

Silber-freie Referenzelektrode für in vivo Sensorik

Nils Bork¹, S. Reinelt¹, A. Weltin¹, M. Döring¹, N. Rosskoth-Kuhl², S. J. Rupitsch^{1,3}, J. Kieninger^{1,3}

¹Institut für Mikrosystemtechnik – IMTEK, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland

²Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Sektion für experimentell-klinische Otologie, Neurobiologisches Forschungslabor, Universitätsklinikum Freiburg, Medizinische Fakultät, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland

³BrainLinks-BrainTools Center, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, Deutschland
Kontakt: nils.bork@merkur.uni-freiburg.de

Einleitung

Ein bestehendes Problem in der elektrochemischen in vivo Sensorik ist die Verwendung einer geeigneten Referenzelektrode (RE). Als weit verbreiteter Standard hat sich die Silber/Silberchlorid-Elektrode (Ag/AgCl) in Form eines chlorierten Silberdrahts etabliert (s. Abb. 1A). Allerdings wurde sowohl für Silber als auch für Silberchlorid eine zytotoxische Wirkung nachgewiesen [1]. Somit ist die Ag/AgCl-RE für chronische Tierversuche ungeeignet und eine Implantation im Menschen ausgeschlossen. Weltin et al. [2, 3] haben demonstriert, dass sich Platin-Elektroden von Cochlea-Implantaten (CI) als Arbeitselektrode (engl. working electrode, WE) beziehungsweise Gegenelektrode (engl. counter electrode, CE) für elektrochemische in vivo Messungen oxidativer Spezies eignen.

Das Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung eines Konzepts zur Verwendung einer weiteren Implantat-Elektrode auf Platin-Basis als RE (s. Abb. 1B). Infolgedessen ist für elektrochemische Messungen neben dem Implantat keine zusätzliche Elektrode zu implantieren. Aufgrund der komplexen Potentialbildung sowie seiner Polarisierbarkeit scheint Platin (Pt) zunächst nur bedingt für den Einsatz als RE geeignet. Im Rahmen dieser Arbeit wurde demonstriert, dass eine gezielte in situ Oberflächenmodifikation durch zyklische Polarisierung stabile und reproduzierbare

Referenzpotentiale mit geringer Drift ermöglicht. Die Funktionalität des Konzepts wurde durch Langzeitmessungen an analytischen Pt-Elektroden sowie Cl-Stimulationselektroden bestätigt. Die Vorkonditionierung kann sowohl chronoamperometrisch als auch chronopotentiometrisch erfolgen, wodurch die Notwendigkeit einer Ag/AgCl-Elektrode obsolet wird. Es konnte zudem gezeigt werden, dass ein Sensorprotokoll zur Messung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit einer Pt-RE angewendet werden kann.

Materialien und Methoden

Chemikalien

Für die Durchführung der Messungen wurde eine phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline, PBS) bei einem pH von 7,4 als Elektrolyt verwendet, hergestellt aus 85,15 mM Na_2HPO_4 , 14,82 mM NaH_2PO_4 und 100 mM NaCl. Für die H_2O_2 -Messungen wurde eine 10 mM H_2O_2 Lösung aus einer 30 %-igen H_2O_2 -Stammlösung mit deionisiertem Wasser (DI-Wasser) angesetzt.

Setup

Die Messungen wurden zunächst mit analytischen Disk Pt-Elektroden (932-00024, Gamry) mit 3 mm Durchmesser als WE und Pt-RE durchgeführt. Eine Platinstab-Elektrode mit 2 mm Durchmesser wurde als CE verwendet. Im Anschluss wurde die

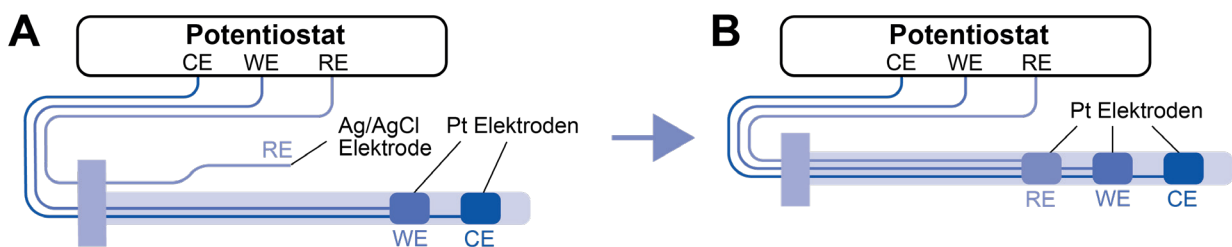


Abb. 1: Darstellung eines Implantats als elektrochemischer Sensor unter Einsatz einer Ag/AgCl-Elektrode als RE (links) und einer Platin-Stimulationselektrode als RE (rechts) (nach [3]). WE: Arbeitselektrode, CE: Gegenelektrode.

