Abbildung 30: Freie Oberflächenenergie der in verschiedenen pH-Lösungen gelagerten HD-Hydrogelen, welche mit der Verneblermethode hergestellt wurden ($n=3$).

Ein weiteres Experiment war die Untersuchung der Stromantwort bei den dünneren plasma-polymerisierten Hydrogelschichten (siehe Abbildung 31 A-C). Der Trend bei unterschiedlichen pH-Lösungen für die Beschichtungen ist derselbe wie für die Hydrogele, welche mit der Tropfenmethode erzeugt wurden, jedoch mit deutlich geringerer Stromantwort. Der Grund dafür könnte ein höherer Polymerisationsgrad der dünneren Beschichtungen bei gleicher Behandlungszeit sein. Dies führt zu einer geringeren Elektronenübertragung und zu einem geringeren Zurückhalten der elektroaktiven Spezies. Das heißt, weniger Monomerlösung und gleichbleibende Polymerisationszeit führen womöglich zu einem höheren Vernetzungsgrad, jedoch zu einer geringeren Funktionalität in Bezug auf die Flexibilität (Quellen/Schrumpfen), wie im theoretischen Teil dieser Arbeit (siehe Abschnitt 3.1.1) beschrieben. Aufgrund des fehlenden pH-abhängigen Verhaltens und der geringen Stromantwort wurden die Versuche mit den dünneren Hydrogelschichten nicht weiterverfolgt.

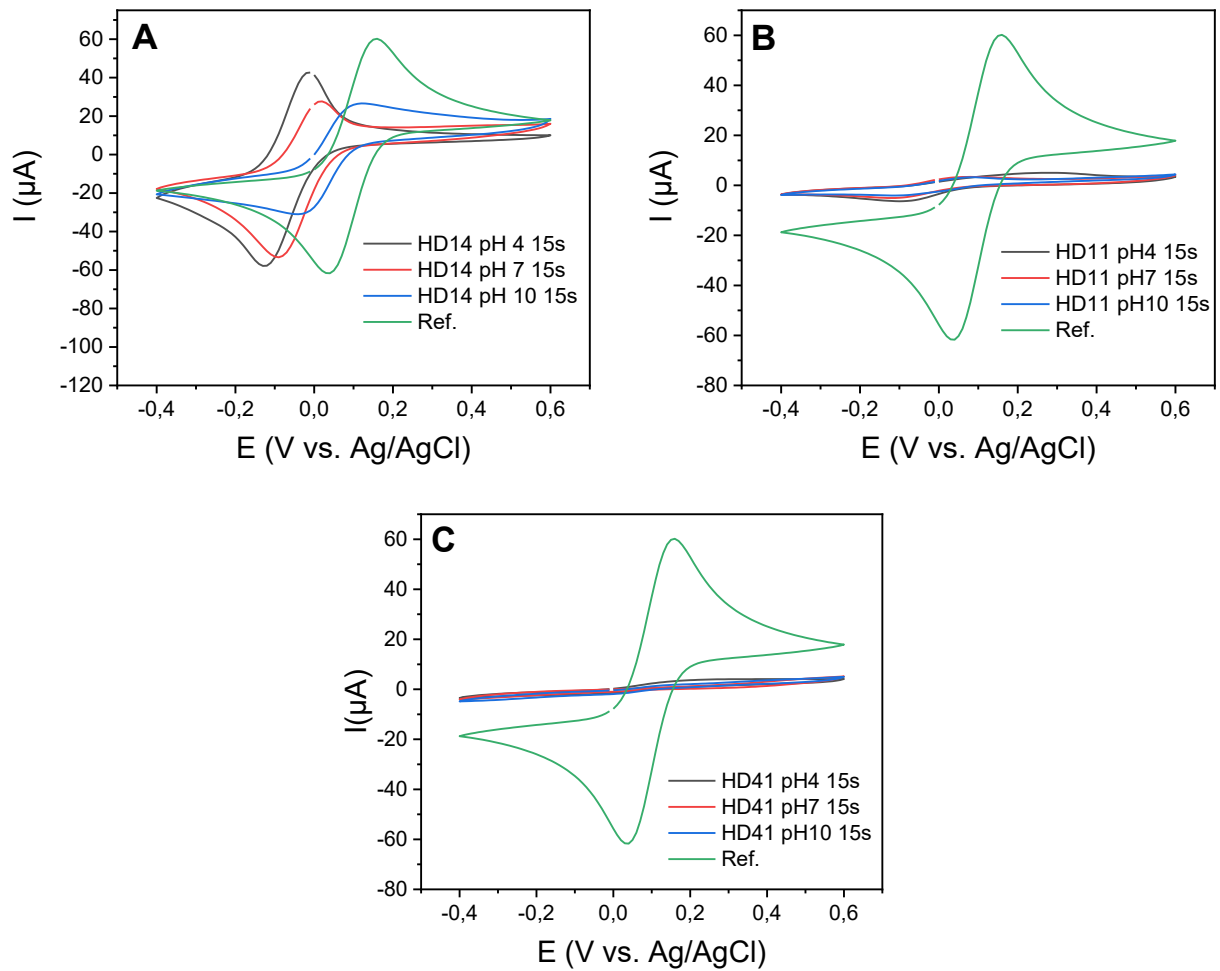


Abbildung 31: Cyclische Voltammogramme (A–C) der dünneren plasma-polymerisierten Hydrogelmischungen (erzeugt durch das Verneblerverfahren) in unterschiedlichen pH-Pufferlösungen (4, 7 und 10), als Referenz wurde die unbeschichtete Goldelektrode vermessen.

5.2.5 Zusammenfassung Teil 2

Mit der Frage, ob die im ersten Teil hergestellten plasma-polymerisierten Hydrogelschichten eine Funktionsschicht für Sensoranwendungen darstellen können, befasste sich der zweite Teil der hier vorliegenden Arbeit. Es erfolgte ein Transfer auf Goldelektroden unter den aus Teil 1 bestimmten Prozessparametern. Zunächst wurden Oberflächenenergien und Benetzungsverhalten bestimmt, um Tendenzen hinsichtlich eines pH-abhängigen Verhaltens und Interaktionsvermögens herauszustellen. Die gemessenen durchschnittlichen Oberflächenenergien von ~ 60 mN/m mit hohen polaren Anteilen von ~ 38 mN/m können sich dabei positiv auf die Wechselwirkung mit einer biologischen Umgebung auswirken. Durch die Protonierung des pH-sensitiven Monomeranteils DEAEMA in den Mischungen bei pH 4 und pH 7 wird eine Konformationsänderung des Polymernetzwerkes hervorgerufen, welche zu einer höheren Flexibilität beiträgt. Daraus resultierte eine bessere Absorption der wässrigen Lösungen. Dies führte zur erhöhten Hydrophilie bei niedrigeren pH-Werten sowie zu hohen polaren Anteilen der pH-abhängigen Oberflächenenergien. Der Effekt des veränderten Polymernetzwerkes wurde auch bei den Topographieuntersuchungen deutlich. Insbesondere bei HD14 wurde ein starker Anstieg in der Höhe der Oberflächenstrukturen bei niedrigen pH-Werten beobachtet, was auf einen gequollenen Zustand hindeutete. Bei HD11 und HD41 war dieser Effekt nicht so stark ausgeprägt, da weniger Protonierung aufgrund des geringeren DEAEMA-Anteils auftritt. Durch die fehlende Flexibilität wurde ein geringeres Absorptionsvermögen der wässrigen Lösungen festgestellt. Mit diesen Informationen konnten elektrochemische Untersuchungen im Hinblick auf die Entwicklung eines Sensors bewertet werden. Es stellte sich heraus, dass der Durchtritt der elektroaktiven Spezies durch die Hydrogele ebenfalls pH-abhängig ist. So konnten bei HD14, aufgrund der gequollenen Struktur, die höchsten Stromantworten bei niedrigen pH-Werten verzeichnet werden. Der Wert der reduktiven Stromantwort stieg von $-60 \mu\text{A}$ (unbeschichtete Goldelektrode als Referenz) auf $-100 \mu\text{A}$. Durch die Vergrößerung der Oberfläche und den positiven Ladungen wurde die negative Redoxspezies stärker angezogen. Hingegen führte ein alkalischer pH-Bereich bei allen Hydrogelschichten zur Blockade der Elektrodenoberfläche, sodass kaum bzw. kein Strom messbar war. Durch die bestätigte pH-Abhängigkeit und die dazugehörigen Stromantworten konnte der Einsatz der Hydrogele als Funktionsschicht bestätigt werden. Der Versuch, dünnere Schichten mit vergleichbarem Verhalten zu erzielen, scheiterte. Die erwähnten Eigenschaften ließen sich nicht nachweisen, sodass die Untersuchungen dahingehend nicht weiterverfolgt wurden.

5.3 Teil 3: Biosensorische Funktionsprüfung

Durch die vorangegangenen Untersuchungen der plasma-polymerisierten Hydrogelschichten auf Silizium und auf den Goldelektroden wurden Trends und charakteristische Merkmale in Bezug auf die Grenzflächeneigenschaften herausgestellt. Die Schichten sind mit sauerstoff- und stickstoffhaltigen, funktionellen Gruppen ausgestattet, welche sich für die Biomolekülanbindung eignen. Darüber hinaus ist die gute chemische Stabilität der Hydrogele wichtig für Wechselwirkungen und Reaktionsprozesse im wässrigen Milieu. Die elektrochemischen Experimente bestätigten pH-abhängige Stromantworten der abgeschiedenen Schichten auf den Goldelektroden. Diese Änderungen können dabei dem unterschiedlichen Gehalt an DEAEMA in den Mischungen zugeschrieben werden. Ferner deuten die Ergebnisse darauf hin, dass das Mischungsverhältnis HD14 aufgrund der Quelleigenschaften eine geeignete Umgebung für die Immobilisierung und Akkumulation von beispielsweise Redoxenzymen darstellen könnte. Aus diesen Gründen wurden die plasma-polymerisierten Hydrogele auf ihre Anwendbarkeit für die Biosensorik getestet. Nachfolgend werden die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der Untersuchungen mit zwei verschiedenen Enzymen – Acetylcholinesterase für eine Inhibitorreaktion mit Eserin und Glucoseoxidase für die Glucosedetektion – dargestellt.

5.3.1 Acetylcholinesterase (AChE)-basierte Biosensorik

Enzyme sind aufgrund ihrer extrem hohen Spezifität die am häufigsten in Biosensoren verwendeten Rezeptormoleküle. Wichtig für die Sensoraktivität ist ein effizienter Elektronentransfer zwischen dem aktiven Zentrum des Enzyms und der Elektrode. Hydrogele als elektrodenmodifizierende Materialien können eine hochpermeable Matrix ausbilden, sodass die Diffusion von Analyten sowie ein schneller Elektronentransport gewährleistet sind [212]. In Gegenwart externer Stimuli erfahren diese Hydrogele Konformationsänderungen und können dadurch messbare elektrische Signale erzeugen. Die Reaktion hängt stark von der Zusammensetzung, Form und Vernetzungsdichte des Hydrogels ab [212]. Dies konnte durch die elektrochemischen Versuche in Abschnitt 5.2.3 gezeigt werden.

Acetylcholinesterase-Biosensoren haben in den letzten 30 Jahren aufgrund der zahlreichen Analyten, die sie detektieren können, wie beispielsweise Alkaloide, Nervengase, Insektizide oder Tenside, an großem Interesse gewonnen [213]. Wie im theoretischen Teil dieser Arbeit beschrieben (siehe Abschnitt 3.4), ist Eserin ein Acetylcholinesterase-Hemmer und gilt in der Forschung als Referenzstandard. Im menschlichen Körper verhindert es den Abbau von Acetylcholin, wodurch es zu einer Akkumulation von Acetylcholin im synaptischen Spalt zweier

Nervenzellen kommt. Als Folge tritt eine verstärkte Aktivität des parasympathischen Nervensystems auf, was beispielsweise die Herzfrequenz herabsetzt. Eingesetzt wird Eserin dadurch bei verzögertem postoperativem Erwachen oder als Antidot bei Vergiftung bzw. Überdosierung mit Alkohol [214, 215].

In dieser Arbeit wurde Acetylcholinesterase (AChE) auf den mit Hydrogel beschichteten Elektroden immobilisiert. Dafür wurde die einfachste Immobilisierungstechnik, die physikalische Adsorption des Enzyms auf den Hydrogelschichten durchgeführt und untersucht. Zunächst wurde die Substratumwandlung von Acetylthiocholinchlorid (ATChCl) zum elektroaktiven Produkt Thiocholin untersucht. Anschließend wurde die Hemmwirkung von Eserin auf die AChE-Aktivität durch die Abnahme der Thiocholinproduktion analysiert.

5.3.1.1 Aktivitätstest von AChE auf den Hydrogelschichten

Zur Überprüfung der Aktivität des Enzyms wurden CVs aufgenommen. Dabei wurde die Oxidation des elektroaktiven Produkts Thiocholin (Gl. 3.8.) auf der Arbeitselektrode durch den anodischen Peakstrom erfasst. Abbildung 32 zeigt die CVs der immobilisierten Enzyme auf den verschiedenen Hydrogelschichten vor der Zugabe des Substrates ATChCl (schwarze Kurve) und nach der einmaligen Zugabe von 5 mM ATChCl (rote Kurve: HD14, blaue Kurve: HD11, grüne Kurve: HD41). Ohne Substratzugabe liegt die Stromantwort für HD14 bei 1,9 μA und sowohl für HD11 als auch für HD41 bei 1,1 μA . Die höchste Stromantwort nach Zugabe des Substrates ist auf dem Hydrogel HD14 mit fast 12 μA zu sehen. Hingegen wurden bei HD11 2,5 μA und bei HD41 2 μA gemessen. Die Aktivität des Enzyms auf den Schichten konnte somit bestätigt werden, wobei – wie in Abschnitt 5.2.3 vermutet – HD14 die geeignetste Funktions- und Immobilisierungsschicht für Biosensoren darstellt. Die Immobilisierung und Analytik mit Acetylcholinesterase wurde bei einem pH-Wert von 7,4 (PBS) durchgeführt, das heißt nahe dem pK_a -Wert von 7,3 für DEAEMA, wodurch diese Anteile in der Schicht protoniert werden und die Polymerstränge eine gestreckte Konformation annehmen und aufquellen, wie auch in den Ergebnissen zuvor bestätigt wurde. Während des Immobilisierungsschrittes wurde dadurch womöglich mehr Enzym an die Schicht HD14 angebunden, sodass mehr Substrat ATChCl zum elektroaktiven Produkt Thiocholin umgesetzt wurde, woraus die erhöhte Stromantwort resultierte. Zum anderen sorgt das Aufquellen der Schicht für eine verbesserte Substratzugänglichkeit und Produktweiterleitung zur Arbeitselektrode.

