

マイクロナノ電極システムを用いた バイオセンシングとバイオイメージング

高橋康史¹・珠玖 仁²・末永智一^{1,2}

¹東北大学原子分子材料科学高等研究機構 ☎ 980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2 丁目 1-1

²東北大学 大学院環境科学研究科 ☎ 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-11

(2013 年 4 月 30 日受付 ; 2013 年 6 月 4 日掲載決定)

Bio Sensing and Imaging by Using Mirco/Nano Electrode System

Yasufumi TAKAHASHI¹, Hitoshi SHIKU² and Tomokazu MATSUE^{1,2}

¹WPI Advanced Institute of Materials Research, Tohoku University, 2-1-1 Katahira, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8577

²Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, 6-6-11 Aramaki, Aoba, Sendai, Miyagi 980-8579

(Received April 30, 2013 ; Accepted June 4, 2013)

The micro/nanoelectrode has unique characteristics, which are not expected for conventional electrodes, such as the capability to perform localized measurements, low double layer charging currents, low ohmic drops, and fast mass transport. Scanning electrochemical microscopy (SECM) with a micro/nanoelectrode for detecting electroactive chemical species and is an effective tool for the investigation of the localized chemical properties of sample surfaces and interfaces. Because SECM has high temporal resolution under physiological conditions, it is particularly well suited for quantitative measurements of chemicals like neurotransmitters, nitric oxide, reactive oxygen species, and oxygen, which are released/consumed by living cells. This article presents an overview of the recent progress of SECM.

KEYWORDS : micro electrode, nano electrode, scanning electrochemical microscopy

1. はじめに

電極半径が 50 μm 以下のマイクロ・ナノ電極を利用した電気化学計測では、通常の電極と比べ非常に面白い特徴を有する^{1,2)}。下記にその特徴を列挙する。

1. 電流が小さいため IR 効果が少ない。有機溶媒中や支持塩を加えずに測定を行うことができる。
2. 高速で物質移動を捉えることができる。物質移動速度は、次式で表される。

$$m = D/a$$

m 物質移動速度 (cm/s)

a 電極半径 (cm)

D 拡散係数 (cm²/s)

電極が小さくなるほど、より速い物質移動速度の測定が可能となる。

3. ボルタンメトリーにおいて定常電流となるため解析が容易である。電子移動が十分速い速度で起きているときには、直ちに球面拡散に起因する定常電流値に到達する。次式に定常電流値の理論式を示す。

$$I_s = 4nFc^*Da$$

(ガラスの厚さが電極半径の 10 倍以上の場合)^{3,4)}

a 電極半径 (cm)

D 拡散係数 (cm²/s)

c^{*} バルクでの反応物の濃度 (mol/cm³)

n 反応電子数

電子移動が律速となる(準可逆な定常電流)のサイクリックボルタンメトリーでは、電極-電気化学反応種間での電子移動速度を、波形から見積もることができる^{5,6)}。

4. 充電電流が小さいため高速で電位を掃引できる。Wightman らは、神経伝達物質の検出において、2400 V/s ほどの高速 CV 測定により、ドーパミンを高感

度に測定することに成功している^{7,8)}。

2. 走査型電気化学顕微鏡

走査型電気化学顕微鏡 (SECM) は、マイクロ・ナノ電極を探針として用いて試料表面を走査しながら電気化学活性種を酸化/還元し、電極の位置情報と得られた電流値から試料表面での化学物質の濃度プロファイルを取得できる⁹⁻¹¹⁾。ここでは、SECM の測定手法、システム、生体センシングの応用例、さらに近年活発に行われている高解像度 SECM の開発状況に関して紹介する。

2.1 測定手法

SECM による微小電流の測定手法として、フィードバック (FB) モード、ジェネレーション-コレクション (GC) モードに大別される (Fig. 1)。

フィードバックモードは、試料との電子の授受を仲介する電気化学メディエータを溶液に加え、電極-試料間で行われる電気化学メディエータの酸化/還元反応を定量的に捉えるものである^{3,4)} (Fig. 1 (a))。マイクロ・ナノ電極を絶縁性の試料表面に近接させていくと定常電流

が減少する。これは、電極表面への電気化学活性種の輸送が阻害されるためであり、ネガティブフィードバック効果と呼ばれている。この電流変化は、試料の形状と電極をシールしているガラス部分の厚さ (RG) に依存する (Fig. 1 (b))。ネガティブフィードバック効果から、試料の高さを見積もることができるため、試料表面を電極により走査し、各測定点での電流値から試料の凹凸を知ることが可能である。