Funktionalität bei Neuroimplantat-Elektroden bestätigt. Hierfür wurden als Pt-RE und WE die Elektroden eines dreikanaligen CIs für Tierexperimente (MED-EL) sowie ein Titanblech mit einer Fläche von ca. 2 cm^2 (009471, CHEMPUR) als CE genutzt. Zur Konditionierung der Pt-RE sowie zur Überwachung des Potentials der konditionierten Pt-RE wurde eine kommerzielle Ag/AgCl-Referenzelektrode (6.0733.100, Metrohm), gefüllt mit 3 M KCl, verwendet.

Die elektrochemischen Messungen wurden in einem 3-Elektroden-Aufbau mit einem CompactStat-Potentiostat (IVIUM Technologies) durchgeführt. Eine Pt-Elektrode wurde zunächst gegenüber einer Ag/AgCl Elektrode vorkonditioniert. Sie wurde im Anschluss als Pt-RE verwendet und eine zweite Pt-Elektrode als Arbeitselektrode. Die Potentialdifferenz zwischen der Pt-RE-Elektrode und der Ag/AgCl-Elektrode wird über einen Instrumentierungsverstärker (INA 116) mittels eines Oszilloskops (PicoScope2207, Pico Technology) aufgezeichnet.

Protokolle

Vorkonditionierung

Die Vorkonditionierung der Pt-RE erfolgte gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode unter Anwendung eines chronoamperometrischen oder chronopotentiometrischen Protokolls. In der chronoamperometrischen Vorkonditionierung (s. Abb. 2A) wurde die Elektrode 10-mal für jeweils 5 s abwechselnd auf $-0,3 \text{ V}$ und $0,8 \text{ V}$ polarisiert. Im Anschluss folgt eine Polarisierung der Elektrode für 30 s auf ein Potential nahe ihres vermuteten Gleichgewichtspotentials. Die zur chronopotentiometrischen Konditionierung der Elektrode eingesetzte Stromstärke ist von der Größe und dem Zustand der Elektrode abhängig und muss für die jeweiligen Messungen entsprechend angepasst werden. Für die analytischen Pt-Elektroden wird 10-mal ein Strompuls mit einer kathodischen Phase ($-18 \mu\text{A}$) und einer anodischen Phase ($15 \mu\text{A}$) für jeweils 5 s angelegt, gefolgt von einer Vorpolarisierung auf ein Potential nah des Gleichgewichtspotentials für 30 s mit einer Stromstärke von $-0,35 \mu\text{A}$ (s. Abb. 2B). Bei den CI-Elektroden liegen die Stromstärken bei $-1,4 \mu\text{A}$, $0,6 \mu\text{A}$ und $-0,01 \mu\text{A}$.

Pt-RE Stabilitätsmessung

Um die Stabilität der vorkonditionierten Pt-RE zu überprüfen, wurden Langzeitmessungen über 16 bzw. 25 Stunden in luftgesättigtem Elektrolyten durchgeführt. Dabei wurde an einer Pt-WE zyklische Voltammetrie durchgeführt, wobei die Potentialgrenzen an die jeweiligen Bezugspotentiale innerhalb des Wasserfensters angepasst wurden. Die Änderung

des Pt-RE-Bezugspotentials wurde als Potentialdifferenz gegenüber einer kommerziellen Ag/AgCl-Elektrode mithilfe eines Oszilloskops (jeweils ein gemittelter Wert über 5 s) gemessen.

Wasserstoffperoxid-Sensorprotokoll

Das Sensorprotokoll dient der Evaluierung der Anwendbarkeit der vorkonditionierten Pt-RE. Das vorliegende Protokoll wurde von Weltin et al. [3] übernommen.

Die Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zur PBS-Lösung führt eine weitere Redox-aktive Spezies neben dem Sauerstoff ein. Unter geeigneten anodischen Potentialen kann H_2O_2 oxidiert und unter kathodischen Potentialen reduziert werden. Während der kathodischen Phase des Sensorprotokolls überlagern sich daher die Strombeiträge sowohl der Sauerstoffreduktion als auch der Reduktion von Wasserstoffperoxid. Das Protokoll setzt sich aus vier Phasen zusammen: $0,8 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl für 1 s, $0,5 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl für 4 s (anodischer Messschritt), $-0,4 \text{ V}$ für 1 s und $-0,3 \text{ V}$ für 4 s (kathodischer Messschritt). Im Anschluss an das vierstufige chronoamperometrische Protokoll erfolgt die Aufzeichnung des OCP über einen Zeitraum von 10 s. Die Potentialmessung der Pt-RE erfolgt gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode unter Verwendung eines Oszilloskops. Die