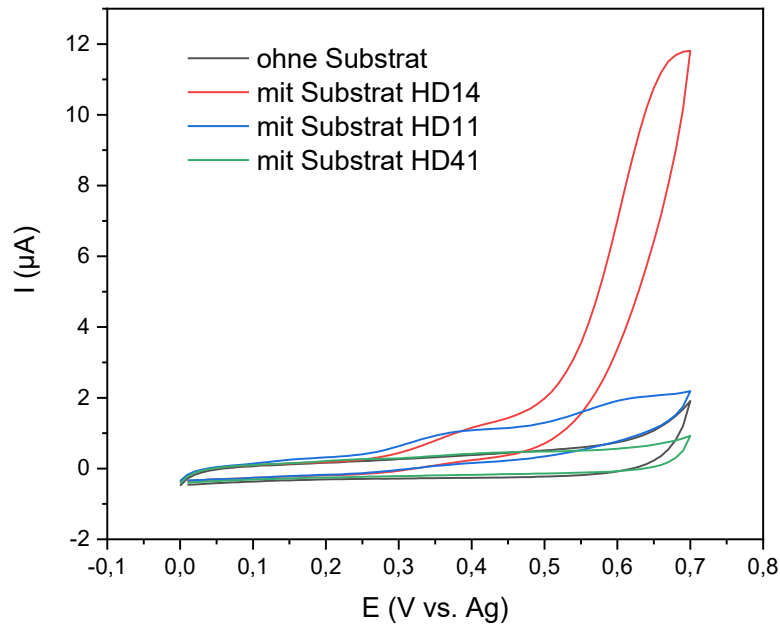


Abbildung 32: *Cyklische Voltammogramme der mit AChE immobilisierten, plasma-polymerisierten Hydrogelmischungen auf den Goldelektroden. Die schwarze Kurve zeigt die Stromantwort ohne Zugabe des Substrats ATChCl. Dagegen zeigt die rote (HD14), blaue (HD11) und grüne (HD41) Kurve die Stromantwort nach Zugabe des Substrates ATChCl auf den verschiedenen Hydrogelschichten.*

5.3.1.2 Inhibitorwirkung von Eserin auf AChE

Die Aktivität des Enzyms AChE auf den plasma-polymerisierten Hydrogelschichten HD14 und HD11 konnte bestätigt werden. Als Anwendungsbeispiel wird nachfolgend die Inhibitorwirkung des Physostigmins Eserin beschrieben. Eserin wird häufig in biosensorischen Systemen eingesetzt, um das cholinerge System zu manipulieren, beispielsweise mit der Zielsetzung neurologische Störungen der Alzheimerkrankheit zu behandeln [124, 125].

Abbildung 33A zeigt die amperometrischen Messungen zum Nachweis von ATChCl, welches in definierten Konzentrationsschritten zugegeben wurde. Die niedrigste nachweisbare Konzentration betrug dabei 10 µM Substrat für HD14. Für HD11 lag die niedrigste detektierbare Konzentration bei 200 µM. Die Zugabe des Substrats erfolgte bis zu einer Konzentration von 1 mM, der dabei gemessene maximale Strom lag bei ~0,62 µA für HD14 und ~0,1 µA für HD11. Diese Beobachtungen lassen ebenfalls darauf schließen, dass das Enzym einerseits effektiver an der Hydrogelschicht HD14 bindet und andererseits leichter an das Substrat gelangt. Auch die mikroskopischen Aufnahmen aus Abbildung 18 lassen aufgrund der stärker ausgeprägten Blasenstruktur von HD14 die Annahme einer gesteigerten Enzymenbindung bzw. Akkumulation des Enzyms zu. Bei einem geringeren DEAEMA-Gehalt in der Mischung hingegen ist dieser Effekt

aufgrund des Vorhandenseins von weniger protonierten Stickstofffunktionalitäten geringer. Dies wird umso deutlicher bei der Hydrogelschicht HD41, bei der nach der Substratzugabe von 1 mM nur eine vernachlässigbare Stromantwort von $0,02 \mu\text{A}$ gemessen wurde, was auf einen geringen Gehalt an immobilisiertem Enzym hindeutet. Abbildung 33B zeigt die Hemmung des Enzyms AChE mit Eserin. Die Zugabe von Eserin in Gegenwart von 1 mM ATChCl bewirkt eine langsame, reversible Hemmung des Substrats ATChCl, wodurch die Enzyme-Moleküle weniger oder gar nicht aktiv sind. Eine Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ führte bei HD14 bzw. HD11 zu einer Hemmung von 67 % bzw. 75 %. Ein Grund, warum die Hemmrage für die Hydrogelschicht HD14 geringer ausfällt, ist auch hier die stärkere Ausprägung der Oberflächenstrukturen. Das heißt, dass auf HD14 mehr Enzym und mehr gebundenes Substrat vorhanden ist, jedoch bei gleicher Konzentration des Hemmstoffs womöglich prozentual weniger Enzyme adressiert und gehemmt werden. Auf der Hydrogelschicht HD11 wurde weniger Enzym gebunden und demzufolge auch weniger Substrat umgesetzt, sodass die Konzentration des Eserins eine höhere Hemmrage hervorruft.

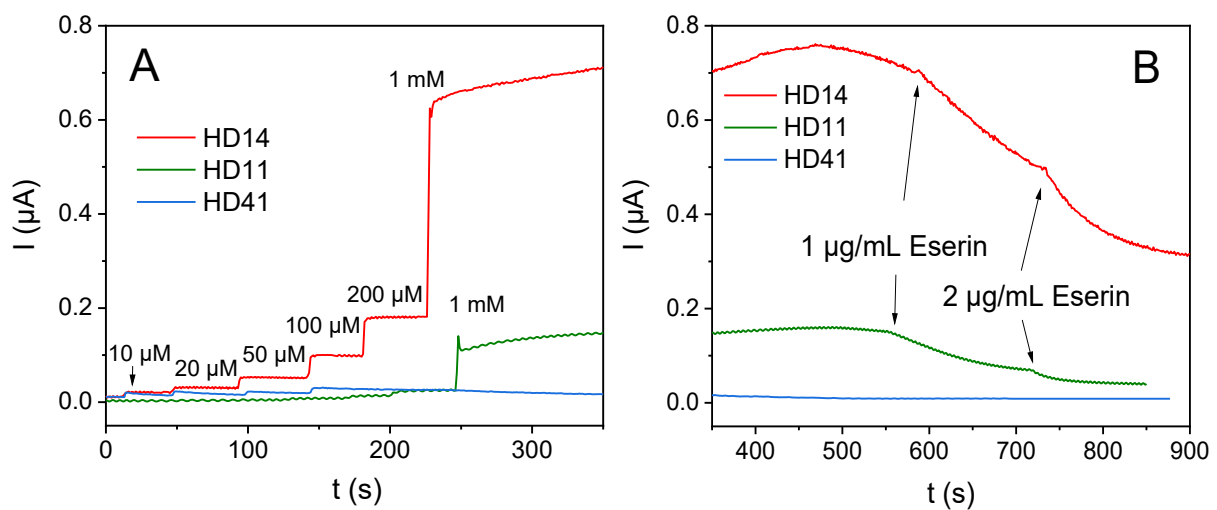


Abbildung 33: Amperometrische Messungen von AChE immobilisiert auf den Hydrogelschichten. A: ATChCl-Zugabe zu AChE + HD auf den Goldelektroden in PB pH 7,0. B: Zugabe von Inhibitor Eserin bei der ATChCl-Konzentration von 1 mM (B), jeweils gemessen bei einem Potential von $0,42 \text{ mV}$ vs Ag.

5.3.1.3 Stabilitätstest des adsorbierten AChE auf der Hydrogelschicht

Bei der physikalischen Adsorption kann das Enzym allmählich von der Oberfläche freigesetzt werden. Um diesen kritischen Punkt zu überprüfen, wurde die Stabilität des immobilisierten Enzyms auf der mit Hydrogel beschichteten Goldelektrode getestet. Dafür wurde die Stromantwort bei 0,5 mM ATChCl (siehe Abbildung 34A) aufgenommen und vier Mal wiederholt, nachdem die Elektrode jedes Mal gespült wurde. Die relative Standardabweichung von 7 % und die gleichen Kurvenverläufe zeigen dabei, dass das Enzym auf der Oberfläche immobilisiert bleibt [140]. Weiterhin wurde überprüft, ob der Sensor regeneriert und damit wiederverwertet werden konnte (siehe Abbildung 34B). Nach Festlegung der Grundlinie in Gegenwart von 0,5 mM ATChCl wurde Eserin in einer Konzentration von 100 ng/ml zugegeben, was zu einer 40%igen Hemmung führte [140]. Die Elektrode wurde daraufhin gespült und erneut 0,5 mM ATChCl zugegeben. Das Signal nahm allmählich zu und erreichte innerhalb von ~ 30 min das ursprüngliche Niveau. Die Ergebnisse demonstrieren die hohe Reproduzierbarkeit der Messung und die Möglichkeit, einen einzigen Sensor für mehrere Messungen zu verwenden [140].

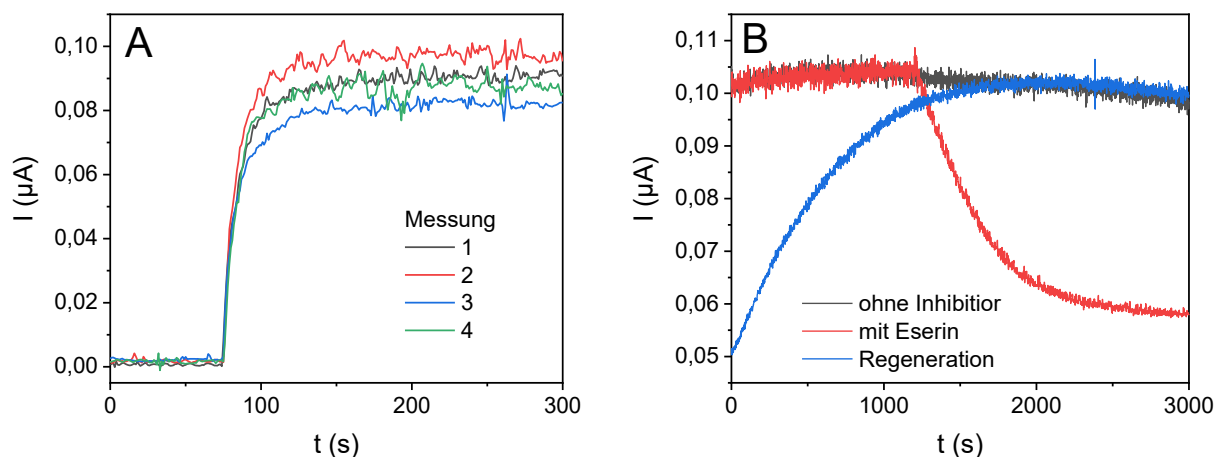


Abbildung 34: Amperometrische Messungen mit AChE + HD auf der Goldelektrode nach dem Waschen mit PBS (A) und Regenerationstest des Sensors (B), gemessen bei einem Potential von 0,42 V gegen Ag.

5.3.1.4 Quantitative Bestimmung von Eserin als Hemmstoff

Weiterhin wurden die mit Hydrogel beschichteten Elektroden mit immobilisiertem Enzym verwendet, um eine quantitative Bestimmung von Eserin als Hemmstoff durchzuführen. Wie oben erwähnt, wurde die Grundlinie auf 0,5 mM ATChCl festgelegt. Es wurden verschiedene Eserinkonzentrationen hinzugefügt, um daraufhin die Inhibitionsrate zu messen (siehe Abbildung 35A). Die Ergebnisse zeigen, dass die Sensorantwort proportional zum Eserinspiegel ist (siehe Abbildung 35B); die niedrigste nachweisbare Eserinkonzentration betrug 3 ng/ml ($S/N > 3$) [140].

Die Ergebnisse des AChE-basierten Biosensors zeigen, dass die Hydrogelschichten, insbesondere die Mischung HD14, als Funktionsschichten für biosensorische Anwendungen geeignet sind. Die Wiederverwendbarkeit des Sensors sowie das Potential für andere AChE-hemmende Substanzen (beispielsweise Medikamente oder Pestizide) konnten durch die Messungen mit dem Referenzhemmstoff Eserin bestätigt werden.

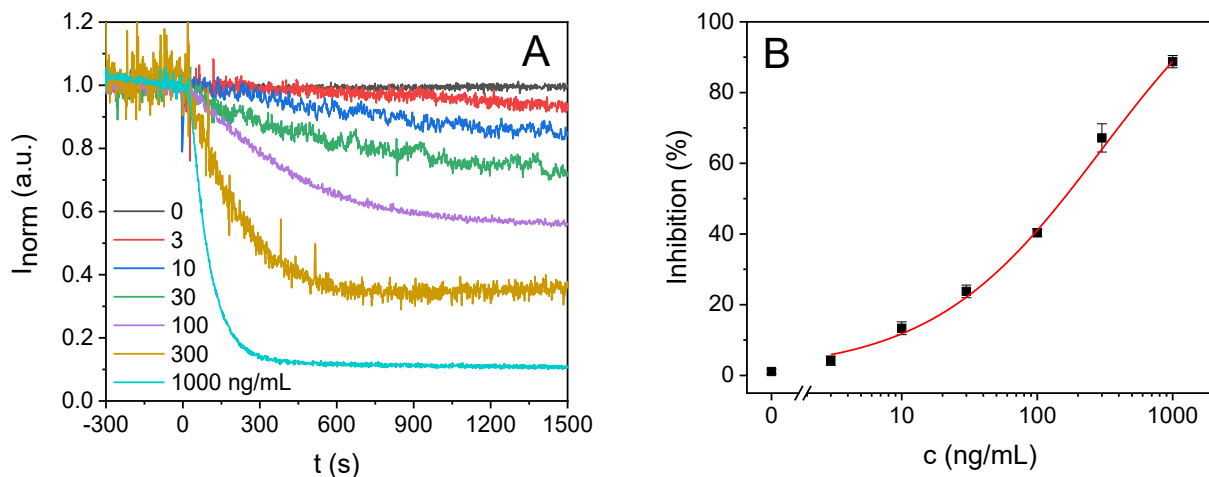


Abbildung 35: Amperometrische Reaktionskurven zur quantitativen Bestimmung der Eserinkonzentration in Gegenwart von ATChCl bei einem Potential von 0,42 V vs. Ag (A) und Kalibrierkurve mit einer logistischen Vier-Parameter-Anpassung. Die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen (B).

5.3.2 Glucoseoxidase (GOx) -basierte Biosensorik

Als zweites Anwendungsbeispiel wurde mit den plasma-polymerisierten Hydrogelschichten ein Glucoseoxidase-Sensor entwickelt. Wie im theoretischen Teil beschrieben, ist die Glucoseoxidase das bedeutendste Redoxenzym für das Monitoring der Volkskrankheit Diabetes mellitus. Die Anwendung und Weiterentwicklung von Hydrogelen als Sensor- und Immobilisierungsplattform für die Detektion und die Quantifizierung von Glucose im Blut des menschlichen Körpers ist daher von großer Bedeutung. Die Hydrogelschicht muss eine biokompatible

Schnittstelle mit dem Gewebe bereitstellen, bei der die Grenzfläche für Glucose sowie für die Produkte der Oxidation durchlässig ist, sodass eine zuverlässige elektrochemische Darstellung erfolgen kann. Der Elektronentransfer zwischen dem Enzym und der Elektrode wird oft dadurch erschwert, dass das redoxaktive Zentrum wie bei der Glucoseoxidase schwer zugänglich ist und weit entfernt von möglichen Elektrodenbindungsstellen liegt [216]. Aus der Literatur ist bekannt, dass Hydrogele die Fähigkeit der dreidimensionalen, elektronischen Leitfähigkeit zwischen Enzymen und Elektrode gewährleisten können, während es gleichzeitig möglich ist, große Stromdichten in Gegenwart eines frei diffundierenden Substrats zu erhalten [217]. Weiterhin ist die kontrollierte Deposition von funktionellen Einheiten auf den Hydrogelen an der Schnittstelle zum Gewebe ein weiterer entscheidender Faktor für die biomolekulare Aktivität sowie für das Weiterleiten regulatorischer Signale. Aus einigen Arbeiten ist bekannt, dass die Verwendung von Elektroden mit mikrostrukturierten Oberflächen die Empfindlichkeit von Biosensoren signifikant erhöhen kann [218, 219].

