

Biochemische piezoresistive Sensorkonzepte für die Biotechnologie und medizinische Anwendungen

Ulrike Schmidt¹, Margarita Günther¹, Gerald Gerlach¹

¹Institut für Festkörperelektronik, TU Dresden, Dresden, Deutschland

Kontakt: ulrike.schmidt@tu-dresden.de

Zusammenfassung:

Aus den Monomeren Hydroxypropylmethacrylat (HPMA), N, N-dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA), Tetraethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) und Ethylenglycol (EG) wurden Pre-Gellösungen im Molverhältnis 70:30:1:20 und 60:40:1:20 hergestellt, mittels N, N',N',N'-tetramethylethylenediamin und Ammoniumpersulfat Hydrogele polymerisiert und deren reversibles, pH-sensitives Quellverhalten verglichen. Durch den Einsatz des Fotoinitators 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropiophenon konnte die freie radikalische Fotopolymerisation etabliert und der Quellungsgrad erhöht werden. Durch Immobilisierung von Glucoseoxidase (GluOx) in HPMA/DMAEMA/TEGDMA/EG-Hydrogelscheiben wurden glucosesensitive Hydrogele erzeugt. Diese zeigten einen zunehmenden Quellungsgrad bei steigender Glucosekonzentration und reversibles Quellverhalten. Neben dem piezoresistiven Tauchsensoren werden zwei implantierbare, mit Parylene-C beschichtete Sensorkonstruktionen für medizinische Anwendungen vorgestellt. Das auf einer langen Bondabstand aus isolierten Goldbonddrähten basierende implantierbare Sensordesign erwies sich auch nach mehrtägiger Lagerung in wässrigen Medien als funktionsfähig.

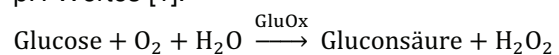
Schlagwörter: biochemischer piezoresistiver Sensor, Hydrogel, pH-sensitiv, Glucoseoxidase, glucosesensitiv

Einleitung

Sowohl für die Inline-Prozessüberwachung in der Umweltschutz- und Prozessmesstechnik, der Lebensmittel- und Pharmaindustrie als auch in der Biotechnologie sind biochemische piezoresistive Sensorkonzepte, welche auch geringste Mengen gelöster Stoffe schnell nachweisen und inline für die Überwachung (bio-)chemischer Verfahrensprozesse eingesetzt werden können, von großem Interesse. Eine neue Herausforderung stellt dabei die Integration strukturierbarer, analytensensitiver Hydrogele mit immobilisierten Biomolekülen und die Anforderungen an Implantierbarkeit und Biokompatibilität der Sensorkonzepte für medizinische Anwendungen dar.

Für den Einsatz in piezoresistiven biochemischen Sensoren werden pH-sensitive, biokompatible, dreidimensionale Hydrogele mit eingebundener Glucoseoxidase (GluOx) für den Nachweis kleinster Änderungen der Glucosekonzentration entwickelt. In Gegenwart von Sauerstoff und Wasser katalysiert Glucoseoxidase die enzymatische Reaktion von Glucose zu Gluconsäure und Wasserstoff-

peroxid. Somit bewirkt eine Erhöhung der Glucosekonzentration eine Verringerung des pH-Wertes [1].



Folglich ändert sich in Abhängigkeit von der umgebenden Glucosekonzentration der pH-Wert innerhalb des GluOx-beladenen, pH-aktiven Hydrogels. Die damit einhergehende Volumenänderung des Hydrogels kann z.B. als Masseänderung (Quellungsgrad) und im piezoresistiven Drucksensorchip als elektrische Spannungsänderung detektiert werden [2-4].

Methoden und Materialien

Materialien

Zur Anwendung kamen folgende Monomere von Sigma Aldrich:

- Hydroxypropylmethacrylat (HPMA),
- N,N-dimethylaminoethylmethacrylat (DMAEMA) und
- Tetraethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA).