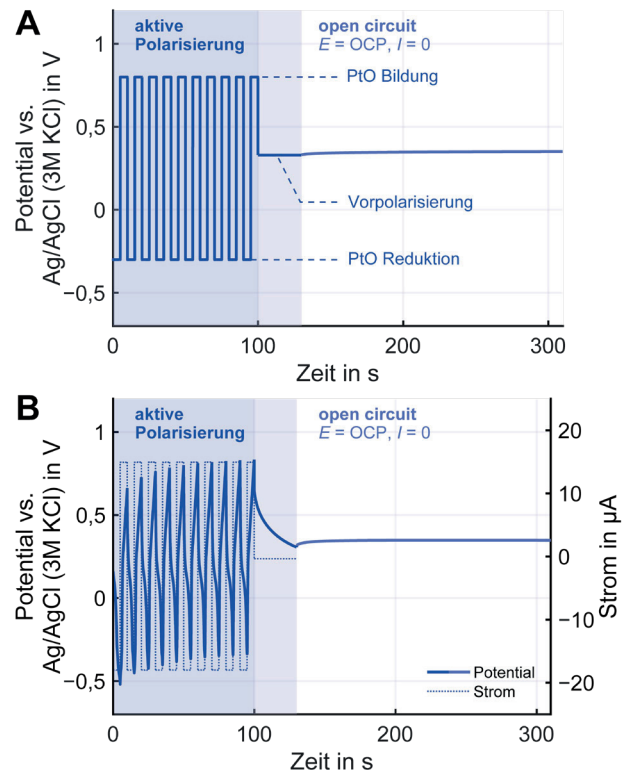


Abb. 2: Zyklische Vorkonditionierung einer Pt-Elektrode als chronoamperometrisches (A) und chronopotentiometrisches (B) Protokoll zur Etablierung eines konstanten Referenzpotentials.

Konzentration des Analyten wird durch die Mittelung der jeweiligen Strombeiträge über die letzte Sekunde des anodischen und kathodischen Messschritts bestimmt. Der Strom fungiert als Indikator für die Konzentration des Analyten.

Ergebnisse und Diskussion

Vorkonditionierung der Pt-RE

Zur Etablierung eines stabilen Potentials, welches als elektrochemisches Referenzpotential verwendet werden kann, wird die Pt-Elektrode vorkonditioniert (s. Abb. 2). Durch das chronoamperometrische (s. Abb. 2A) bzw. chronopotentiometrische (s. Abb. 2B) Protokoll wird die Oberfläche der Elektrode wechselnd oxidiert und reduziert und anschließend kontrolliert mit Oxid belegt. Die anschließende OCP-Messung zeigt für beide Arten der Vorkonditionierung die Einstellung eines konstanten Potentials. Im Gegensatz zu konventionellen Referenzelektroden ist der Prozess der Potentialbildung bei Pt nicht klar definiert, was die Stabilisierung des Potentials grundsätzlich erschwert. Dieser Problematik wirkt die "aktive Polarisierung" entgegen. Das im Anschluss gemessene Gleichgewichtspotential lässt sich als Mischpotential interpretieren, das sich vermutlich durch eine Kombination verschiedener Prozesse, insbesondere der Platinoxidbildung und der Reduktion von molekularem Sauerstoff, einstellt [4].

Überprüfung der Stabilität der Pt-Referenzpotentiale
Die Stabilität der vorkonditionierten analytischen Pt-RE wurde über einen Zeitraum von 25 Stunden untersucht, indem kontinuierlich zyklische Voltammogramme (engl. cyclic voltammograms, CVs) an einer Pt-WE aufgezeichnet und gleichzeitig das Potential der Pt-RE gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode mittels Oszilloskops überwacht wurde. Abbildung 3 zeigt die aufgenommenen CVs sowie die Veränderung des Pt-RE-Potentials nach chronoamperometrischer (Abb. 3A/C) und chronopotentiometrischer (Abb. 3B/D) Vorkonditionierung. Die Potentialgrenzen der CVs verschieben sich entsprechend dem Anfangswert der Pt-RE in negative Richtung, während die charakteristischen Merkmale der Pt-CVs erhalten bleiben (vgl. Abb. 3A und 3B). In Abbildung 3A ist eine leichte Verschiebung der Oberflächenreaktionen an der WE im CV in negative Richtung über die Zeit zu beobachten. Diese Verschiebung korreliert mit der Änderung des Referenzpotentials der Pt-RE. Für die chronoamperometrische Vorkonditionierung wurde eine Potentialdifferenz von $-0,1$ mV bis $16,3$ mV gegenüber dem initialen Referenzpotential gemessen. Ebenso zeigen die CVs in Abbildung 3B nur eine geringe Drift über die Messdauer, was ebenfalls mit der Veränderung des Pt-RE-Potentials übereinstimmt. Hier liegt die Potentialdifferenz zwischen $-5,7$ mV und $6,7$ mV. Diese Resultate legen nahe, dass sowohl die chronoamperometrische als auch die