5.3.2.1 Hydrogelschicht HD14 als Immobilisierungsplattform für GOx

Vorherige Ergebnisse in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die Hydrogelschicht HD14 mit ihren ausgeprägten Faltenstrukturen auf den Goldelektroden die Immobilisierung einer großen Menge an Enzym durch physikalische Adsorption ermöglicht. Aus diesem Grund lag der Fokus bei der Entwicklung eines Glucosesensors auf dieser Hydrogelmischung. Um die Vorteile der HD14-Beschichtung zu nutzen und mehr Enzym an diese Schicht zu binden, wurde versucht, die Schichtdicke zu erhöhen. Wie in Abschnitt 5.1.4 erwähnt, liegt die mittels Tropfenmethode erzeugte Schichtdicke von HD14 bei $0,47 \mu\text{m}$. Aufgrund von Verdrängungs- und Verdampfungsprozessen war es technisch nicht möglich, eine dickere HD14-Beschichtung durch Erhöhung des Tropfenvolumens mittels Atmosphärendruck-Plasmajet herzustellen. Deshalb wurde eine Multilayer-Beschichtung mit HD14 (dreimaliges Abscheiden derselben Beschichtung mit denselben Prozessparametern) auf die Elektrode aufgebracht. Die so erzeugten Schichten weisen eine Dicke von $1,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ auf. Daraufhin wurde untersucht, welchen Einfluss die Multilayer-Schicht auf die Immobilisierung und Stromantwort ausübt. Die FT-IR-Ergebnisse zeigen eine einfach abgeschiedene HD14- und eine dreischichtige HD14-3-Hydrogelschicht im Vergleich (siehe Abbildung 36). Die gesteigerten Intensitäten der O-H-Signale bei 3450 cm^{-1} und der C-N/C-O-C-Streckschwingungssignale im Bereich von $1250\text{--}1020 \text{ cm}^{-1}$ von HD14-3 deuten auf einen höheren Gehalt an funktionellen Gruppen hin. Daraus schlussfolgernd wurde eine erhöhte Akkumulation des Enzyms innerhalb des Polymers angenommen.

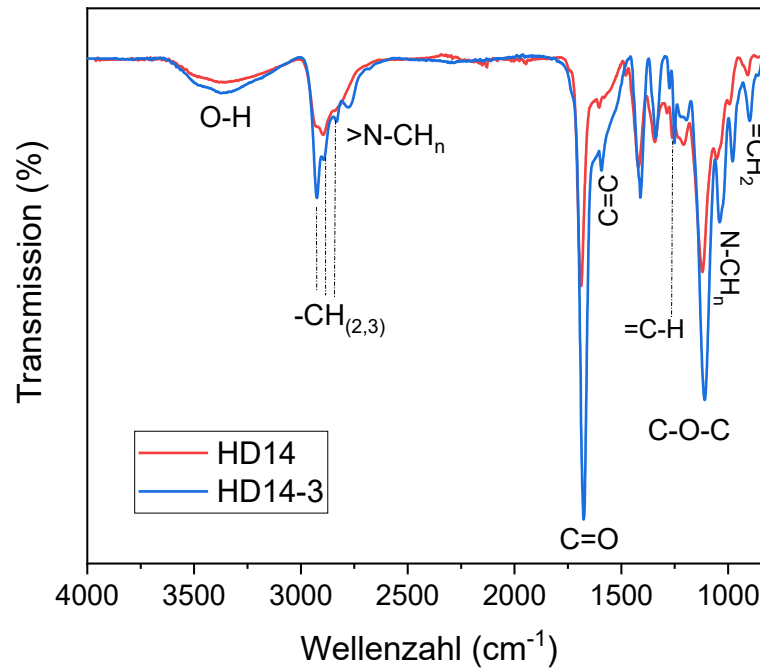


Abbildung 36: FT-IR-Spektren der einfachen Hydrogelschicht HD14 (rot) und der dreischichtigen Hydrogelschicht HD14-3 (blau).

Für die Unterstützung dieser Annahme wurden Cyclovoltammogramme aufgenommen (siehe Abbildung 37), verglichen wurde mit 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ als Redoxsonde in PB (pH 7,0) für Goldelektroden ohne Modifikation und nach der Beschichtung mit HD14 und HD14-3. Im Gegensatz zu der Einzelschicht HD14 hat sich der Spitzenstrom der HD14-3-Beschichtung auf 100 und $-100 \mu\text{A}$ verdoppelt (anodischer und kathodischer Strom) [140]. Die beschriebene Konformationsänderung des Hydrogelnetzwerkes bei sauren und neutralen pH-Werten verbessert die Zugänglichkeit der Redoxsonde zur Elektrodenoberfläche [195, 197]. Des Weiteren führt die höhere Schichtdicke und die damit verbundene, zusätzliche Vergrößerung der Oberfläche zu verstärkten Anreicherungen der Redoxsonde im Hydrogel. Die negativ geladene Redoxsonde an den protonierten DEAEMA-Polymerketten erhöht den Spitzenstrom an den mit HD14 und HD14-3 modifizierten Elektroden im Vergleich zur unmodifizierten Goldelektrode. Dabei wurde eine Verdoppelung der Stromantwort von -60 bzw. $+60 \mu\text{A}$ bei HD14 auf -120 bzw. $+120 \mu\text{A}$ bei HD14-3 festgestellt. Die Potentialverschiebung der HD-beschichteten SPEs von $0,012 \text{ V}$ (vs. Ag/AgCl-Referenzelektrode) auf $-0,13 \text{ V}$ ist ein Ergebnis (wie auch in Abschnitt 5.2.3 erwähnt) des Donnan-Potentials zwischen dem Elektrolyten und der abgeschiedenen Hydrogelbeschichtung, wie von Anson [208, 209] und Doblhöfer [210, 211] beschrieben.

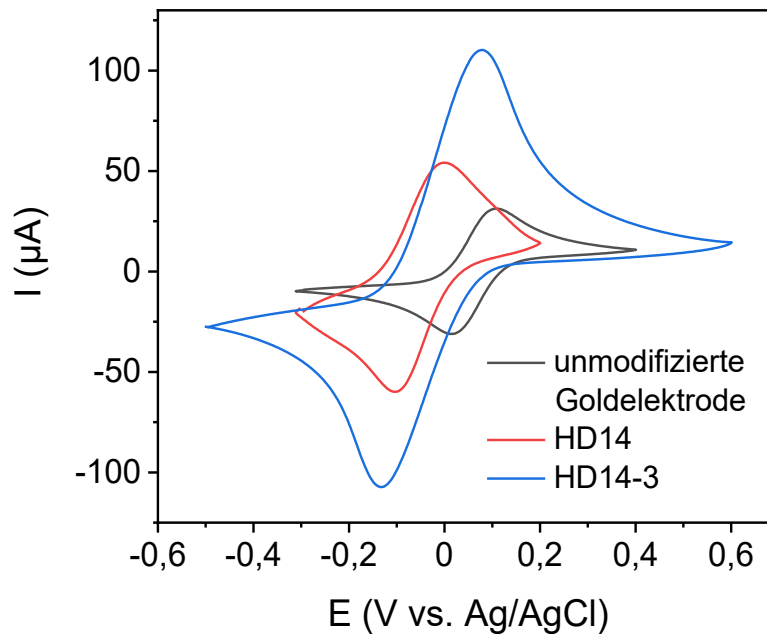


Abbildung 37: Cyclovoltammogramme von 1 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ in PB (pH 7,0) auf der unmodifizierten Goldelektrode (schwarz) und nach Beschichtung mit HD14 (rot) und HD14-3 auf der Goldelektrode (blau).

5.3.2.2 Aktivitätstest GOx auf den Hydrogelschichten

Die Experimente konnten zeigen, dass die erzeugten Hydrogelschichten die Weiterleitung von elektroaktiven Spezies an die Elektrodenoberfläche ermöglichen. Die protonierte und gequollene Hydrogelstruktur ist demnach eine geeignete Umgebung, um negativ geladene Moleküle zu immobilisieren. Darauf aufbauend wurde ein Glucose-Biosensor entwickelt. Die enzymatische Aktivität dieses Biosensors gegenüber der Glucoseoxidation wurde durch zyklische Voltammetrie untersucht (siehe Abbildung 38A). Verglichen wurde dabei die einfache HD14-Hydrogelschicht mit der Multilayerschicht HD14-3 in Gegenwart von Glucose als Substrat und PBS als Referenz. Abbildung 38A zeigt die zyklischen Voltammogramme von GOx auf HD14 nach der Zugabe von PBS und verschiedener Glucosekonzentrationen, aufgenommen bei 10 m/s. Im theoretischen Teil in Abschnitt 3.4 wurden bereits die Teilreaktionen der Oxidation von Glucose zu Gluconolaktone und weiter zu Wasserstoffperoxid durch GOx beschrieben, wodurch das Signal der Oxidation von Wasserstoffperoxid an der Elektrode als Maß für die Glucosekonzentration verwendet werden kann. Der anodische Spitzenstrom zeigt in Gegenwart von PBS keine Stromantwort, während hingegen bei zunehmender Glucosekonzentration der Strom ansteigt, sodass bei einer Glucosezugabe von 2 mM ein Wert von $\sim 3 \mu\text{A}$ erreicht wurde. Im Vergleich dazu zeigt der Sensor, der mit der Multilayerschicht HD14-3 generiert wurde (siehe Abbildung 38B), die doppelte Stromantwort von $6 \mu\text{A}$ bei 2 mM Glucose. Die Aktivität des Enzyms auf den Hydrogelschichten konnte also bestätigt werden.

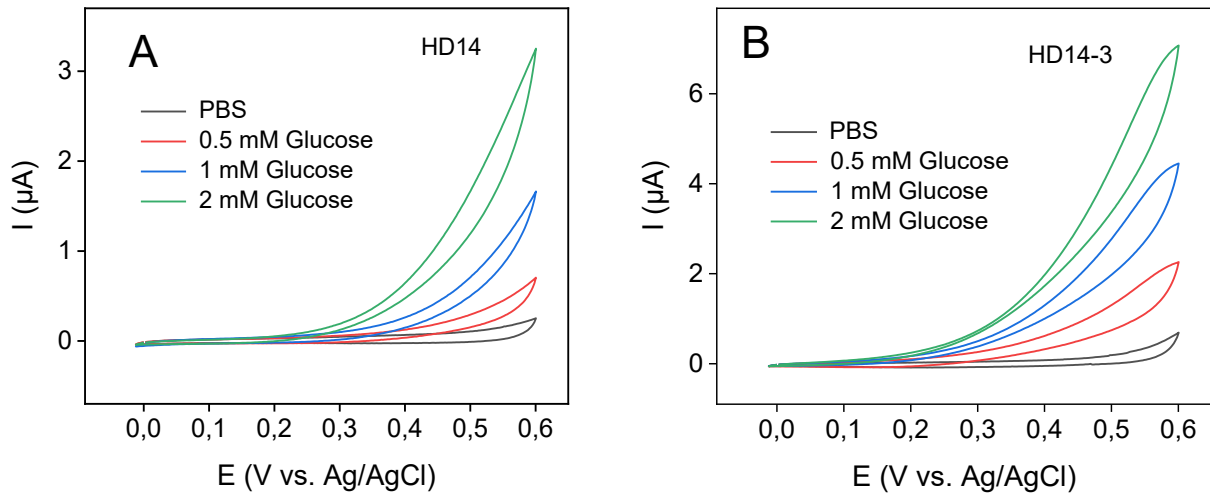


Abbildung 38: Cyclische Voltammogramme: A: $\text{GOx} + \text{HD14}$ auf der Goldelektrode. B: $\text{GOx} + \text{HD14-3}$ auf der Goldelektrode, in $\text{PB pH } 7,0$ (schwarz) und in Anwesenheit von 0,5 (rot), 1 (blau) und 2 mM (grün) Glucose, gemessen bei einer Scanrate von 10 mV/s .

Um zu überprüfen, wie stabil und schnell die Stromantworten sind, wurden amperometrische Messungen bei $0,60 \text{ V}$ unter kontinuierlichem Rühren durchgeführt, wodurch die Konzentrationsstufen der Glucosezugabe und die dazugehörige Stromantwort über die Zeit beobachtet werden konnten. Ein Anstieg des amperometrischen Stroms bei sukzessiver Zugabe von Glucose auf dem Sensor mit der HD14-Hydrogelschicht wurde bestätigt (siehe Abbildung 39A). Die Kalibrierkurve von Strom vs. Glucosekonzentration zeigt den linearen Bereich von $0,02\text{--}2 \text{ mM}$ mit einem Korrelationskoeffizienten R^2 von $0,993$ (siehe Abbildung 39B).

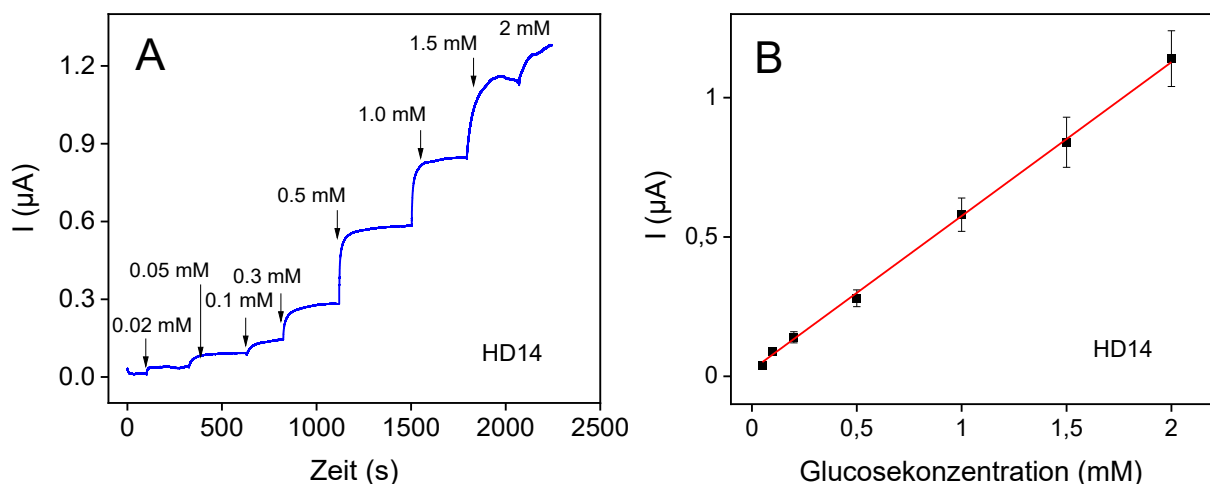


Abbildung 39: Amperometrische Messung. A: $\text{GOx} + \text{HD14}$ auf der Goldelektrode in $\text{PB (pH } 7,0)$ und die entsprechende Zugabe von verschiedenen Glucosekonzentrationen, gemessen bei $0,60 \text{ V vs. Ag}$. B: Kalibrierkurve des Glucosenachweises, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen ($n=3$).