Des Weiteren wurden

- Ethylenglycol (EG),

- N,N,N',N'-tetramethylethylenediamin (TEMED),
- Ammoniumpersulfat (APS),
- 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropio-phenon (HEMP),
- β -D-Glucoseoxidase und

Tabletten der phosphatgepufferten Salzlösung PBS von Sigma Aldrich verwendet. Die PBS-Tabletten wurden in deionisiertem Wasser gelöst und mit NaOH, HCl und NaCl auf PBS-Pufferlösungen mit 0,15 M Ionenstärke und unterschiedlichen pH-Werten eingestellt.

Synthesewege pH-sensitiver Hydrogele

Das Monomer DMAEMA beinhaltet pH-sensitive tertiäre Amine, HPMA dient der Einstellung des pH-Übergangs nahe dem physiologischen Bereich [1], TEGDMA wirkt als Vernetzer und EG als Lösungsmittel. Es wurden Pre-Gellösungen von HPMA, DMAEMA, TEGDMA und EG in den Molverhältnissen 70:30:1:20 und 60:40:1:20 hergestellt und für 30 min unter ständigem Rühren und Stickstoffspülung entgast.

Zur Hydrogelsynthese über Redoxpolymerisation erfolgte die Zugabe von 0,03 Vol% TEMED und 2,7 Vol% einer APS-Lösung zu den Pre-Gellösungen. Nach 5 min Rühren unter Stickstoffspülung wurden die Lösungen in eine Teflonform mit Vertiefungen der Abmaße 30 mm x 3 mm x 3 mm überführt. Um eine gleichmäßige Hydrogelformgebung und vollständige Polymerisation zu gewährleisten, wurde die mehrteilige Form mit einem Teflondeckel verschlossen, mit mehreren Schrauben fixiert und für 24 h bei 4 °C gelagert. Mittels Skalpell wurden die entformten balkenähnlichen Hydrogele in 0,3 bis 0,5 mm dünne quadratische (3 mm x 3 mm) Scheiben geschnitten.

Durch Verwendung des Fotoinitators 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropio-phenon erfolgte die freie radikalische Fotopolymerisation. Die HPMA / DMAEMA / TEGDMA / EG / HEMP - Pre-Gellösungen wurden 30 min unter Lichtabschluss und Rühren mit Stickstoff gespült. Die Polymerisation der Hydrogele erfolgte in quadratischen Formen (5 mm x 5 mm) mit einer Tiefe von 0,5 mm für 60 s unter ultraviolettem Licht (Wellenlänge ca. 365 nm).

Alle Gelstücke wurden drei Tage in deionisiertem Wasser, einen Tag in Ethanol und zwei Tage in PBS pH 7,4 gewaschen.

Glucosesensitive Hydrogele

Die Immobilisation der Glucoseoxidase erfolgte durch dreitägige Lagerung gewaschener Hydrogelscheiben der Zusammensetzung 70:30:1:20 in wässriger Lösung aus gelbem GluOx-Pulver mit einer Konzentration von 1000 units/ml. Auf diese Weise diffundierten die Enzymmoleküle in das pH-sensitive Hydrogelnetzwerk hinein und färbten das vorher transparente Gel gelblich. Anschließend wurden die Enzym-beladenen Gelstücke drei Tage in PBS pH 7,4 gewaschen. Die gelbliche Färbung blieb erhalten.

Aus den beschriebenen Synthesewegen entstanden die in Tabelle 1 aufgelisteten Hydrogele.

Tab. 1: synthetisierte Hydrogele

| | HPMA/DMA-EMA/TEGDMA/EG | Polymerisation | Enzym |
|------------|------------------------|----------------|-------|
| Hydrogel 1 | 70:30:1:20 | Redox | - |
| Hydrogel 2 | 60:40:1:20 | Redox | - |
| Hydrogel 3 | 70:30:1:20 | UV | - |
| Hydrogel 4 | 70:30:1:20 | Redox | GluOx |

pH-Quellungsanalysen

Die Hydrogelscheiben wurden bei Raumtemperatur (21-22 °C) abwechselnd in PBS-Pufferlösungen der pH-Werte 4 und 8 eingelegt. Nach durchschnittlich 30 min wurden die Scheiben aus dem jeweiligen pH-Testpuffer entnommen, mit einem Labortuch die oberflächlichen Flüssigkeitsrückstände abgetupft und die Gelscheibe gewogen. Der Quellungsgrad QG der einzelnen Gelstücke bestimmte sich zu $QG = m/m_0$, mit der Masse m des im pH-Puffer gequollenen und m_0 der Masse des Hydrogels nach dreitägiger Lagerung in deionisiertem Wasser.