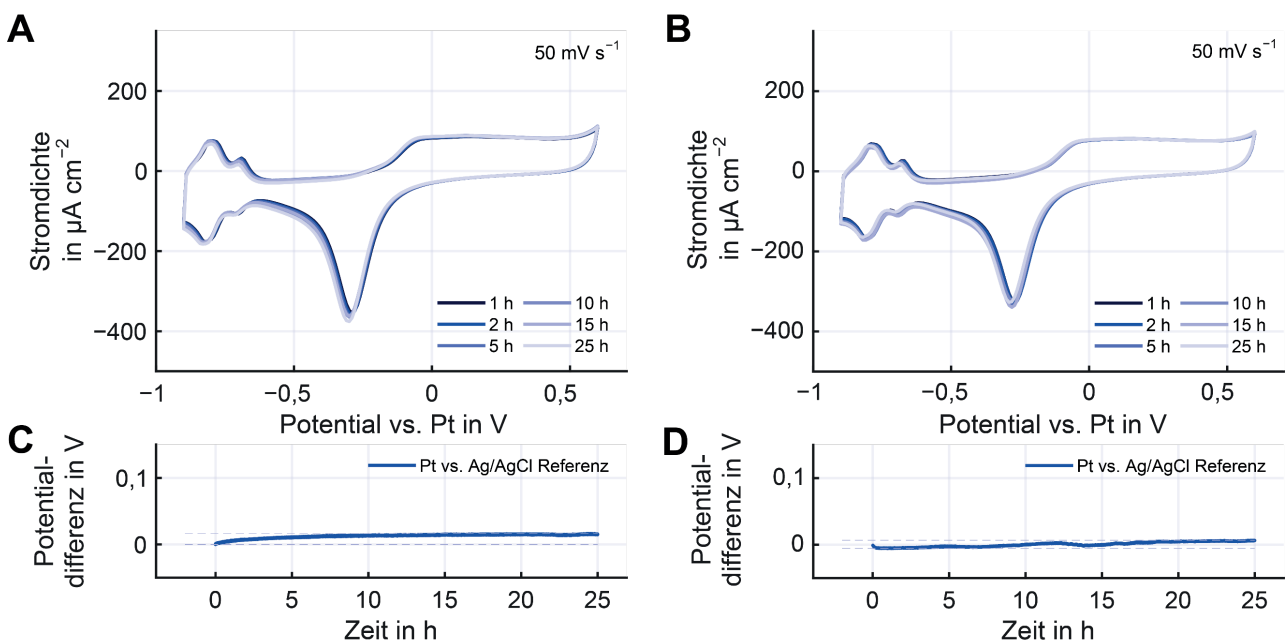


Abb. 3: Kontinuierliche zyklische Voltammetriemessung gegenüber der chronoamperometrisch vorkonditionierten analytischen Pt-RE (A, C), bzw. chronopotentiometrisch vorkonditionierten analytischen Pt-RE (B, D), über 25 Stunden zur Bestimmung der Stabilität der Pt-RE. Die Änderung des Referenzpotentials Pt-RE wurde gegenüber einer Ag/AgCl-RE mit dem Oszilloskop überwacht.

chronopotentiometrische Vorkonditionierung ein stabiles Referenzpotential der Pt-RE gewährleisten und die Stabilität der Pt-RE unabhängig von der gewählten Vorkonditionierungsmethode ist. Abbildung 4 zeigt die Stabilität der Pt-RE auf einem CI über eine Dauer von 16 Stunden. Die CVs wurden an einer CI-WE, die sich auf einem separaten Implantat befindet, gegenüber der vorkonditionierten CI-Pt-RE aufgezeichnet, während die Potentialänderung der CI-Pt-RE gegenüber einer Ag/AgCl-Referenzelektrode mittels Oszilloskops erfasst wurde. Auch hier erfolgt eine Verschiebung der Potentialgrenzen der CVs entsprechend des neuen Bezugspotentials. Abbildung 4A zeigt die Drift der CVs nach chronoamperometrischer Vorkonditionierung. Es lässt sich erkennen, dass sich die charakteristischen Merkmale der CVs in Richtung negativer Potentiale verschieben, was zu einer