Die Verwendung der Multilayerschicht HD14-3 zeigte ebenfalls stabile Signale bei der amperometrischen Untersuchung (siehe Abbildung 40A), jedoch wies dieser Sensor eine höhere Sensitivität gegenüber dem HD14-Sensor mit etwa doppelt so hohen Stromantworten auf, was den Ergebnissen der Cyclovoltammetrie entspricht. Darüber hinaus erstreckte sich der lineare Bereich von 0,020–3 mM mit einem Korrelationskoeffizienten R^2 von 0,999 (siehe Abbildung 40B). Die niedrigste, nachweisbare Konzentration der Glucose liegt bei jeweils 20 μM ($S/N > 3$) für beide Sensoren. Die Ergebnisse bestätigen, dass die Multilayerschicht HD14-3 eine höhere Kapazität zur GOx-Immobilisierung sowie eine höhere Sensitivität in Bezug auf die Stromantwort hat.

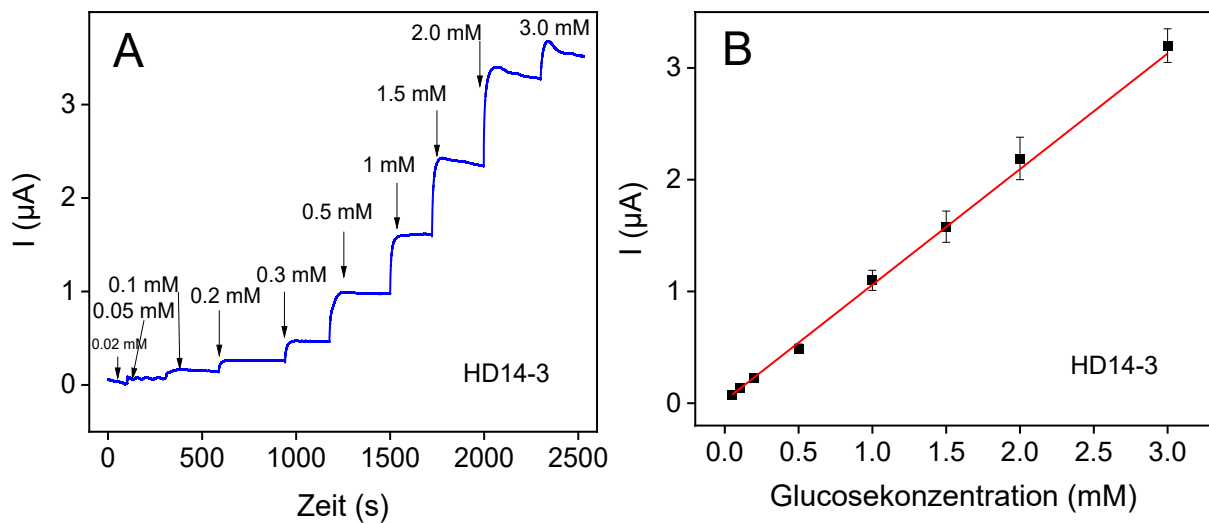


Abbildung 40: Amperometrische Messung. A: **GOx + HD14-3** auf der Goldelektrode in PB (pH 7,0) und die entsprechende Zugabe von verschiedenen Glucosekonzentrationen, gemessen bei 0,60 V vs. Ag. B: Kalibrierkurve des Glucosenachweises, die Fehlerbalken entsprechen den Standardabweichungen ($n=3$).

5.3.3 Zusammenfassung Teil 3

Der dritte Untersuchungsgegenstand der hier vorliegenden Arbeit war die Eignung der plasma-polymerisierten Hydrogelschichten für die Entwicklung von Biosensoren. Dafür wurden zwei Modellenzyme auf den Schichten durch physikalische Adsorption immobilisiert. Mit dem Enzym Acetylcholinesterase (AChE) wurde die Inhibitorwirkung mit Eserin als Anwendung dargestellt. Zunächst wurde die Aktivität des Enzyms auf den Hydrogelschichten bestimmt. Die höchsten Stromantworten nach Zugabe und Umsetzung des Substrats Thiocholin (ATChCl) wurde auf der Schicht HD14 gemessen. Bei den Schichten HD11 und HD41 wurde dagegen eine um 80 % geringere Stromantwort festgestellt. Die niedrigste nachweisbare ATChCl-Konzentration lag bei 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ für HD14. Die Zugabe von Eserin auf das vorhandene Substrat ATChCl bewirkte eine Hemmung der AChE von 67 % und 75 % mit den Schichten HD14 und HD11. Da auf der Oberfläche von HD14 mehr Enzym immobilisiert wurde, wurden womöglich weniger Enzyme durch die Eserinzugabe adressiert. Ein Hemmsignal für AChE, welches auf der Schicht HD41 immobilisiert wurde, wurde nicht festgestellt. Als zweites Modellenzym wurde Glucoseoxidase für die Entwicklung eines Glucosesensors zur Detektion des Glucose-Spiegels im Blut bei Diabetes mellitus ausgewählt. Für die Herstellung wurde aufgrund der vorher bestimmten Eigenschaften nur die Hydrogelschicht HD14 ausgewählt. Es wurde zudem versucht, die Schichtdicke zu erhöhen, um herauszustellen, ob ein positiver Einfluss durch die DEAEMA-Funktionalitäten auf die Performance erzielt werden kann. Durch die Steigerung der Schichtdicke von ~ 500 nm auf $\sim 1,6$ μm wurde ein Anstieg der Stromantwort von -60 und $+60$ μA auf -120 und $+120$ μA festgestellt. Der Aktivitätstest mit gebundenem GOx-Enzym bei Substratzugabe ergab ebenfalls eine Verdopplung der Stromantwort für die dickere HD14-Schicht. Für beide Schichten lag die niedrigste nachweisbare Glucosekonzentration bei 20 $\mu\text{M}/\text{ml}$. So konnte an die dickere Schicht mit mehr ionisierbaren Gruppen auch mehr Enzym gebunden und eine höhere Sensitivität bezüglich der Stromantwort erreicht werden. Generell konnte aber gezeigt werden, dass plasma-polymerisierte, acrylatbasierte Hydrogelschichten eine geeignete Plattform für die Entwicklung elektrochemischer Nachweissysteme/Biosensoren sind. Jedoch haben die chemische Zusammensetzung und das damit verbundene Vorhandensein bestimmter funktioneller Gruppen einen großen Einfluss auf die Bioaktivität der Enzyme.

6 Fazit und Ausblick

Über die Copolymerisation pH-abhängiger Hydrogelschichten durch einen Atmosphärendruck-Plasmajet wurde in der Literatur bisher noch nicht berichtet. Deshalb wurden in dieser Arbeit HEMA-Schichten aus vorangegangenen Arbeiten [38] durch Parameteroptimierung und den Zusatz des zweiten Monomers DEAEMA weiterentwickelt. So konnten unter anderem die Polymerisationszeit von fünf Minuten auf 30 Sekunden, sowie das Volumen der Monomerlösungen von ~10 auf 0.1 μl reduziert werden. DEAEMA als Co-Monomer dient als Vernetzer und enthält zusätzlich pH-abhängige Eigenschaften. Mit HEMA als „Rückgrat“ und DEAEMA als Funktionseinheit sind damit plasmapolymersierte, funktionelle Hydrogelschichten für einen möglichen Einsatz in biosensorischen Anwendungen entstanden. Die Entwicklung und Charakterisierung sowie die Anwendungsüberprüfung wurde in folgenden Abschnitten detaillierter zusammengefasst:

1. Herstellung und Charakterisierung copolymerisierter Hydrogelschichten mittels Atmosphärendruck-Plasmajet (Zusammenfassung Abschnitt 5.1.7, S. 54)
2. Untersuchungen zur Topographie und Grenzflächenwechselwirkungen plasma-polymerisierter Hydrogelschichten auf Goldelektroden (Zusammenfassung Abschnitt 5.2.5, S. 71)
3. Biosensorische Funktionsprüfung (Zusammenfassung Abschnitt 5.3.3, S. 83)

Die Herstellung stellt einen Neuheitswert gegenüber konventionellen Methoden und bestehenden plasmagestützten Verfahren dar. Eine schnelle und einfache Synthese der Hydrogelschichten wurde erzielt, welche im Gegensatz zu nass-chemischen Methoden keine Vernetzerchemikalien und Lösungsmittel verwendet. Da während des Prozesses keine organischen Abfälle entstehen, ist der Mechanismus darüber hinaus umweltfreundlich. Ein weiterer Vorteil dieses Plasmaverfahrens ist die kurze und schonende Vorbehandlung der Substratmaterialien, wodurch die Probenoberfläche nicht beschädigt wird. Durch den 30-sekündigen Aktivierungsschritt konnten weiterhin gute Hafteigenschaften der Schichten nachgewiesen werden. Im Vergleich zu anderen plasmagestützten Hydrogelsynthesen, welche meist in Reaktoren durchgeführt werden, kommt der Plasma-Jet beim Polymerisationsschritt nicht in Kontakt mit den Monomerlösungen und ist dadurch beispielsweise weniger wartungsintensiv. So konnten innerhalb von 30 Sekunden Polymerisationszeit stabile Hydrogelschichten erzeugt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die Eigenschaften dieser Hydrogele allein durch ihr Mischungsverhältnis eingestellt werden können. Die durch die Synthese simultan erzeugten Mikrostrukturierungen auf

der Oberfläche der Hydrogele stellen eine zusätzliche Funktion in Form einer Oberflächenvergrößerung für verschiedene Anwendungen dar. Die Schichten sind weiterhin in der Lage, durch einen äußeren Stimulus wie den pH-Wert den Transport von Ionen und Molekülen durch ihr Quell- oder Schrumpfverhalten zu regulieren. In diesem Zusammenhang wurden auf den modifizierten Elektrodenoberflächen gesteigerte Sensitivitäten bezüglich der Stromantwort beobachtet. Darüber hinaus wurde die Aktivität von verschiedenen Enzymen auf den Schichten in Abhängigkeit des Mischungsverhältnisses bestätigt. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich plasma-polymerisierte Hydrogelschichten als Funktions- und/oder Biosensorschichten mittels Atmosphärendruck-Plasmajet hergestellt werden.

Gleichzeitig eröffnen die gewonnenen Erkenntnisse ein großes Entwicklungspotential hinsichtlich weiterer Verbesserungen der Schichteigenschaften. Es konnte zwar eine Verbesserung der Stabilität hinsichtlich der Anhaftung der Hydrogelschichten erreicht werden, jedoch wurde ein Massenverlust nach dem Eintauchen in Wasser von ~30 % aufgrund ungebundener Monomereinheiten festgestellt. Eine Möglichkeit, diesen Massenverlust weiter zu reduzieren, wäre, die Plasmaquelle während des Prozesses zu bewegen (beispielsweise kreisförmig), sodass die Initiation der Polymerisation nicht nur punktförmig ist, sondern von mehreren Stellen ausgeht. Dadurch kann möglicherweise eine noch stärkere Vernetzung erreicht werden, ohne dabei die Funktionalität der Schicht zu verlieren.

Weiterhin gibt es noch offene Fragen im Bereich der Analytik. Die Quell- und Schrumpfeigenschaften bei unterschiedlichen pH-Werten können mittels einer Quarzkristall-Mikrowaage genauer untersucht werden, sodass Aussagen über Geschwindigkeit und Ausmaß (Massenzunahme/-abnahme) des Quellens und Schrumpfens getroffen werden können. Darüber hinaus könnte bestimmt werden, über wie viele Zyklen dieses Verhalten beständig bleibt, um die Lebensdauer/Strapazierfähigkeit der Hydrogelschichten einschätzen zu können. In diesem Zusammenhang können auch weitere Untersuchungen der Blasenstrukturen hinsichtlich einer Funktion als *drug-delivery*-System durchgeführt werden. In Ansätzen wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Analyse der Strukturen mittels mikroskopischer Techniken durchgeführt. Durch weitere Rasterkraft-, Elektronen- oder konfokale Mikroskopieuntersuchungen lassen sich genauere Aussagen über Größe, Verteilung und Wanddicke treffen. Die Beladung und Freisetzung unterschiedlicher Wirkstoffe sowie dazugehörige Kinetiken können dann weiter durch UV-vis-Spektroskopie oder HPLC (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) ermittelt werden.

Auch an die Erhöhung der Sensitivität und Selektivität der Sensoren kann angeknüpft werden. Wie eingangs erwähnt, wird die Antwortrate erhöht/beschleunigt, je kleiner, dünner und weniger vernetzt das Hydrogel ist und je mehr ionische Gruppen vorhanden sind. Durch die Einstellung der Polymerisationszeit und die Anpassung der Monomerlösungen für die Verneblermethode können möglicherweise dünnere Schichten mit schnellerer Antwortrate erzeugt werden. In diesem Zusammenhang können, für ein tieferes Verständnis der Diffusionseigenschaften der Substratzugänglichkeit innerhalb der Hydrogele, NMR-(*nuclear magnetic resonance*)-Diffusometrie-Messungen durchgeführt werden. Damit können weitere Rückschlüsse über Bindungsaffinitäten und Performance getroffen werden.

Ein direkter Einbau von Enzymen in die Hydrogelmatrix während des Herstellungsprozesses ist ebenfalls denkbar, sodass sich die Methodik nochmals vereinfachen lassen würde, da die Plasmapolymersation ein materialschonendes Verfahren mit milden Reaktionsbedingungen ist. Der Vorteil gegenüber anderen Immobilisierungsverfahren ist die Maximierung der Enzymbeladung sowie die Optimierung des Elektronentransfers bei gleichzeitigem Schutz des Enzyms vor der Umgebung.

Die entstandenen Schichten können nicht nur als Aktuatoren oder Sensoren in der (Bio-)Medizin ihren Einsatz finden, sondern auch in anderen Bereichen wie der Landwirtschaft oder dem Energiesektor. Durch die Beschichtung von Samen oder Pflanzensubstraten kann beispielsweise Wasser gezielt gespeichert und über einen bestimmten Zeitraum abgegeben werden, sodass eine regulierte Menge an Feuchtigkeit für die Pflanzenbestandteile bereitgestellt wird. Besonders in trockenen Regionen kann dadurch ein schneller Wasserverlust reduziert und die Pflanzenproduktivität gesteigert werden. Weiterhin ist ein Einsatz der plasma-polymerisierten Hydrogele als Funktions- oder Schutzschichten in Energiespeichersystemen denkbar. So können sie durch die Fähigkeit, Ionen und Elektronen zu leiten, als Elektroden- oder Bindermaterial in Batterien fungieren und einen positiven Beitrag zur längeren Lebensdauer wie auch zur Performance leisten. Außerdem können sie als Schutzschichten dienen, sodass durch eine Funktion als Wärmeableiter die Gefahr des Entflammens von Batterien reduziert werden kann. Der einfache Herstellungsprozess und die Einstellbarkeit der plasma-polymerisierten Hydrogelschichten durch den Atmosphärendruck-Plasmajet ermöglicht ein vielfältiges Anwendungsspektrum.