Glucosequellungsanalysen

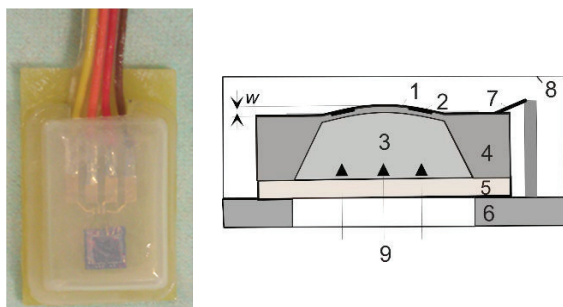
Für die Quellungsuntersuchungen zur Glucosesensitivität wurden PBS-Testlösungen des physiologischen pH-Wertes von 7,4 mit Glucosekonzentrationen von 0, 2 und 20 mmol/l hergestellt. Die mit Glucoseoxidase beladenen Gelscheiben wurden zu Beginn der Versuchsreihe für je vier Stunden und folgend zwei Stunden in den PBS-Glucose-Lösungen belassen und anschließend dem gleichen

Wägeprozess unterzogen, wie bei den pH-Quellungsanalysen.

Sensorkonstruktionen

Die Sensorkonstruktionen basieren auf $5 \times 5 \times 0,4 \text{ mm}^3$ großen piezoresistiven Drucksensorchips (C41-Serie, Epcos, München/Deutschland).

Beim Aufbau der Tauchsensoren (s. Abb. 1) diente eine individuell gefertigte Leiterplatte (Beta Layout, Aarbergen/Deutschland) als Substrat. Auf eine der Leiterplatte befindliche Öffnung wurde eine poröse Al_2O_3 -Membran (0,2 μm Anopore™, Structure Probe, SPI Supplies, West Chester/USA) aufgebracht. Anschließend wurde ein Hydrogelstück auf der Membrane platziert, der Drucksensorchip mit der Kavität nach unten über dem Hydrogel positioniert und mit Klebstoff fixiert. Die Kontaktierung zwischen Sensorchip und Leiterplatte erfolgte mittels Bonddrähten. Zum Schutz vor den wässrigen Analysemedien wurden die elektrischen Bauteile mit einer Silikonkappe versehen.



a)

b)

Abb. 1: Tauchsensoren (a) und sein Aufbau im Querschnitt (b) [5]: 1 Biegeplatte, 2 piezoresistive Widerstandsbrücke, 3 Kavität mit Hydrogel, 4 Si-Chip, 5 poröse Membran, 6 Substrat mit Öffnungen, 7 Kontakt, 8 Kappe, 9 Analytlösung

Die Analytmoleküle des wässrigen Testmediums diffundieren durch die Öffnung und die Al_2O_3 -Membran hindurch in die mit Hydrogel gefüllte Kavität und bewirken eine Volumenänderung des Hydrogels. Dies hat eine Änderung der Auslenkung w der Biegeplatte zur Folge. Die piezoresistive Widerstandsbrücke wandelt die mechanische Spannungsänderung der Biegeplatte in ein elektrisches Signal U_{aus} , welches über die Bond- und Lötkontakte ausgelesen wird.

Neben den Tauchsensoren werden zwei implantierbare, konzeptionell unterschiedliche Sensoraufbauten entwickelt.