Verschiebung des Beginns der Sauerstoffentwicklung führt. Diese Verschiebung begünstigt eine erhöhte Sauerstoffproduktion, was sich in einer veränderten Form der CVs im Bereich der Wasserstoffadsorption zeigt, da eine größere Menge molekularen Sauerstoffs an der Elektrode reduziert werden kann. Die Drift der CVs spiegelt sich in der Verschiebung des Referenzpotentials (Abb. 4C) wieder. Bei der chronoamperometrischen Vorkonditionierung wurde eine Potentialdifferenz von $-0,3$ mV bis $58,2$ mV gegenüber dem initialen Referenzpotential gemessen. In Abbildung 4B ist die Drift der CI-Pt-RE, deren Potential gegenüber einer Ag/AgCl-RE in Abbildung 4D dargestellt ist, anhand einer Verschiebung der Oberflächenreaktionen an der CI-WE in negative Richtung erkennbar. Nach chronopotentiometrischer Vorkonditionierung ergab sich eine Abweichung des

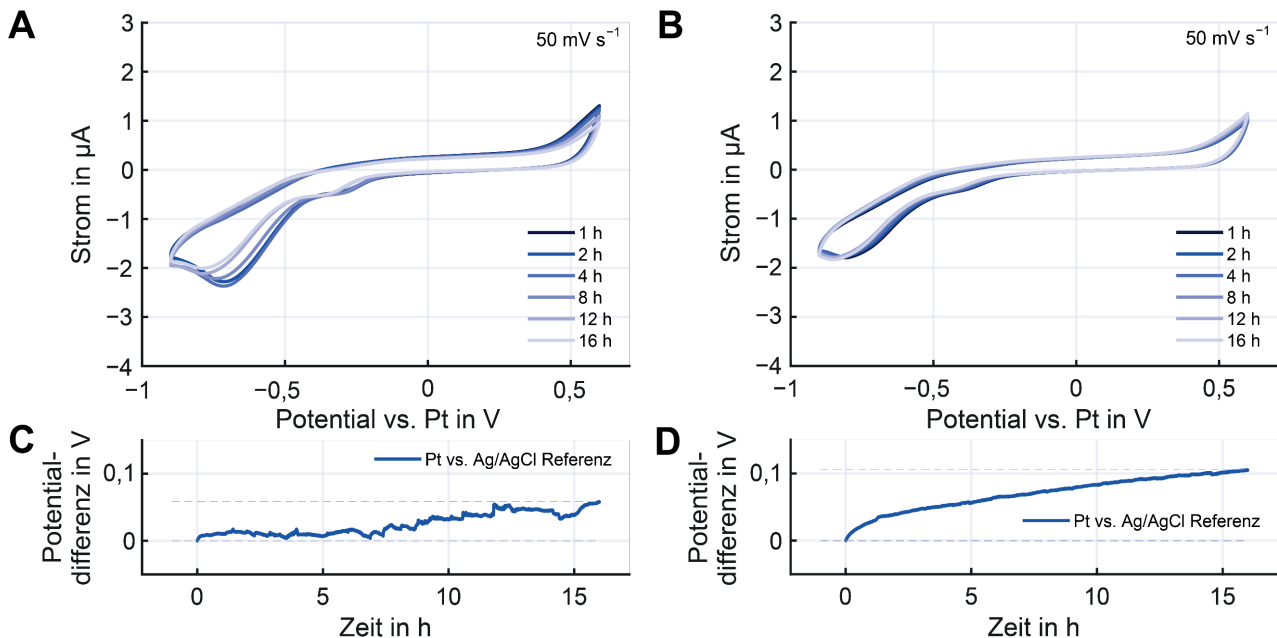


Abb. 4: Kontinuierliche zyklische Voltammetriemessung gegenüber der chronoamperometrisch vorkonditionierten CI-Pt-RE (A, C), bzw. chronopotentiometrisch vorkonditionierten CI-Pt-RE (B, D), über 16 Stunden zur Bestimmung der Stabilität der Pt-RE. Die Änderung des Referenzpotentials der Pt-RE wurde gegenüber einer Ag/AgCl-RE mit dem Oszilloskop überwacht.