7 Literaturverzeichnis

- [1] L. Chen, Y.-a. Yin, Y.-x. Liu, L. Lin, M.-j. Liu, Design and fabrication of functional hydrogels through interfacial engineering, *Chinese Journal of Polymer Science* 35 (2017) 1181-1193.
- [2] J. Liu, S. Qu, Z. Suo, W. Yang, Functional hydrogel coatings, *National Science Review* 8 (2021) nwaa254.
- [3] O. Okay, General properties of hydrogels, *Hydrogel sensors and actuators: Engineering and technology* (2010) 1-14.
- [4] K.S. Soppimath, T.M. Aminabhavi, A.M. Dave, S.G. Kumbar, W. Rudzinski, Stimulus-responsive “smart” hydrogels as novel drug delivery systems, *Drug development and industrial pharmacy* 28 (2002) 957-974.
- [5] A. Bashari, A. Rouhani Shirvan, M. Shakeri, Cellulose-based hydrogels for personal care products, *Polymers for Advanced Technologies* 29 (2018) 2853-2867.
- [6] X. Wang, H. Hu, Z. Yang, L. He, Y. Kong, B. Fei, J.H. Xin, Smart hydrogel-functionalized textile system with moisture management property for skin application, *Smart materials and structures* 23 (2014) 125027.
- [7] B.J. Tighe, A decade of silicone hydrogel development: surface properties, mechanical properties, and ocular compatibility, *Eye & contact lens* 39 (2013) 4-12.
- [8] C. Cai, T. Wang, X. Han, S. Yang, C. Lai, T. Yuan, Z. Feng, N. He, In situ wound sprayable double-network hydrogel: Preparation and characterization, *Chinese Chemical Letters* 33 (2022) 1963-1969.
- [9] A. Bordbar-Khiabani, M. Gasik, Smart hydrogels for advanced drug delivery systems, *International Journal of Molecular Sciences* 23 (2022) 3665.
- [10] C.B. Goy, R.E. Chaile, R.E. Madrid, Microfluidics and hydrogel: A powerful combination, *Reactive and Functional Polymers* 145 (2019) 104314.
- [11] C.C. Schuurmans, M. Mihajlovic, C. Hiemstra, K. Ito, W.E. Hennink, T. Vermonden, Hyaluronic acid and chondroitin sulfate (meth) acrylate-based hydrogels for tissue engineering: Synthesis, characteristics and pre-clinical evaluation, *Biomaterials* 268 (2021) 120602.
- [12] W.H. Chen, W.C. Liao, Y.S. Sohn, M. Fadeev, A. Cecconello, R. Nechushtai, I. Willner, Stimuli-responsive nucleic acid-based polyacrylamide hydrogel-coated metal-organic framework nanoparticles for controlled drug release, *Advanced Functional Materials* 28 (2018) 1705137.
- [13] J.H. Kou, D. Fleisher, G.L. Amidon, Modeling drug release from dynamically swelling poly (hydroxyethyl methacrylate-co-methacrylic acid) hydrogels, *Journal of controlled release* 12 (1990) 241-250.
- [14] M. Refojo, F.L. Leong, Poly (methyl acrylate-co-hydroxyethyl acrylate) hydrogel implant material of strength and softness, *Journal of Biomedical Materials Research* 15 (1981) 497-509.
- [15] A.P. Constantinou, T. Lan, D.R. Carroll, T.K. Georgiou, Tricomponent thermoresponsive polymers based on an amine-containing monomer with tuneable hydrophobicity: Effect of composition, *European Polymer Journal* 130 (2020) 109655.

- [16] Y. Ma, Y. Tang, N.C. Billingham, S.P. Armes, A.L. Lewis, Synthesis of biocompatible, stimuli-responsive, physical gels based on ABA triblock copolymers, *Biomacromolecules* 4 (2003) 864-868.
- [17] Y. Tang, S.Y. Liu, S.P. Armes, N.C. Billingham, Solubilization and controlled release of a hydrophobic drug using novel micelle-forming ABC triblock copolymers, *Biomacromolecules* 4 (2003) 1636-1645.
- [18] D.N. Heo, S.-J. Song, H.-J. Kim, Y.J. Lee, W.-K. Ko, S.J. Lee, D. Lee, S.J. Park, L.G. Zhang, J.Y. Kang, Multifunctional hydrogel coatings on the surface of neural cuff electrode for improving electrode-nerve tissue interfaces, *Acta biomaterialia* 39 (2016) 25-33.
- [19] H. Cheng, K. Yue, M. Kazemzadeh-Narbat, Y. Liu, A. Khalilpour, B. Li, Y.S. Zhang, N. Annabi, A. Khademhosseini, Mussel-inspired multifunctional hydrogel coating for prevention of infections and enhanced osteogenesis, *ACS applied materials & interfaces* 9 (2017) 11428-11439.
- [20] H.Y. Yuen, H.P. Bei, X. Zhao, Underwater and wet adhesion strategies for hydrogels in biomedical applications, *Chemical Engineering Journal* 431 (2022) 133372.
- [21] H. Wang, Y. Xie, Hydrogen bond enforced polyaniline grown on activated carbon fibers substrate for wearable bracelet supercapacitor, *Journal of Energy Storage* 52 (2022) 105042.
- [22] W. Dong, W. Ma, S. Zhao, Y. Wang, J. Yao, Z. Liu, Z. Chen, D. Sun, Z. Jiang, M. Zhang, The surface modification of long carbon fiber reinforced polyether ether ketone with bioactive composite hydrogel for effective osteogenicity, *Materials Science and Engineering: C* 130 (2021) 112451.
- [23] A. Mateescu, Y. Wang, J. Dostalek, U. Jonas, Thin hydrogel films for optical biosensor applications, *Membranes* 2 (2012) 40-69.
- [24] K. Elkhoury, C.S. Russell, L. Sanchez-Gonzalez, A. Mostafavi, T.J. Williams, C. Kahn, N.A. Peppas, E. Arab-Tehrany, A. Tamayol, Soft-Nanoparticle functionalization of natural hydrogels for tissue engineering applications, *Advanced healthcare materials* 8 (2019) 1900506.
- [25] J. Koc, E. Schönemann, A. Amuthalingam, J. Clarke, J.A. Finlay, A.S. Clare, A. Laschewsky, A. Rosenhahn, Low-fouling thin hydrogel coatings made of photo-cross-linked polyzwitterions, *Langmuir* 35 (2018) 1552-1562.
- [26] I. Willner, Stimuli-controlled hydrogels and their applications, *Accounts of Chemical Research* 50 (2017) 657-658.
- [27] C.M. González-Henríquez, P.A. Alfaro-Cerda, D.F. Veliz-Silva, M.A. Sarabia-Vallejos, C.A. Terraza, J. Rodríguez-Hernández, Micro-wrinkled hydrogel patterned surfaces using pH-sensitive monomers, *Applied Surface Science* 457 (2018) 902-913.
- [28] D. Merche, N. Vandecasteele, F. Reniers, Atmospheric plasmas for thin film deposition: A critical review, *Thin Solid Films* 520 (2012) 4219-4236.
- [29] C. Tendero, C. Tixier, P. Tristant, J. Desmason, P. Leprince, Atmospheric pressure plasmas: A review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61 (2006) 2-30.
- [30] S. Bornholdt, M. Wolter, H. Kersten, Characterization of an atmospheric pressure plasma jet for surface modification and thin film deposition, *The European Physical Journal D* 60 (2010) 653-660.
- [31] M. Kehrer, J. Duchoslav, A. Hinterreiter, A. Mehic, T. Stehrer, D. Stifter, Surface functionalization of polypropylene using a cold atmospheric pressure plasma jet with gas water mixtures, *Surface and Coatings Technology* 384 (2020) 125170.

- [32] S. Van Vrekhem, R. Morent, N. De Geyter, Deposition of a PMMA coating with an atmospheric pressure plasma jet, *Journal of Coatings Technology and Research* 15 (2018) 679-690.
- [33] T. Mui, L. Silva, V. Prysiashnyi, K. Kostov, Surface modification of aluminium alloys by atmospheric pressure plasma treatments for enhancement of their adhesion properties, *Surface and Coatings Technology* 312 (2017) 32-36.
- [34] J. Kim, R. Mauchauffé, D. Kim, J. Kim, S.Y. Moon, Mechanism study of atmospheric-pressure plasma treatment of carbon fiber reinforced polymers for adhesion improvement, *Surface and Coatings Technology* 393 (2020) 125841.
- [35] H.K. Yasuda, *Plasma polymerization*, Academic press 2012.
- [36] H.B. Baniya, R.P. Guragain, D.P. Subedi, Cold atmospheric pressure plasma technology for modifying polymers to enhance adhesion: A critical review, *Progress in Adhesion and Adhesives* 6 (2021) 841-879.
- [37] S.K. Alavi, O. Lotz, B. Akhavan, G. Yeo, R. Walia, D.R. McKenzie, M.M. Bilek, Atmospheric Pressure Plasma Jet Treatment of Polymers Enables Reagent-Free Covalent Attachment of Biomolecules for Bioprinting, *ACS Applied Materials & Interfaces* 12 (2020) 38730-38743.
- [38] J. Buxadera-Palomero, K. Fricke, S. Reuter, F.J. Gil, D. Rodriguez, C. Canal, One-step liquid phase polymerization of HEMA by atmospheric-pressure plasma discharges for Ti dental implants, *Applied Sciences* 11 (2021) 662.
- [39] F. Chen, J. Song, Z. Liu, J. Liu, H. Zheng, S. Huang, J. Sun, W. Xu, X. Liu, Atmospheric pressure plasma functionalized polymer mesh: an environmentally friendly and efficient tool for oil/water separation, *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 4 (2016) 6828-6837.
- [40] O. Wichterle, D. Lim, Hydrophilic gels for biological use, *Nature* 185 (1960) 117-118.
- [41] D.A. Gyles, L.D. Castro, J.O.C. Silva Jr, R.M. Ribeiro-Costa, A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations, *European Polymer Journal* 88 (2017) 373-392.
- [42] H.M. Said, S.G. Abd Alla, A.W.M. El-Naggar, Synthesis and characterization of novel gels based on carboxymethyl cellulose/acrylic acid prepared by electron beam irradiation, *Reactive and Functional Polymers* 61 (2004) 397-404.
- [43] T. Iizawa, H. Taketa, M. Maruta, T. Ishido, T. Gotoh, S. Sakohara, Synthesis of porous poly (N-isopropylacrylamide) gel beads by sedimentation polymerization and their morphology, *Journal of applied polymer science* 104 (2007) 842-850.
- [44] J.M. Torres, C.M. Stafford, B.D. Vogt, Photoinitiator surface segregation induced instabilities from polymerization of a liquid coating on a rigid substrate, *Soft Matter* 8 (2012) 5225-5232.
- [45] W. Chen, Q. Wang, J. Chen, Q. Zhang, X. Zhao, Y. Qian, C. Zhu, L. Yang, Y. Zhao, X.-Y. Kong, Improved ion transport and high energy conversion through hydrogel membrane with 3D interconnected nanopores, *Nano Letters* 20 (2020) 5705-5713.
- [46] Y. Gu, M.E. Distler, H.F. Cheng, C. Huang, C.A. Mirkin, A General DNA-Gated Hydrogel Strategy for Selective Transport of Chemical and Biological Cargos, *Journal of the American Chemical Society* 143 (2021) 17200-17208.
- [47] O. Lieleg, K. Ribbeck, Biological hydrogels as selective diffusion barriers, *Trends in cell biology* 21 (2011) 543-551.

- [48] X. Liu, J. Liu, S. Lin, X. Zhao, Hydrogel machines, *Materials Today* 36 (2020) 102-124.
- [49] F. Ganji, F.S. Vasheghani, F.E. VASHEGHANI, Theoretical description of hydrogel swelling: a review, (2010).
- [50] S. Bajpai, Swelling studies on hydrogel networks—a review, (2001).
- [51] M. Kojima, S. Ando, K. Kataoka, T. HIROTA, K. AOYAGI, H. NAKAGAMI, Magnetic resonance imaging (MRI) study of swelling and water mobility in micronized low-substituted hydroxypropylcellulose matrix tablets, *Chemical and pharmaceutical bulletin* 46 (1998) 324-328.
- [52] M. Rizwan, R. Yahya, A. Hassan, M. Yar, A.D. Azzahari, V. Selvanathan, F. Sonsudin, C.N. Abouloula, pH sensitive hydrogels in drug delivery: Brief history, properties, swelling, and release mechanism, material selection and applications, *Polymers* 9 (2017) 137.
- [53] D. Buenger, F. Topuz, J. Groll, Hydrogels in sensing applications, *Progress in Polymer Science* 37 (2012) 1678-1719.
- [54] Q. Liu, P. Zhang, A. Qing, Y. Lan, M. Lu, Poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels with improved shrinking kinetics by RAFT polymerization, *Polymer* 47 (2006) 2330-2336.
- [55] B. Kim, Y. Shin, pH-sensitive swelling and release behaviors of anionic hydrogels for intelligent drug delivery system, *Journal of applied polymer science* 105 (2007) 3656-3661.
- [56] G.R. Deen, X.J. Loh, Stimuli-responsive cationic hydrogels in drug delivery applications, *Gels* 4 (2018) 13.
- [57] C.M. González-Henríquez, F.E. Rodríguez-Umanzor, M.A. Sarabia-Vallejos, C.A. Terraza, E. Martínez-Campos, J. Rodríguez-Hernandez, Innovative procedure for precise deposition of wrinkled hydrogel films using direct inkjet printing, *Materials & Design* 194 (2020) 108959.
- [58] J. Rodríguez-Hernandez, Wrinkled interfaces: Taking advantage of surface instabilities to pattern polymer surfaces, *Progress in Polymer Science* 42 (2015) 1-41.
- [59] A. Schweikart, A. Fery, Controlled wrinkling as a novel method for the fabrication of patterned surfaces, *Microchimica Acta* 165 (2009) 249-263.
- [60] S.K. Basu, L. Scriven, L. Francis, A. McCormick, V.R. Reichert, Wrinkling of epoxy powder coatings, *Journal of applied polymer science* 98 (2005) 116-129.
- [61] O. Ortiz, A. Vidyasagar, J. Wang, R. Toomey, Surface instabilities in ultrathin, cross-linked poly (N-isopropylacrylamide) coatings, *Langmuir* 26 (2010) 17489-17494.
- [62] N. Bowden, W.T. Huck, K.E. Paul, G.M. Whitesides, The controlled formation of ordered, sinusoidal structures by plasma oxidation of an elastomeric polymer, *Applied Physics Letters* 75 (1999) 2557-2559.
- [63] A. Juel, D. Pihler-Puzović, M. Heil, Instabilities in blistering, *Annual Review of Fluid Mechanics* 50 (2018) 691-714.
- [64] T. Shen, J. Kan, E. Benet, F.J. Vernerey, On the blistering of thermo-sensitive hydrogel: the volume phase transition and mechanical instability, *Soft matter* 15 (2019) 5842-5853.
- [65] M.C. Koetting, J.T. Peters, S.D. Steichen, N.A. Peppas, Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports* 93 (2015) 1-49.
- [66] T. Tanaka, Kinetics of phase transition in polymer gels, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 140 (1986) 261-268.