Das in Abb. 2 dargestellte Sensorkonzept basiert auf der Verwendung isolierter Goldbonddrähte (X-Wire™ Technologie, Microbonds Inc., Markham, Ontario/Canada). Ohne Nutzung eines direkten Substrats besteht der Unterbau des Drucksensorchips aus der porösen Membran und einem Siliziumrahmen. Wie beim Tauchsensoren befindet sich das analytsensitive Hydrogel zwischen Anopore-Membran und der Biegeplatte in der Kavität des Drucksensorchips. Mittels der isolierten Goldbonddrähte wurde eine Distanz von ca. 4 cm zwischen dem Chipaufbau und der Leiterplatte überbrückt. Zur Verstärkung der Bondkontakte und Stabilisierung der Bondstanz wurde medizinischer Epoxydharzkleber (Loctite M-31CL, Brammer GmbH, Dresden/Deutschland) auf die Bondstellen aufgebracht, die Bonddrähte mit chirurgischem Draht verknotet und zusätzlich mit medizinischem Silikon (MED-4211, NuSil Technology Europe, Mougins/Frankreich) ummantelt. Abschließend wurde der gesamte Sensoraufbau im PVD-Prozess mit einer ca. 5 μm dicken Parylene-C-Schicht verkapselt (Microelectronic Packaging, Dresden/Deutschland).

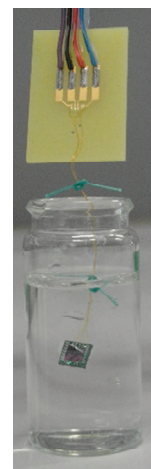
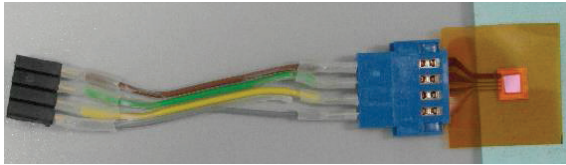


Abb. 2: Implantierbarer Sensor mit isolierten Goldbonddrähten in pH-Pufferlösung

Abb. 3 zeigt den Testaufbau eines implantierbaren und flexiblen Sensors. Im Goldbedampfungsprozess wurden die individuell entwickelten Leitbahnstrukturen via Keramikmaske auf biokompatible, 50 μm dünne Polyimidsubstrate (Kapton) aufgebracht. Zur Gewährleistung einer freien Auslenkung der Biegeplatte wurde ein $3 \times 3 \text{ mm}^2$ großes Fenster in die Kaptonfolie geschnitten. Mittels Flip-Chip-Bonden wurde der Drucksensorchip auf der Leitbahnstruktur fixiert. Die durch eine

einseitig selbstklebende Kaptonfolie fixierte poröse Membran schließt das Hydrogel in der



Kavität ein. Zudem schützt die zweite Schicht Polyimidfolie die Goldleitbahnen vor Flüssigkeit.

Abb. 3: Testaufbau eines flexiblen, implantierbaren Sensors mit Stecker

Vor der Sensorherstellung wurden die Hydrogelstücke entsprechend dem Syntheseweg gewaschen und zur Konditionierung drei Quell-/Entquellzyklen unterzogen.

Ergebnisse

Die Messpunkte der dargestellten Diagramme zum Quellverhalten der untersuchten Hydrogele (s. Abb. 4, 5 und 6) entsprechen dem arithmetischen Mittel aus je drei Hydrogelscheiben.

pH-Quellungsanalysen

Die Abb. 4 zeigt vergleichend den Quellungsgrad der pH-sensitiven, redoxpolymerisierten Hydrogele 1 und 2 (s. Tab. 1) in Abhängigkeit vom pH-Wert und als Funktion der Quellzeit.

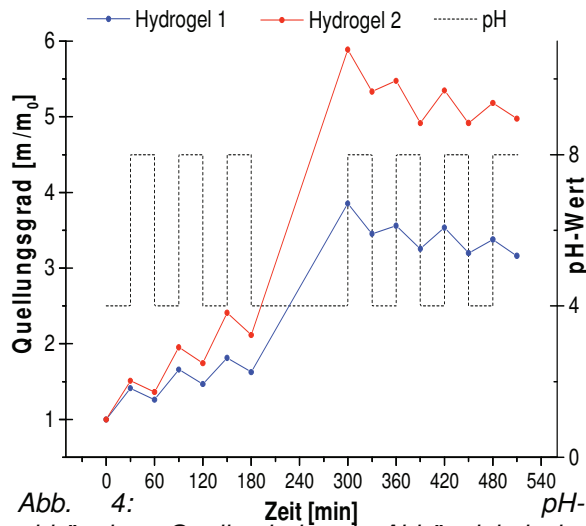


Abb. 4: pH-abhängiges Quellverhalten in Abhängigkeit der chemischen Zusammensetzung der redoxpolymerisierten Hydrogele 1 (30 mol% DMAEMA) und 2 (40 mol% DMAEMA) (s. Tab. 1)