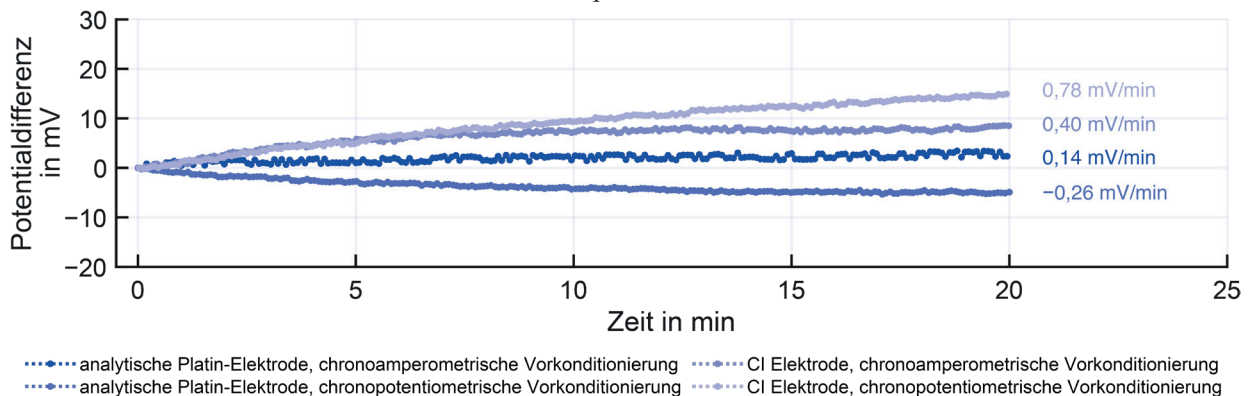


Abb. 5: Stabilität der Pt-Referenzpotentiale in den ersten 20 min. Berechnet wurde jeweils die mittleren Steigungen zur Bewertung der Stabilität.

Referenzpotentials zwischen $-0,1$ mV und $105,4$ mV. Diese größeren Schwankungen bei der Verwendung von Cl-Elektroden lassen sich möglicherweise durch die Oberflächenbeschaffenheit der Elektrode erklären, insbesondere durch eine erhöhte Rauigkeit. Des Weiteren könnten Verunreinigungen der Elektrode sowie eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Umgebungsbedingungen, wie der Adsorption von Molekülen, zu den beobachteten Potentialschwankungen der Referenzelektrode beitragen. Die genaue Ursache für die Instabilität der Cl-Pt-RE lässt sich jedoch nicht mit hinreichender Sicherheit bestimmen. Da bei in vivo Messungen keine Messdauer von mehreren Stunden ohne erneute Konditionierung der Referenzelektrode vorgesehen ist, liegt der Fokus insbesondere auf den Potentialänderungen der Pt-Referenzelektrode (Pt-RE) zu Beginn der Messungen. In Abbildung 5 sind daher die Potentialdifferenzen vom Initialwert innerhalb der ersten 20 Minuten der vier Langzeitmessungen dargestellt. Zur Bewertung der Stabilität wurden die mittleren Steigungen der Potentialverläufe der vorkonditionierten Referenzelektroden berechnet. Die mittlere Steigung des Bezugspotentials für die analytische Pt-RE nach chronoamperometrischer Vorkonditionierung beträgt

$0,14$ mV/min; nach chronopotentiometrischer Vorkonditionierung $-0,26$ mV/min. Die mittlere Steigung des Referenzpotentials für die Cl-Pt-RE beträgt im Falle der chronoamperometrischen Vorkonditionierung $0,40$ mV/min; nach chronopotentiometrischer Vorkonditionierung $0,78$ mV/min. Diese Ergebnisse zeigen, dass das Referenzpotential in allen Messungen im Mittel um weniger als 1 mV/min variiert.

Validierung der Pt-RE in Sensor-Protokollen

Zur Bestätigung der Eignung von Pt als elektrochemische Referenzelektrode wurde eine analytische Pt-Elektrode als Referenz bei der Bestimmung der H_2O_2 -Konzentration eingesetzt (Abb. 6). Als Referenzelektrode wurde eine chronoamperometrisch vorkonditionierte analytische Pt-RE verwendet. Wie in Abbildung 6B ersichtlich, ist sowohl bei anodischer als auch bei kathodischer Polarisierung ein signifikanter Strombeitrag erkennbar. Während des anodischen Messschritts ($0,5$ V vs. Ag/AgCl) hängt der Verlauf der Stromdichte vom H_2O_2 -Oxidationsstrom ab. Je höher die Konzentration von H_2O_2 im Elektrolyten, desto größer ist der resultierende Strombeitrag. Dieser Zusammenhang ist in Abbildung 7A dargestellt. Hier