- [67] Y. Chen, P. Sun, pH-sensitive polyampholyte microgels of poly (acrylic acid-co-vinylamine) as injectable hydrogel for controlled drug release, *Polymers* 11 (2019) 285.
- [68] S.W. Kim, Y.H. Bae, T. Okano, Hydrogels: swelling, drug loading, and release, *Pharmaceutical research* 9 (1992) 283-290.
- [69] C. Liu, L. Zhang, X. Zhang, Y. Jia, Y. Di, Z. Gan, Bioinspired free-standing one-dimensional photonic crystals with janus wettability for water quality monitoring, *ACS Applied Materials & Interfaces* 12 (2020) 40979-40984.
- [70] S.R. Makhsin, N.J. Goddard, R. Gupta, P. Gardner, P.J. Scully, Optimization Synthesis and Biosensing Performance of an Acrylate-Based Hydrogel as an Optical Waveguiding Sensing Film, *Analytical chemistry* 92 (2020) 14907-14914.
- [71] U.S. Madduma-Bandarage, S.V. Madihally, Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications, *Journal of Applied Polymer Science* (2020) 50376.
- [72] F. Zhao, D. Yao, R. Guo, L. Deng, A. Dong, J. Zhang, Composites of polymer hydrogels and nanoparticulate systems for biomedical and pharmaceutical applications, *Nanomaterials* 5 (2015) 2054-2130.
- [73] C. Zhao, L. Zhou, M. Chiao, W. Yang, Antibacterial hydrogel coating: strategies in surface chemistry, *Advances in Colloid and Interface Science* (2020) 102280.
- [74] J. Maitra, V.K. Shukla, Cross-linking in hydrogels-a review, *Am. J. Polym. Sci* 4 (2014) 25-31.
- [75] V.R. Tirumala, R. Divan, L.E. Ocola, D.C. Mancini, Direct-write e-beam patterning of stimuli-responsive hydrogel nanostructures, *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures Processing, Measurement, and Phenomena* 23 (2005) 3124-3128.
- [76] J. Pan, S. Yung Chan, J.E. Common, S. Amini, A. Miserez, E. Birgitte Lane, L. Kang, Fabrication of a 3D hair follicle-like hydrogel by soft lithography, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 101 (2013) 3159-3169.
- [77] C.M. González-Henríquez, D.H. Sagredo-Oyarce, M.A. Sarabia-Vallejos, J. Rodríguez-Hernández, Fabrication of micro and sub-micrometer wrinkled hydrogel surfaces through thermal and photocrosslinking processes, *Polymer* 101 (2016) 24-33.
- [78] C.M. Gonzalez-Henriquez, F.E. Rodriguez-Umanzor, D. Guzman, M.A. Sarabia-Vallejos, J. Rodriguez-Hernandez, Formation of responsive hierarchical wrinkled patterns on hydrogel films via multi-step methodology, *Polymer* 179 (2019) 121662.
- [79] I. Langmuir, Oscillations in ionized gases, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 14 (1928) 627-637.
- [80] K. Burm, Plasma: The fourth state of matter, *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 32 (2012) 401-407.
- [81] J. Friedrich, *The plasma chemistry of polymer surfaces: advanced techniques for surface design*, John Wiley & Sons 2012.
- [82] N. Inagaki, *Plasma surface modification and plasma polymerization*, CRC press 1996.
- [83] H. Biederman, *Plasma polymer films*, World Scientific 2004.
- [84] H. Yuk, T. Zhang, S. Lin, G.A. Parada, X. Zhao, Tough bonding of hydrogels to diverse non-porous surfaces, *Nature materials* 15 (2016) 190-196.

- [85] D. Hegemann, H. Brunner, C. Oehr, Plasma treatment of polymers for surface and adhesion improvement, *Nuclear instruments and methods in physics research section B: Beam interactions with materials and atoms* 208 (2003) 281-286.
- [86] M.N. Acda, E.E. Devera, R.J. Cabangon, H.J. Ramos, Effects of plasma modification on adhesion properties of wood, *International journal of adhesion and adhesives* 32 (2012) 70-75.
- [87] E. Ghahabi, Y. Shajari, M. Razavi, I. Mobasherpour, Effect of iron content on the wear behavior and adhesion strength of TiC–Fe nanocomposite coatings on low carbon steel produced by air plasma spray, *Ceramics International* 46 (2020) 2670-2676.
- [88] M. Veuillet, L. Ploux, A. Airoudj, Y. Gourbeyre, E. Gaudichet-Maurin, V. Roucoules, Macroscopic control of DMAHEMA and HEMA plasma polymerization to tune the surface mechanical properties of hydrogel-like coatings, *Plasma Processes and Polymers* 14 (2017) 1600215.
- [89] D. Bhattacharyya, K. Pillai, O.M. Chyan, L. Tang, R.B. Timmons, A new class of thin film hydrogels produced by plasma polymerization, *Chemistry of materials* 19 (2007) 2222-2228.
- [90] G. Jnido, G. Ohms, W. Viöl, One-step deposition of polyester/tio₂ coatings by atmospheric pressure plasma jet on wood surfaces for uv and moisture protection, *Coatings* 10 (2020) 184.
- [91] H.B. Baniya, R.P. Guragain, D.P. Subedi, Cold Atmospheric Pressure Plasma Technology for Modifying Polymers to Enhance Adhesion: A Critical Review, *Reviews of Adhesion and Adhesives* 9 (2021) 269-307.
- [92] M. Moreno-Couranjou, F. Loyer, P. Grysan, N.D. Boscher, P. Choquet, Insights into switchable thermoresponsive copolymer layers by atmospheric pressure plasma-initiated chemical vapour deposition, *Plasma Processes and Polymers* 17 (2020) 1900172.
- [93] M. Fischer, M. Vahdatzadeh, R. Konradi, J. Friedrichs, M.F. Maitz, U. Freudenberg, C. Werner, Multilayer hydrogel coatings to combine hemocompatibility and antimicrobial activity, *Biomaterials* 56 (2015) 198-205.
- [94] U.S. Madduma-Bandarage, S.V. Madihally, Synthetic hydrogels: Synthesis, novel trends, and applications, *Journal of Applied Polymer Science* 138 (2021) 50376.
- [95] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Hydrogels as drug delivery systems; pros and cons, *Trends in Pharmaceutical Sciences* 5 (2019) 7-24.
- [96] F. Rizzo, N.S. Kehr, Recent Advances in Injectable Hydrogels for Controlled and Local Drug Delivery, *Advanced Healthcare Materials* 10 (2021) 2001341.
- [97] T. Distler, A.R. Boccaccini, 3D printing of electrically conductive hydrogels for tissue engineering and biosensors—A review, *Acta biomaterialia* 101 (2020) 1-13.
- [98] M. Lejars, A. Margaille, C. Bressy, Fouling release coatings: a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings, *Chemical reviews* 112 (2012) 4347-4390.
- [99] P. Lundberg, A. Bruin, J.W. Klijnstra, A.M. Nyström, M. Johansson, M. Malkoch, A. Hult, Poly (ethylene glycol)-based thiol-ene hydrogel coatings— curing chemistry, aqueous stability, and potential marine antifouling applications, *ACS Applied Materials & Interfaces* 2 (2010) 903-912.
- [100] G. Raj, *Interfacial interactions in Flax fibre/PLA biocomposite: from model surfaces to real fibres*, Lorient, 2010.

- [101] K. GmbH, Oberflächenenergie [online] <https://www.kruss-scientific.com/de-DE/know-how/glossar/freie-oberflaechenenergie>, (abgerufen am 27.08.2021).
- [102] T. Young, III. An essay on the cohesion of fluids, *Philosophical transactions of the royal society of London* (1805) 65-87.
- [103] W. Owens, Rabel and Kaelble (OWRK) method, KRÜSS: Advancing your Surface Science [online]. KRÜSS GmbH| Borsteler Chaussee 85 (2020) 22453.
- [104] D.K. Owens, R. Wendt, Estimation of the surface free energy of polymers, *Journal of applied polymer science* 13 (1969) 1741-1747.
- [105] J. Li, D.J. Mooney, Designing hydrogels for controlled drug delivery, *Nature Reviews Materials* 1 (2016) 1-17.
- [106] P. Bertsch, M. Diba, D.J. Mooney, S.C. Leeuwenburgh, Self-healing injectable hydrogels for tissue regeneration, *Chemical Reviews* 123 (2022) 834-873.
- [107] T. Luxbacher, *The Zeta Potential for Solid Surface Analysis*, Anton Paar GmbH 2014.
- [108] J.D. Clogston, A.K. Patri, Zeta potential measurement, *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*, Springer 2011, pp. 63-70.
- [109] R.J. Hunter, *Zeta potential in colloid science: principles and applications*, Academic press 2013.
- [110] J. Heinze, Cyclovoltammetrie—die „Spektroskopie“ des Elektrochemikers, *Angewandte Chemie* 96 (1984) 823-840.
- [111] J. Zhou, G. Wang, J. Hu, X. Lu, J. Li, Temperature, ionic strength and pH induced electrochemical switching of smart polymer interfaces, *Chemical Communications* (2006) 4820-4822.
- [112] K. Kaniewska, J. Nowakowski, P. Bacal, M. Karbarz, Reversible change in volume of thin hydrogel layer deposited on electrode surface using Cu (II) ↔ Cu (I) process, *Sensors and Actuators B: Chemical* 344 (2021) 130114.
- [113] R. Renneberg, V. Loroach, *Biotechnology for beginners*, Academic Press 2016.
- [114] G. Urban, T. Weiss, *Hydrogels for biosensors*, *Hydrogel sensors and actuators*, Springer 2009, pp. 197-220.
- [115] M. B. Ansorge-Schumacher, Enzymimmobilisierung, in: K.-E. Jaeger, A. Liese, C. Syldatk (Eds.), *Einführung in die Enzymtechnologie*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2018, pp. 187-206.
- [116] D.R. Thevenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Pure and applied chemistry* 71 (1999) 2333-2348.
- [117] J. Tavakoli, Y. Tang, Hydrogel based sensors for biomedical applications: An updated review, *Polymers* 9 (2017) 364.
- [118] H.J. Hwang, M.Y. Ryu, C.Y. Park, J. Ahn, H.G. Park, C. Choi, S.-D. Ha, T.J. Park, J.P. Park, High sensitive and selective electrochemical biosensor: Label-free detection of human norovirus using affinity peptide as molecular binder, *Biosensors and Bioelectronics* 87 (2017) 164-170.
- [119] W. Lu, X. Le, J. Zhang, Y. Huang, T. Chen, Supramolecular shape memory hydrogels: a new bridge between stimuli-responsive polymers and supramolecular chemistry, *Chemical Society Reviews* 46 (2017) 1284-1294.

- [120] L.C. Clark Jr, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of sciences* 102 (1962) 29-45.
- [121] A. Heller, Amperometric biosensors, *Current opinion in biotechnology* 7 (1996) 50-54.
- [122] M. Badea, M. Romanca, C. Draghici, J.-L. Marty, C. Marques, D. Mendes, O. Amarante Jr, G. Nunes, Multidisciplinary collaboration for environmental protection using biosensors: detection of organophosphate insecticides in aqueous medium, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17 (2006) 807-811.
- [123] Š. Štěpánková, K. Vorčáková, Cholinesterase-based biosensors, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31 (2016) 180-193.
- [124] N. Lokar, V. Kononenko, D. Drobne, D. Vrtačnik, Electrochemical acetylcholinesterase biosensor for detection of cholinesterase inhibitors: study with eserine, *Informacije MIDEM* 48 (2018) 235-240.
- [125] T. Petcher, P. Pauling, Cholinesterase inhibitors: structure of eserine, *Nature* 241 (1973) 277-277.
- [126] J. Schäfer, R. Foest, A. Ohl, K. Weltmann, Miniaturized non-thermal atmospheric pressure plasma jet—Characterization of self-organized regimes, *Plasma Physics and Controlled Fusion* 51 (2009) 124045.
- [127] M. Levien, K. Fricke, Fabrication of hydrogel coatings by atmospheric-pressure plasma polymerization: Function by structure and chemistry, *Materials Today* 41 (2020) 316-317.
- [128] M.P. Seah, D. Briggs, *Practical Surface Analysis: Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*, John Wiley & Sons 1990.
- [129] J.F. Watts, J. Wolstenholme, *An introduction to surface analysis by XPS and AES*, John Wiley & Sons 2019.
- [130] P. Van der Heide, *X-ray photoelectron spectroscopy: an introduction to principles and practices*, John Wiley & Sons 2011.
- [131] G. Lukowski, *Röntgen-Photoelektronenspektroskopie, Moderne Pharmazeutische Technolo* (2009).
- [132] C. Berthomieu, R. Hienerwadel, Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, *Photosynthesis research* 101 (2009) 157-170.
- [133] H. Günzler, H.-U. Gremlich, *IR-Spektroskopie: Eine Einführung*, John Wiley & Sons 2012.
- [134] R. Kumar, *3 Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), Surface Characterization Techniques*, De Gruyter, Berlin, Boston, 2022, pp. 58-71.
- [135] F.M. Fowkes, Attractive forces at interfaces, *Industrial & Engineering Chemistry* 56 (1964) 40-52.
- [136] nanosurf, Dynamic AFM Modes [online] <https://www.nanosurf.com/en/support/afm-modes-overview/dynamic-modes>, (abgerufen am 07.10.2021).
- [137] R. Asmatulu, W.S. Khan, Electrospun nanofibers for agriculture and food industries, *Synthesis and Applications of Electrospun Nanofibers*. Synth. Appl. Electrospun Nanofibers (2019) 89-109.
- [138] D. Nečas, P. Klapetek, Gwyddion-Free SPM (AFM, SNOM/NSOM, STM, MFM,...) data analysis software.

- [139] W.-W. Liao, R.-G. Ho, Y.-C. Yen, H.-C. Cheng, The four-parameter logistic item response theory model as a robust method of estimating ability despite aberrant responses, *Social Behavior and Personality: an international journal* 40 (2012) 1679-1694.
- [140] M. Levien, Z. Farka, M. Pastucha, P. Skládal, Z. Nasri, K.-D. Weltmann, K. Fricke, Functional plasma-polymerized hydrogel coatings for electrochemical biosensing, *Applied Surface Science* (2022) 152511.
- [141] M. Levien, Z. Nasri, K.-D. Weltmann, K. Fricke, Study on the Interaction of Plasma-Polymerized Hydrogel Coatings with Aqueous Solutions of Different pH, *Gels* 9 (2023) 237.
- [142] M. Levien, I. Amin, F. Vicente de Paula Kodaira, K.-D. Weltmann, Direct grafting of microwrinkled hydrogels by atmospheric-pressure plasma polymerization: Going simple and environmentally friendly, *European Polymer Journal* 198 (2023) 112413.
- [143] Y. Wang, H. Ouyang, Y. Xie, Y. Jiang, L. Zhao, W. Peng, J. Wu, J. Bao, Y. Liu, J. Wu, Mechanically robust, biocompatible, and durable PHEMA-based hydrogels enabled by the synergic effect of strong intermolecular interaction and suppressed phase separation, *Polymer* 254 (2022) 125083.
- [144] H. Studenovská, M. Šlouf, F. Rypáček, Poly (HEMA) hydrogels with controlled pore architecture for tissue regeneration applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 19 (2008) 615-621.
- [145] A. Shakeel, A. Singh, S. Das, D. Suhag, A.K. Sharma, S.K. Rajput, M. Mukherjee, Synthesis and morphological insight of new biocompatible smart hydrogels, *Journal of Polymer Research* 24 (2017) 1-10.
- [146] C.Y. Zhang, W.S. Wu, N. Yao, B. Zhao, L.J. Zhang, pH-sensitive amphiphilic copolymer brush Chol-g-P (HEMA-co-DEAEMA)-b-PPEGMA: synthesis and self-assembled micelles for controlled anti-cancer drug release, *RSC Advances* 4 (2014) 40232-40240.
- [147] J.C. de Oliveira, M. de Meireles Brioude, A. Airoudj, F. Bally-Le Gall, V. Roucoules, Plasma polymerization in the design of new materials: looking through the lens of maleic anhydride plasma polymers, *Materials Today Chemistry* 23 (2022) 100646.
- [148] B.R. Coad, P. Favia, K. Vasilev, H.J. Griesser, Plasma polymerization for biomedical applications: A review, *Plasma Processes and Polymers* 19 (2022) 2200121.
- [149] S. Ricciardi, R. Castagna, S.M. Severino, I. Ferrante, F. Frascella, E. Celasco, P. Mandracci, I. Vallini, G. Mantero, C.F. Pirri, Surface functionalization by poly-acrylic acid plasma-polymerized films for microarray DNA diagnostics, *Surface and Coatings Technology* 207 (2012) 389-399.
- [150] O. Carton, D. Ben Salem, S. Bhatt, J. Pulpytel, F. Arefi-Khonsari, Plasma polymerization of acrylic acid by atmospheric pressure nitrogen plasma jet for biomedical applications, *Plasma Processes and Polymers* 9 (2012) 984-993.
- [151] J. Friedrich, P. Rohrer, W. Saur, T. Gross, A. Lippitz, W. Unger, Improvement in polymer adhesivity by low and normal pressure plasma surface modification, *Surface and Coatings Technology* 59 (1993) 371-378.
- [152] J. Benedikt, K. Focke, A. Yanguas-Gil, A. Von Keudell, Atmospheric pressure microplasma jet as a depositing tool, *Applied Physics Letters* 89 (2006) 251504.
- [153] S.M. Eggins, L. Kinsley, J. Shelley, Deposition and element fractionation processes during atmospheric pressure laser sampling for analysis by ICP-MS, *Applied Surface Science* 127 (1998) 278-286.