In der Abb. 5 ist die Abhängigkeit des Quellverhaltens von der Art der Polymerisation dargestellt. Dazu wird das Quellverhalten des

redoxpolymerisierten Hydrogels 1 mit dem des UV-polymerisierten Hydrogels 3 (s. Tab. 1) verglichen.

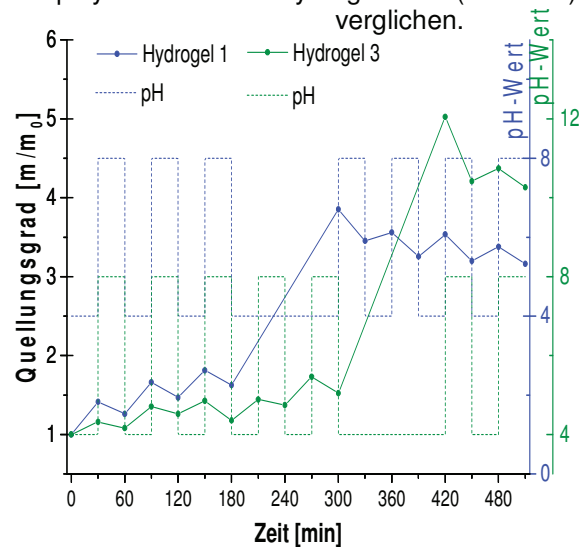


Abb. 5: pH-abhängiges Quellverhalten in Abhängigkeit der Art der Polymerisation der Hydrogele 1 (redoxpolymerisiert) und 3 (UV-polymerisiert) (s. Tab. 1)

Glucosequellungsanalysen

In der Abb. 6 wird das Quellverhalten der Glucoseoxidase enthaltenden Gelscheiben (Hydrogel 4, s. Tab. 1) als Quellungsgrad in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration c_{Glucose} im PBS-Testmedium (pH 7,4) dargestellt.

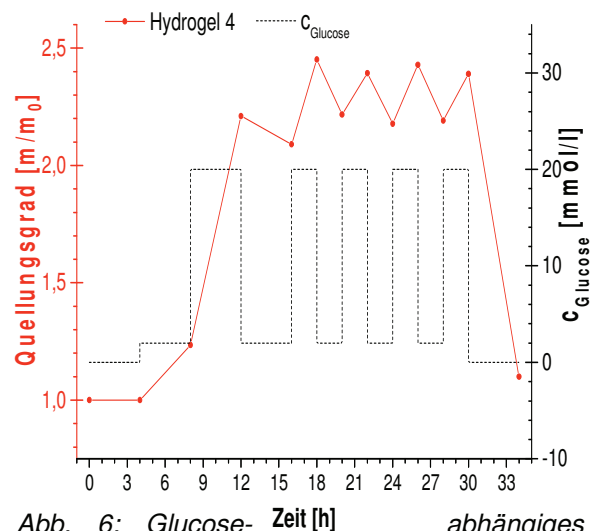
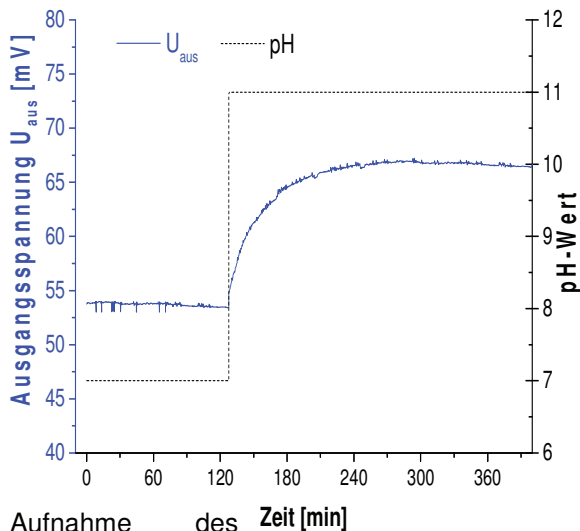