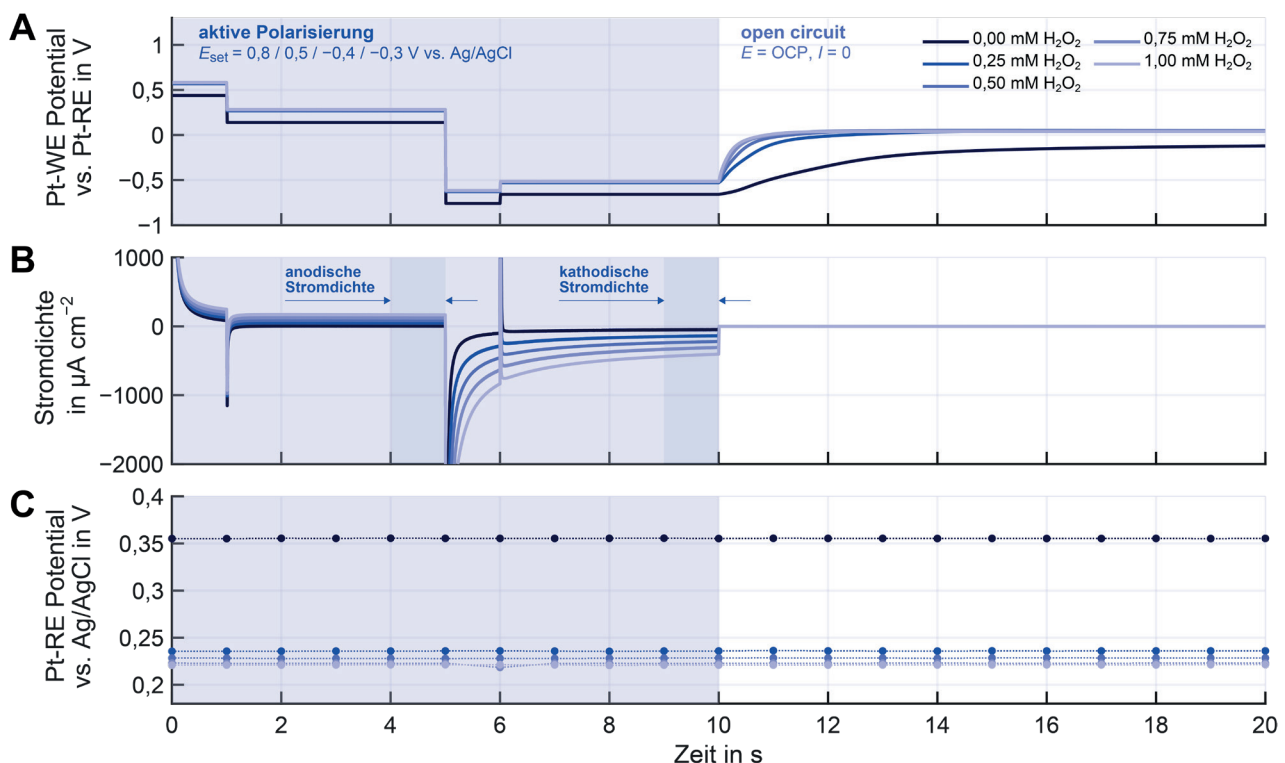


Abb. 6: Chronoamperometrische Messung der H_2O_2 -Konzentration (A). Das angelegte Potential wurde dabei an das eingestellte Bezugspotential der chronoamperometrisch vorkonditionierten Pt-RE angepasst. Die resultierende Stromdichte wird in (B) gezeigt, wobei die markierten Bereiche die Zeitfenster kennzeichnen, in denen die anodische bzw. kathodische Stromantwort berechnet wurde. Der Verlauf der Pt-RE-Potentiale gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode ist in (C) dargestellt.

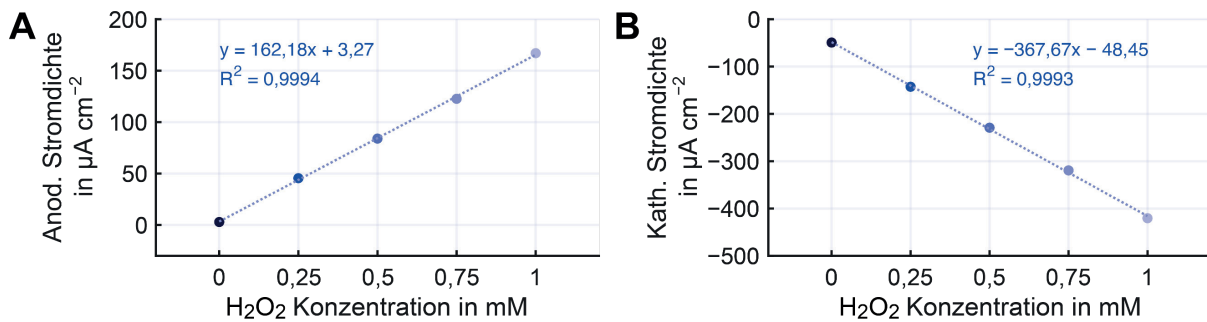


Abb. 7: Kalibrierung von H₂O₂ mittels des amperometrischen Sensorprotokolls zeigt stabiles und hochlineares Verhalten sowohl in dem anodischen (A) als auch in dem kathodischen (B) Messschritt für die gewählten Konzentrationen.