- [154] M.R. Guilherme, A.V. Reis, S.H. Takahashi, A.F. Rubira, J.P. Feitosa, E.C. Muniz, Synthesis of a novel superabsorbent hydrogel by copolymerization of acrylamide and cashew gum modified with glycidyl methacrylate, *Carbohydrate Polymers* 61 (2005) 464-471.
- [155] F.o. Loyer, G. Frache, P. Choquet, N.D. Boscher, Atmospheric pressure plasma-initiated chemical vapor deposition (AP-PiCVD) of poly (alkyl acrylates): An experimental study, *Macromolecules* 50 (2017) 4351-4362.
- [156] M. Guvendiren, S. Yang, J.A. Burdick, Swelling-induced surface patterns in hydrogels with gradient crosslinking density, *Advanced Functional Materials* 19 (2009) 3038-3045.
- [157] G. Scheltjens, G. Van Assche, B. Van Mele, Effect of substrate temperature on thermal properties and deposition kinetics of atmospheric plasma deposited methyl (methacrylate) films, *Plasma Processes and Polymers* 14 (2017) 1500213.
- [158] T. Öktem, H. Ayhan, N. Seventekin, E. Piskin, Modification of polyester fabrics by in situ plasma or post-plasma polymerisation of acrylic acid, *Coloration Technology* 115 (1999) 274-279.
- [159] R. Morent, N. De Geyter, S. Van Vlierberghe, E. Vanderleyden, P. Dubruel, C. Leys, E. Schacht, Deposition of polyacrylic acid films by means of an atmospheric pressure dielectric barrier discharge, *Plasma Chemistry and Plasma Processing* 29 (2009) 103-117.
- [160] T.B. Casserly, K.K. Gleason, Effect of substrate temperature on the plasma polymerization of poly (methyl methacrylate), *Chemical Vapor Deposition* 12 (2006) 59-66.
- [161] G. George, High resolution XPS of organic polymers—the scienta ESCA 300 data base. G. Beamson and D. Briggs. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, 1992. Pp. 295, price£ 65.00. ISBN 0-471-93592-1, Wiley Online Library, 1994.
- [162] M. Buddhadasa, P.-L. Girard-Lauriault, Plasma co-polymerisation of ethylene, 1, 3-butadiene and ammonia mixtures: Amine content and water stability, *Thin Solid Films* 591 (2015) 76-85.
- [163] C.P. Ho, H. Yasuda, Coatings and surface modification by methane plasma polymerization, *Journal of applied polymer science* 39 (1990) 1541-1552.
- [164] J. Groenewold, Wrinkling of plates coupled with soft elastic media, *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications* 298 (2001) 32-45.
- [165] W.T.S. Huck, N. Bowden, P. Onck, T. Pardoën, J.W. Hutchinson, G.M. Whitesides, Ordering of Spontaneously Formed Buckles on Planar Surfaces, *Langmuir* 16 (2000) 3497-3501.
- [166] A. Schweikart, A. Fery, Controlled wrinkling as a novel method for the fabrication of patterned surfaces, *Microchimica Acta* 165 (2009) 249-263.
- [167] S.H. Anastasiadis, Development of functional polymer surfaces with controlled wettability, *Langmuir* 29 (2013) 9277-9290.
- [168] K.S. Park, J.J. Kwok, P. Kafle, Y. Diao, When Assembly Meets Processing: Tuning Multiscale Morphology of Printed Conjugated Polymers for Controlled Charge Transport, *Chemistry of Materials* 33 (2021) 469-498.
- [169] C. González-Henríquez, J. Rodríguez-Hernández, *Wrinkled Polymer Surfaces*, (2019).
- [170] J. Lim, S.J. Choi, P. Kim, Controlling Wrinkle Propagation in the Bilayer System with Thickness-Gradient, *Advanced Materials Interfaces* 5 (2018) 1701109.

- [171] J. Kevin, F. Xu, S. Toufania, K.J. Chan, S. Said, T.C. Stimpson, E. Gonzalez-Martinez, J.M. Moran-Mirabal, E.D. Cranston, T. Hoare, Multi-scale structuring of cell-instructive cellulose nanocrystal composite hydrogel sheets via sequential electrospinning and thermal wrinkling, *Acta Biomaterialia* 128 (2021) 250-261.
- [172] S.K. Basu, L. Scriven, L. Francis, A. McCormick, Mechanism of wrinkle formation in curing coatings, *Progress in Organic coatings* 53 (2005) 1-16.
- [173] J. Kálal, The use of methacrylic polymers in medicine, *Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics* 7 (1984) 31-39.
- [174] T. Okajima, I. Harada, K. Nishio, S. Hirotsu, Kinetics of volume phase transition in poly (N-isopropylacrylamide) gels, *The Journal of chemical physics* 116 (2002) 9068-9077.
- [175] T. Shen, *Mechanics of Soft, Viscoelastic Materials: Rheology, Instability and Fracture*, University of Colorado at Boulder, 2020.
- [176] S. Dutta, D. Dhara, Effect of preparation temperature on salt-induced deswelling and pattern formation in poly (N-isopropylacrylamide) hydrogels, *Polymer* 76 (2015) 62-69.
- [177] B.B. Xu, Q. Liu, Z. Suo, R.C. Hayward, Reversible electrochemically triggered delamination blistering of hydrogel films on micropatterned electrodes, *Advanced Functional Materials* 26 (2016) 3218-3225.
- [178] C.M. González-Henríquez, S.C. Galleguillos-Guzmán, M.A. Sarabia-Vallejos, A. Santos-Coquillat, E. Martínez-Campos, J. Rodríguez-Hernández, Microwrinkled pH-sensitive hydrogel films and their role on the cell adhesion/proliferation, *Materials Science and Engineering: C* 103 (2019) 109872.
- [179] G. Li, Z. Zhao, *Advanced Materials for High Biocompatible Hydrogel System*, MDPI, 2022, pp. 1357.
- [180] S. Ferraris, M. Cazzola, V. Peretti, B. Stella, S. Spriano, Zeta potential measurements on solid surfaces for in vitro biomaterials testing: surface charge, reactivity upon contact with fluids and protein absorption, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6 (2018) 60.
- [181] L. Ionov, N. Houbenov, A. Sidorenko, M. Stamm, S. Minko, Smart microfluidic channels, *Advanced Functional Materials* 16 (2006) 1153-1160.
- [182] L. Chen, M. Liu, H. Bai, P. Chen, F. Xia, D. Han, L. Jiang, Antiplaquet and thermally responsive poly (N-isopropylacrylamide) surface with nanoscale topography, *Journal of the American Chemical Society* 131 (2009) 10467-10472.
- [183] N.J. Shirtcliffe, G. McHale, M. I. Newton, The superhydrophobicity of polymer surfaces: recent developments, *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 49 (2011) 1203-1217.
- [184] J. Schakenraad, H. Busscher, C.R. Wildevuur, J. Arends, The influence of substratum surface free energy on growth and spreading of human fibroblasts in the presence and absence of serum proteins, *Journal of biomedical materials research* 20 (1986) 773-784.
- [185] M.E. Schrader, On adhesion of biological substances to low energy solid surfaces, *J. Colloid Interface Sci.* 88 (1981) 296-297.
- [186] A.D. Cook, R.D. Sagers, W.G. Pitt, Bacterial adhesion to poly (HEMA)-based hydrogels, *Journal of biomedical materials research* 27 (1993) 119-126.
- [187] Y. Wang, V. Kozlovskaya, I.G. Arcibal, D.M. Crokek, E. Kharlampieva, Highly swellable ultrathin poly(4-vinylpyridine) multilayer hydrogels with pH-triggered surface wettability, *Soft Matter* 9 (2013) 9420-9429.

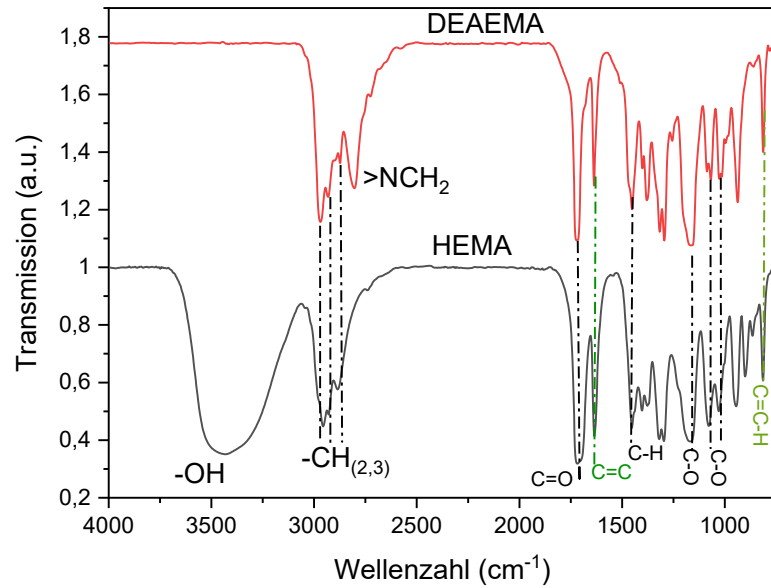
- [188] A. Roointan, J. Farzanfar, S. Mohammadi-Samani, A. Behzad-Behbahani, F. Farjadian, Smart pH responsive drug delivery system based on poly (HEMA-co-DMAEMA) nanohydrogel, *International Journal of Pharmaceutics* 552 (2018) 301-311.
- [189] E. Stratakis, A. Mateescu, M. Barberoglou, M. Vamvakaki, C. Fotakis, S.H. Anastasiadis, From superhydrophobicity and water repellency to superhydrophilicity: smart polymer-functionalized surfaces, *Chemical Communications* 46 (2010) 4136-4138.
- [190] M.R. Romero, G. Trejo Nieva, J. Vedelago, C.G. Gomez, A microfluidic actuator based on a stimuli-responsive hydrogel grafted into Cucurbita moschata xylems, *Soft Matter* 17 (2021) 5941-5949.
- [191] S. Shahalom, T. Tong, S. Emmett, B.R. Saunders, Poly (DEAEMa-co-PEGMa): a new pH-responsive comb copolymer stabilizer for emulsions and dispersions, *Langmuir* 22 (2006) 8311-8317.
- [192] C.M. Gabardo, A. Hosseini, L. Soleymani, A New Wrinkle in Biosensors: Wrinkled electrodes could be a breakthrough for lab-on-a-chip devices, *IEEE Nanotechnology Magazine* 10 (2016) 6-18.
- [193] R.C. Adams-McGavin, Y. Chan, C.M. Gabardo, J. Yang, M. Skreta, B.C. Fung, L. Soleymani, Nanoporous and wrinkled electrodes enhance the sensitivity of glucose biosensors, *Electrochimica Acta* 242 (2017) 1-9.
- [194] J. Gu, X. Li, H. Ma, Y. Guan, Y. Zhang, One-step synthesis of PHEMA hydrogel films capable of generating highly ordered wrinkling patterns, *Polymer* 110 (2017) 114-123.
- [195] J. Zhang, N.A. Peppas, Synthesis and characterization of pH-and temperature-sensitive poly (methacrylic acid)/poly (N-isopropylacrylamide) interpenetrating polymeric networks, *Macromolecules* 33 (2000) 102-107.
- [196] O. Parlak, M. Ashaduzzaman, S.B. Kollipara, A. Tiwari, A.P. Turner, Switchable bioelectrocatalysis controlled by dual stimuli-responsive polymeric interface, *ACS applied materials & interfaces* 7 (2015) 23837-23847.
- [197] W. Lin, S. Nie, D. Xiong, X. Guo, J. Wang, L. Zhang, pH-responsive micelles based on (PCL) 2 (PDEA-b-PPEGMA) 2 miktoarm polymer: controlled synthesis, characterization, and application as anticancer drug carrier, *Nanoscale research letters* 9 (2014) 1-12.
- [198] A. Maleki, N. Beheshti, K. Zhu, A.-L. Kjøniksen, B. Nyström, Shrinking of chemically cross-linked polymer networks in the postgel region, *Polymer Bulletin* 58 (2007) 435-445.
- [199] F. Khan, M. Atif, M. Haseen, S. Kamal, M.S. Khan, S. Shahid, S.A. Nami, Synthesis, classification and properties of hydrogels: Their applications in drug delivery and agriculture, *Journal of Materials Chemistry B* 10 (2022) 170-203.
- [200] G. Justin, A.R.A. Rahman, A. Guiseppi-Elie, Bioactive hydrogel layers on microdisk electrode arrays: cyclic voltammetry experiments and simulations, *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis* 21 (2009) 1125-1134.
- [201] Y. Lu, D. Wang, T. Li, X. Zhao, Y. Cao, H. Yang, Y.Y. Duan, Poly (vinyl alcohol)/poly (acrylic acid) hydrogel coatings for improving electrode–neural tissue interface, *Biomaterials* 30 (2009) 4143-4151.
- [202] N. Mac Kenna, P. Calvert, A. Morrin, Impedimetric transduction of swelling in pH-responsive hydrogels, *Analyst* 140 (2015) 3003-3011.