Abb. 6: Glucose-abhängiges Quellverhalten des GluOx-beladenen Hydrogels 4 (s. Tab. 1) in PBS-Lösungen mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen (0, 2 und 20 mmol/l). Die PBS-Glucose-Testmedien waren auf den physiologischen pH-Wert von 7,4 eingestellt

Sensorkonstruktionen

Die Abb. 7 zeigt den Verlauf der Ausgangsspannung U_{aus} eines implantierbaren Sensors (s. Abb. 3) als Funktion der Zeit in Abhängigkeit vom pH-Wert. Als pH-sensitives Hydrogel wurde hier ein Polyvinylalkohol/Polyacrylsäure-Gel (PVA/PAS) eingesetzt. Vor



Aufnahme des Zeit [min] Spannungsverlaufs lagerte der Sensor sieben Tage in deionisiertem Wasser.

Abb. 7: pH-abhängiger Spannungsverlauf U_{aus} eines implantierbaren Sensors (s. Abb. 3) mit PVA/PAS-Hydrogel nach siebentägiger Lagerung in deionisiertem Wasser

Diskussion

pH-Quellungsanalysen

Als pH-aktive Seitengruppe des DMAEMA wird das tertiäre Amin in saurer Umgebung protoniert. Daraus resultiert die Massezunahme bzw. Quellung der synthetisierten HPMA/DMAEMA/TEGDMA/EG-Hydrogele in PBS mit pH 4. Folglich kommt es bei pH 8 zur Deprotonierung der tertiären Aminogruppe und zur Entquellung des Hydrogels (vgl. Abb. 4, 5). Wie Abb. 4 veranschaulicht, ließ sich bereits nach 30 min Quellzeit eine messbare Änderung des pH-sensitiven Quellungsgrades der HPMA/DMAEMA/TEGDMA/EG-Hydrogele feststellen. Wurden die Gelstücken dem Testmedium längere Zeit ausgesetzt, nahm der Quellungsgrad zu. So erhöhte sich der Quellungsgrad des Hydrogels 1 von $QG_{\text{pH}4,30\text{min}} = 1,8$ auf $QG_{\text{pH}4,120\text{min}} = 3,9$ in PBS pH 4. Durch Erhöhung des DMAEMA-Anteils von 30 mol% (Hydrogel 1) auf 40 mol% (Hydrogel 2) lässt sich der absolute Quellungsgrad als auch die Differenz der

Quellungsgrade zwischen pH 4 und pH 8 steigern (s. Abb. 4).

Wie Abb. 5 zeigt, konnte durch Etablierung der UV-Polymerisation mittels des Fotoinitators 2-Hydroxy-4'-(2-hydroxyethoxy)-2-methylpropio-phenon der Quellungsgrad der Pre-Gelzusammensetzung 70:30:1:20 nach fünf Konditionierungszyklen erhöht werden. Im PBS-Testmedium pH 4 betrug der maximale Quellungsgrad des redoxpolymerisierten Hydrogel $QG_{\text{max,pH}4} = 3,9$ (Hydrogel 1) und des fotopolymerisierten Gel $QG_{\text{max,pH}4} = 5$ (Hydrogel 3). Ebenso wie bei den redoxpolymerisierten Hydrogelen wurde der Quellungsgrad auch bei dem durch ultraviolettes Licht polymerisierten Gel durch die Expositionsdauer im Analysemedium beeinflusst. Infolge der verlängerten Lagerung in PBS pH 4 stieg der Quellungsgrad von $QG_{\text{pH}4} = 1,7$ auf $QG_{\text{pH}4} = 5$ an (s. Abb. 5).