wurde der Mittelwert der letzten Sekunde des anodischen Messschritts berechnet, da die Bedingungen in diesem Zeitraum am besten definiert und reproduzierbar sind. Die lineare Beziehung zeigt eine exzellente Korrelation über die verwendeten H₂O₂-Konzentrationen hinweg. Im kathodischen Messschritt (-0,3 V vs. Ag/AgCl) resultiert der gemessene Strombeitrag sowohl aus der Reduktion von H₂O₂ als auch von gelöstem O₂. Auch hier wurde der Strombeitrag in der letzten Sekunde des Messschritts gemittelt, und die Ergebnisse in Abbildung 7B gegen die H₂O₂-Konzentration aufgetragen. Dabei konnte erneut eine starke Linearität festgestellt werden. In Abbildung 6C sind die Potentialverläufe der Pt-RE gegenüber einer Ag/AgCl-Elektrode während der Messungen dargestellt. Die Differenzen in den gemessenen Referenzpotentialen, die durch die variierenden H₂O₂-Konzentrationen hervorgerufen werden, zeigen, dass das etablierte Gleichgewichtspotential in Abhängigkeit von der H₂O₂-Konzentration variiert. Dies legt nahe, dass H₂O₂ einen zusätzlichen Beitrag zur Einstellung des Mischpotentials leistet. Obgleich eine Konzentrationsabhängigkeit festzustellen ist, bleibt das Pt-RE-Potential für jede einzelne Messung stabil. Diese Ergebnisse bestätigen erneut die hohe Stabilität der Pt-RE in der H₂O₂-Messung und demonstrieren abermals die Eignung der vorkonditionierten Pt-RE für derartige Sensorprotokolle.

Schlussfolgerung

Die gezeigten potential- bzw. stromkontrollierten Vorkonditionierungsprotokolle bieten einen vielversprechenden Ansatz zur Etablierung eines stabilen und reproduzierbaren Referenzpotentials an einer Platin-Elektrode. Die stromkontrollierte Vorkonditionierung erlaubt die Ermittlung des Arbeitspunktes unter Einsatz von ausschließlich Platin-Elektroden. Dies ermöglicht elektrochemische Messungen in vivo ohne

die Notwendigkeit einer Ag/AgCl-Referenzelektrode. Dadurch ist keine Modifikation des Implantats erforderlich, da die vorhandenen Stimulationselektroden genutzt werden können. Dies eröffnet zukunftsweisende Möglichkeiten für elektrochemische Messungen ohne zytotoxische Wirkung im lebenden Organismus, wodurch sich die Langzeitstabilität erheblich verbessern lässt.

Literatur

- [1] B. T. Seaton and M. L. Heien, "Biocompatible reference electrodes to enhance chronic electrochemical signal fidelity in vivo", *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 413, no. 27, pp. 6689–6701, 2021. <https://doi.org/gpvp3c>
- [2] A. Weltin, D. Ganatra, K. König, K. Joseph, U. G. Hofmann, G. A. Urban, J. Kieninger, "New life for old wires: electrochemical sensor method for neural implants", *J Neural Eng*, vol. 17, no. 1, p. 016007, 2020. <https://doi.org/dcmh>
- [3] A. Weltin, J. Kieninger, G. A. Urban, S. Buchholz, S. Arndt, N. Rosskothen-Kuhl, "Standard cochlear implants as electrochemical sensors: Intracochlear oxygen measurements in vivo", *Biosens Bioelectron*, vol. 199, p. 113859, 2021. <https://doi.org/g8vw>
- [4] P. Zimmermann, A. Weltin, G. A. Urban, J. Kieninger, "Active Potentiometry for Dissolved Oxygen Monitoring with Platinum Electrodes", *Sensors*, vol. 18, no. 8, p. 2024, 2018. <https://doi.org/cvqz>

Danksagung

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Projekts „Cochlea-Implantate als in vivo Sensoren (CIAS) – Elektrochemische Überwachung der intracochleären Mikroumgebung und Elektrodenstabilität“.

Förderkennzeichen Nr. 539251872

Die Cochlea-Implantate wurden freundlicherweise von MED-EL (Medical Electronics, Innsbruck, Österreich) zur Verfügung gestellt.

Forschungsvereinbarung PVFR2019/2