- [203] S. Mishra, M. Ashaduzzaman, P. Mishra, H.C. Swart, A.P. Turner, A. Tiwari, Stimuli-enabled zipper-like graphene interface for auto-switchable bioelectronics, *Biosensors and Bioelectronics* 89 (2017) 305-311.
- [204] Y. Han, S. Liu, H. Mao, L. Tian, W. Ning, Synthesis of Novel Temperature-and pH-Sensitive ABA Triblock Copolymers P (DEAEMA-co-MEO2MA-co-OEGMA)-b-PEG-b-P (DEAEMA-co-MEO2MA-co-OEGMA): Micellization, Sol–Gel Transitions, and Sustained BSA Release, *Polymers* 8 (2016) 367.
- [205] P. Papaphilippou, M. Christodoulou, O.-M. Marinica, A. Taculescu, L. Vekas, K. Chrissafis, T. Krasia-Christoforou, Multiresponsive polymer conetworks capable of responding to changes in pH, temperature, and magnetic field: synthesis, characterization, and evaluation of their ability for controlled uptake and release of solutes, *ACS applied materials & interfaces* 4 (2012) 2139-2147.
- [206] N. Rodkate, B. Rutnakornpituk, U. Wichai, G. Ross, M. Rutnakornpituk, Smart carboxymethylchitosan hydrogels that have thermo-and pH-responsive properties, *Journal of Applied Polymer Science* 132 (2015).
- [207] L. Wang, R. Malpass-Evans, M. Carta, N.B. McKeown, F. Marken, The immobilisation and reactivity of Fe (CN) 6³⁻/4⁻ in an intrinsically microporous polyamine (PIM-EA-TB), *Journal of Solid State Electrochemistry* 24 (2020) 2797-2806.
- [208] R. Naegeli, J. Redepenning, F.C. Anson, Influence of supporting electrolyte concentration and composition on formal potentials and entropies of redox couples incorporated in Nafion coatings on electrodes, *The Journal of Physical Chemistry* 90 (1986) 6227-6232.
- [209] P. Ugo, F.C. Anson, Poly (2-vinylpyrazine) as a soluble polymeric ligand and as an electrode coating. Reactions with pentacyanoferrate (II), *Analytical Chemistry* 61 (1989) 1799-1805.
- [210] G.E. Asturias, G.W. Jang, A.G. Macdiarmid, K. Doblhofer, C. Zhong, Membrane-Properties of Polymer Films: The Acid-Doping Reaction of Polyaniline, *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 95 (1991) 1381-1384.
- [211] K. Doblhofer, M. Vorotyntsev, *Electroactive Polymer Electrochemistry. Part 1. Fundamentals*, Plenum Press, NY (1994).
- [212] A. Sinha, P.K. Kalambate, S.M. Mugo, P. Kamau, J. Chen, R. Jain, Polymer hydrogel interfaces in electrochemical sensing strategies: A review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118 (2019) 488-501.
- [213] A. Ivanov, R. Younusov, G. Evtugyn, F. Arduini, D. Moscone, G. Palleschi, Acetylcholinesterase biosensor based on single-walled carbon nanotubes—Co phthalocyanine for organophosphorus pesticides detection, *Talanta* 85 (2011) 216-221.
- [214] M. Stilson, K. Kelly, J. Suchard, Physostigmine as an antidote, *The California Journal of Emergency Medicine* 2 (2001) 47.
- [215] J. Rasimas, K.K. Sachdeva, J.W. Donovan, Revival of an antidote: bedside experience with physostigmine, *Toxicology Communications* 2 (2018) 85-101.
- [216] A. Guiseppi-Elie, C. Lei, R.H. Baughman, Direct electron transfer of glucose oxidase on carbon nanotubes, *Nanotechnology* 13 (2002) 559.
- [217] Z. Li, T. Konno, M. Takai, K. Ishihara, Fabrication of polymeric electron-transfer mediator/enzyme hydrogel multilayer on an Au electrode in a layer-by-layer process, *Biosensors and Bioelectronics* 34 (2012) 191-196.

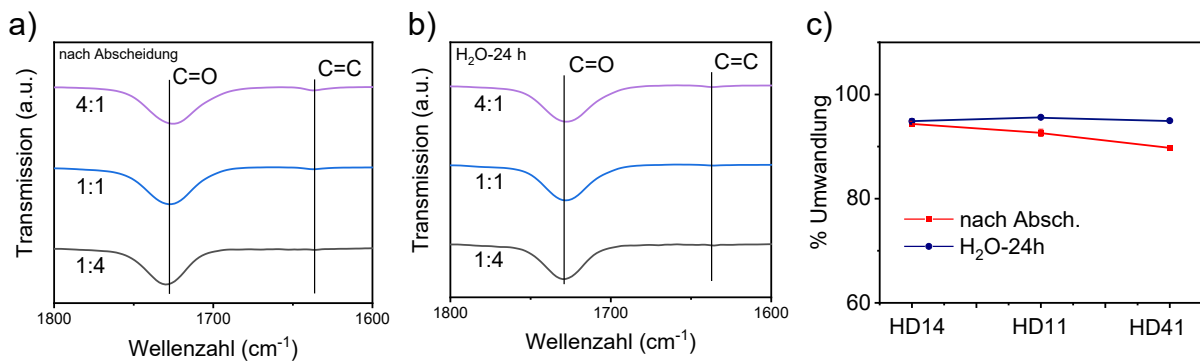
- [218] L. Soleymani, Z. Fang, E.H. Sargent, S.O. Kelley, Programming the detection limits of biosensors through controlled nanostructuring, *Nature Nanotechnology* 4 (2009) 844-848.
- [219] L. Soleymani, Z. Fang, B. Lam, X. Bin, E. Vasilyeva, A.J. Ross, E.H. Sargent, S.O. Kelley, Hierarchical Nanotextured Microelectrodes Overcome the Molecular Transport Barrier To Achieve Rapid, Direct Bacterial Detection, *ACS Nano* 5 (2011) 3360-3366.

8 Anhang

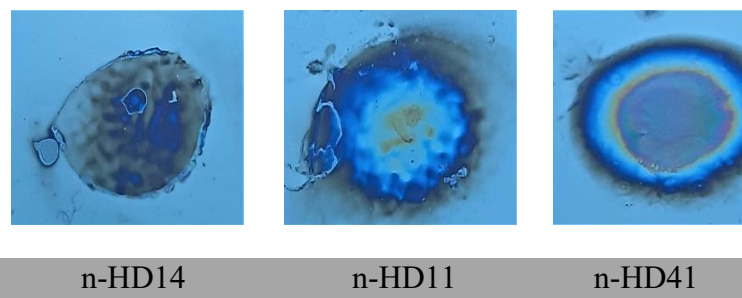
Anhang 1:	FT-IR-Spektren der Monomere. Die Bindungen C=C und C=C-H werden durch die Plasmapolymersierung am stärksten beeinflusst.....	104
Anhang 2:	Monomerumwandlung für HD14, 11, 41 im abgeschiedenen Zustand und nach der Lagerung in Wasser.....	104
Anhang 3:	Fotografische Aufnahmen der auf Siliziumwafer abgeschiedenen Hydrogelschichten mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, hergestellt durch die Verneblermethode.	104
Anhang 4:	Ermittelte Schichtdicken aus Profilometermessungen (n=3) der Hydrogelschichten, welche mittels Verneblermethode hergestellt wurden.....	105
Anhang 5:	Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme, hergestellt mit der Verneblermethode bei 1500-facher Vergrößerung	105
Anhang 6:	FT-IR Spektren der auf Siliziumwafer abgeschiedenen Hydrogelschichten mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen(blau: n-HD14, rot: n-HD11, schwarz: n-HD41), hergestellt durch die Verneblermethode.....	105
Anhang 7:	Wasserkontaktwinkel der plasma-polymerisierten Hydrogele (Verneblermethode) nach Lagerung in Pufferlösungen von pH 4, 7 und 10 für die verschiedenen HD-Mischungsverhältnisse	106



Anhang 1: FT-IR-Spektren der Monomere. Die Bindungen C=C und C=C-H werden durch die Plasmapolymerisierung am stärksten beeinflusst.



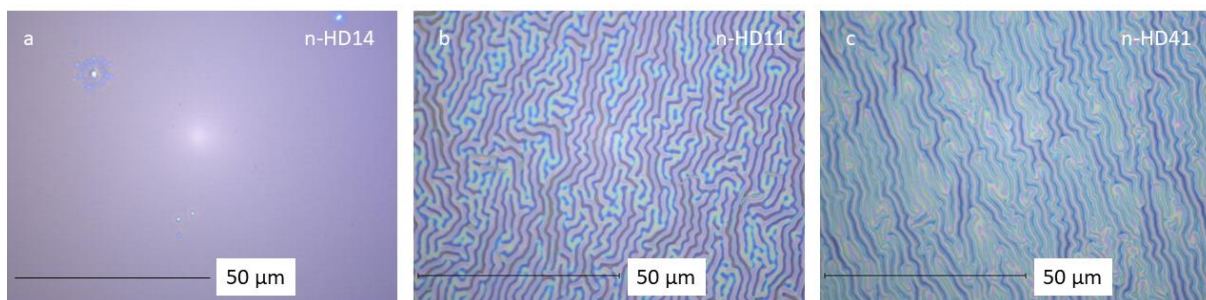
Anhang 2: Monomerumwandlung für HD14, 11, 41 im abgeschiedenen Zustand und nach der Lagerung in Wasser.



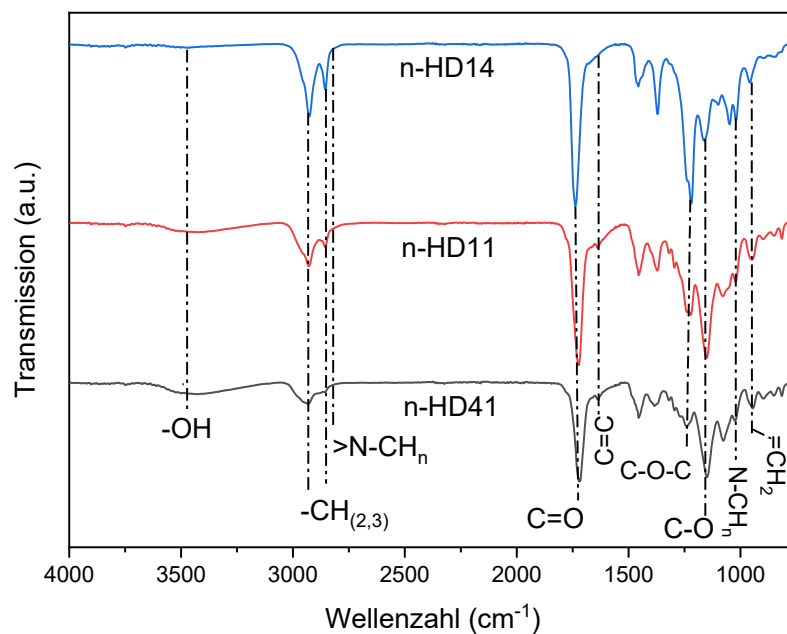
Anhang 3: Fotografische Aufnahmen der auf Siliziumwafer abgeschiedenen Hydrogelschichten mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen, hergestellt durch die Verneblermethode.

	Schichtdicken (μm):		Faltenbreite (μm):	
	Abgeschieden	Nach Lagerung in H_2O	Abgeschieden	Nach Lagerung in H_2O
n-HD14	$0,14 \pm 0,00$	$0,15 \pm 0,02$	Keine Falten	Keine Falten
n-HD11	$0,40 \pm 0,06$	$0,20 \pm 0,01$	$1,6 \pm 0,43$	$1,4 \pm 0,28$
n-HD41	$0,59 \pm 0,07$	$0,40 \pm 0,04$	$1,7 \pm 0,14$	$1,5 \pm 0,28$

Anhang 4: *Ermittelte Schichtdicken aus Profilometermessungen ($n=3$) der Hydrogelschichten, welche mittels Verneblermethode hergestellt wurden.*



Anhang 5: *Mikroskopische Aufnahmen der Hydrogelfilme, hergestellt mit der Verneblermethode bei 1500-facher Vergrößerung.*



Anhang 6: *FT-IR Spektren der auf Siliziumwafer abgeschiedenen Hydrogelschichten mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen (blau: n-HD14, rot: n-HD11, schwarz: n-HD41), hergestellt durch die Verneblermethode.*

	n-HD14	n-HD11	n-HD41
pH 4	$27^\circ \pm 6^\circ$	$28^\circ \pm 3^\circ$	$39^\circ \pm 5^\circ$
pH 7	$28^\circ \pm 6^\circ$	$34^\circ \pm 2^\circ$	$54^\circ \pm 2^\circ$
pH 10	$42^\circ \pm 8^\circ$	$41^\circ \pm 6^\circ$	$53^\circ \pm 4^\circ$

Anhang 7: Wasserkontaktwinkel der plasma-polymerisierten Hydrogele (Verneblermethode) nach Lagerung in Pufferlösungen von pH 4, 7 und 10 für die verschiedenen HD-Mischungsverhältnisse (n=3).

9 Publikationsliste

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden in Form von Fachartikeln bereits publiziert:

1. **Monique Levien**, Katja Fricke, *Fabrication of hydrogel coatings by atmospheric-pressure plasma polymerization: Function by structure and chemistry*, Mater. Today, Volume 41, December 2020, Pages 316-317 (<https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.10.020>)
2. **Monique Levien**, Zdenek Farka, Matej Pastucha, Petr Skladal, Zahra Nasri, Klaus-Dieter Weltmann, Katja Fricke, *Functional plasma-polymerized hydrogel coatings for electrochemical biosensing*, Appl. Surf. Sci., Volume 584, 15 May 2022, 152511 (<https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2022.152511>)
3. **Monique Levien**, Zahra Nasri, Klaus-Dieter Weltmann, Katja Fricke, *Study on the interaction of plasma-polymerized hydrogel coatings with aqueous solutions of different pH*, Gels 2023, 9(3), March 2023, 237; (<https://doi.org/10.3390/gels9030237>)
4. **Monique Levien**, Ihsan Amin, Felipe Vicente de Paula Kodaira, Klaus-Dieter Weltmann, *Direct grafting of microwrinkled hydrogels by atmospheric-pressure plasma polymerization: Going simple and environmentally friendly*, Eur. Polym. J., Volume 198, October 2023, 112413 (<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112413>)

Vorträge:

2018

Synthesis of polymeric hydrogel coatings with an atmospheric pressure plasma jet for biomedical applications

M. Levien, I. Amin, K.-D. Weltmann, K. Fricke

MSE – Material Science and Engineering, 26.09 – 28.09.2018, Darmstadt

2019

On the fabrication of stimuli-responsive hydrogel coatings by plasma polymerization

M. Levien, I. Amin, K.-D. Weltmann, K. Fricke

APMM – Active Polymeric Materials and Microsystems, 16.09. – 19.09.2019, Dresden

2021

Stimuli-responsive plasma-polymerized hydrogels for biosensing and biomedical applications

M. Levien, I. Amin, K.-D. Weltmann, K. Fricke

31rd Anniversary World Congress on Biosensors 26.07. – 29.07.2021, online

10 Lebenslauf

11 Eigenständigkeitserklärung

Erklärung gemäß § 4 Absatz 1 Buchstaben g und h der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock

Hiermit versichere ich, Monique Levien, dass ich die Dissertation zum Thema “Entwicklung und Charakterisierung plasma-copolymerisierter, pH-sensitiver Hydrogelschichten als Funktions- und Immobilisierungsplattform für biosensorische Anwendungen“ an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock angefertigt habe. Dabei wurde ich von Herrn Prof. Dr. Jürgen F. Kolb betreut.

Ich versichere eidesstattlich durch die eigenhändige Unterschrift, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichungen entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Die Gelegenheit zum vorliegenden Promotionsvorhaben ist mir nicht kommerziell vermittelt worden. Insbesondere habe ich keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen/Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt. Die Arbeit ist noch nicht veröffentlicht und ist in gleicher oder ähnlicher Weise noch nicht als Studienleistung zur Anerkennung oder Bewertung vorgelegt worden. Ich weiß, dass bei Abgabe einer falschen Versicherung die Prüfung als nicht bestanden zu gelten hat.

Rostock

(Abgabedatum)

(Vollständige Unterschrift)