Glucosequellungsanalysen

Nachdem die auch nach dreitägigem Waschprozess beständige gelbliche Färbung als Indikator für die erfolgreiche Immobilisierung der Glucoseoxidase in den Hydrogelscheiben angenommen wurde, bestätigten die in Abb. 6 dargestellten Quellungsanalysen die glucoseabhängige Masseänderung der Gelstücke. Mit steigender Glucosekonzentration (20 mmol/l) nahm der Quellungsgrad zu und in geringerer Glucosekonzentration (2 mmol/l) wieder ab. Nach zunächst vierstündiger Lagerdauer in den Glucose-PBS-Testlösungen konnte die Expositionszeit auf 2 h verkürzt werden. Trotz verkürzter Quellzeit stieg der Quellungsgrad in PBS $c_{\text{Glucose}} = 20$ mmol/l von vormals $QG_{20\text{mmol/l}} = 2,2$ nach 4 h auf $QG_{20\text{mmol/l}} = 2,45$ nach nur noch 2 h im Testmedium. In den folgenden Quell-/Entquellzyklen erreichten die enzymbeladenen Hydrogelstücke stabile reversible Quellungsgrade von $QG_{20\text{mmol/l}} \approx 2,4$ und $QG_{2\text{mmol/l}} \approx 2,2$. Zudem zeigte der abschließend nach vierstündiger Lagerung in PBS pH 7,4 mit $c_{\text{Glucose}} = 0$ mmol/l gemessene Quellungsgrad $QG_{0\text{mmol/l}} \approx 1,1$, dass die Gele wieder nahezu auf ihren Ausgangszustand entquollen waren.

Sensorkonstruktionen

Der Graph in Abb. 7 erbrachte den Nachweis der Funktionsfähigkeit eines implantierbaren Sensors auch nach siebentägiger Lagerung in deionisiertem Wasser. Das verwendete PVA/PAS-Hydrogel quillt mit steigendem pH-Wert [6]. Eingetaucht in einen pH-Puffer mit pH 7, maß der Sensor eine Ausgangsspannung von ca. 54 mV. Mit dem Wechsel auf pH 11 fing das Hydrogel an zu quellen, U_{aus} stieg

sprunghaft an und nahm nach ca. 2 h einen konstanten Wert von 67 mV an.

Literatur

- [1] D.-Y. Jung, J. J. Magda, I. S. Han, Catalase effects on glucose-sensitive hydrogels, *Macromolecules* 2000, 33 (9), 3332-3336; doi: 10.1021/ma992098b
- [2] M. Günther, G. Gerlach, Hydrogels for chemical sensors, *Hydrogel Sensors and Actuators, Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*, Springer-Verlag, 2009, Vol. 6, Berlin Heidelberg, 165-195
- [3] M. Günther, G. Gerlach, T. Wallmersperger, Piezoresistive biochemical sensors based on hydrogels, *Microsystem Technologies* 16 (2010), 703-715; doi: 10.1007/s00542-009-0978-z
- [4] M. Günther, G. Gerlach, T. Wallmersperger, Nonlinear effects in hydrogel-based chemical sensors: Experiment and Modeling, *J. Intell. Material Syst. Struct.* 20 (2009), 949-961; doi: 10.1177/1045389X08101562
- [5] U. Schmidt, M. Günther, D. Simon, G. Gerlach, Biochemische piezoresistive Sensoren für die Immunodiagnostik, *Tagungsband des 5. Dresdner Medizintechnik Symposiums*, Dresden, Dezember 2014
- [6] K.-F. Arndt, A. Richter, S. Ludwig, J. Zimmermann, J. Kressler, D. Kuckling, H.-J. Adler, Poly(vinyl alcohol)/poly(acrylic acid) hydrogels: FT-IR spectroscopic characterization of crosslinking reaction and work at transition point, *Acta Polym.* 1999, 50, 383-390

Danksagung

Die Autoren danken Herrn Sergej Zigler von der Microelectronic Packaging Dresden GmbH für die Beschichtung der implantierbaren Sensoren mit Parylene-C und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Promotionsprojektes im Rahmen des GRK 1865 „Hydrogel-basierte Mikrosysteme“.