生体試料への応用として、ネガティブフィードバック効果を利用した細胞の形状測定が行われた。細胞膜を透過しづらい電気化学メディエータを利用すると、細胞表面において絶縁性基板と同様に拡散を阻害するため、電流値の減少から細胞の高さを見積もることができる。一般的に、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 、 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ のような金属錯体メディエータは、電荷を有して親水性が高いため細胞膜の透過性が低い。これらのメディエータを利用することで、細胞に対して非接触で、電極を細胞に近接させることができる。これまで、神経伝達物質を放出する PC12 細胞の形状測定が行われた。細胞に電極が接触すると、物理的な刺激により細胞からの神経伝達物質の放出が誘導されてしまう。そのため、電気化学メディエータとして $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+/2+}$ を用い、ネガティブフィードバックを利用した PC12 細胞の形状測定と神経伝達物質の検出が行われた¹²⁻¹⁴⁾。

一方、電極を導電性試料表面へと近接させていくと、電極により酸化/還元された反応物が、導電性基板表面で還元/酸化される。導電性基板がマイクロ・ナノ電極よりも十分に大きい場合には電極を近接させると電流値が増加するため、ポジティブフィードバック効果と呼ばれている。この電流の増幅率は、電極-試料間での電気化学メディエータの移動時間に依存する。そのため、電極-試料間距離を近接させることで、酸化還元サイクルの回転効率を高めることができる。これまで、Bard らは、ナノ電極 (直径 15 nm) を用いて、ナノ電極-試料間距離を 10 nm まで近接させ、単一のフェロセン (Fc) 誘導体の酸化還元サイクルに伴う電流を観察した。この場合、Fc が電極-試料間を移動する時間は、 $0.1 \mu\text{s}$ となり、単一の Fc が毎秒 10^7 回電極と反応していることとなる¹⁵⁾。ごく最近、デバイス型ナノ電極においても、同様の原理で単一分子の検出が行われ注目を集めている¹⁶⁾。

生体試料への応用として、基板に固定化した酵素についてポジティブフィードバック効果を利用した測定が行われている。ここでは、電気化学メディエータとして Fc、固定化酵素としてグルコースオキシダーゼ (GOx) を用いたものを紹介する¹⁷⁾。グルコースオキシダーゼ

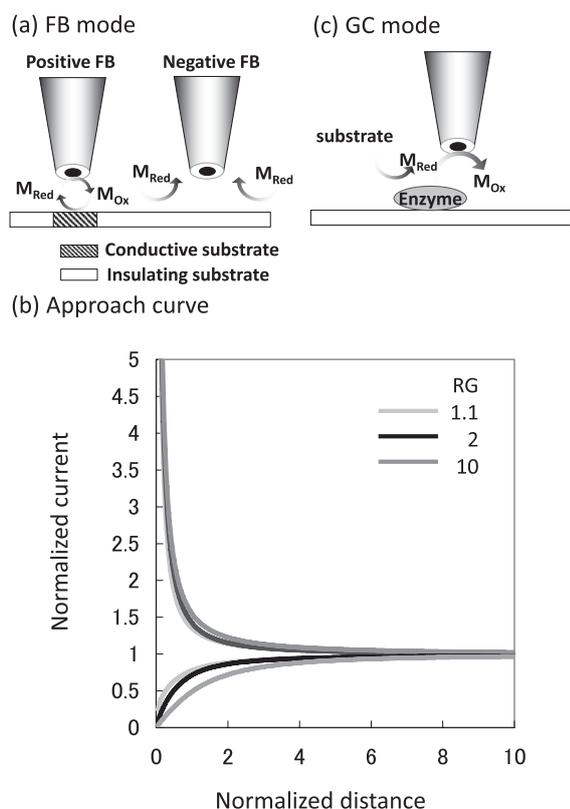


Fig. 1. Schematic illustration of the (a) feedback mode. (b) Approach curves toward conducting (top curves) and insulating (bottom curves) substrates. RG is defined as the ratio between the insulator thickness and the radius of the microdisk electrode. (c) Generation collection mode.

は、グルコースを酸化し、グルコノラク톤を生成する。この反応の際に、マイクロ・ナノ電極によりFcが酸化されて生成したFc⁺が還元される。GOxにより再生されたFcが再び電極上で酸化される。電極-GOx間においてFcが酸化還元を繰り返すことで、GOx上において電流の増加がみられる。固定化された酵素の表面密度がわかっている場合には、酵素のターンオーバーを定量的に評価可能である。Mirkinらは同様の原理を細胞内での酸化/還元反応の検出に応用し、異種類の細胞種の識別を行った¹⁸⁾。

ジェネレーション-コレクション (GC) モードは、試料から生成される電気化学活性種を電極により検出する (Fig. 1 (c))。電気化学メディエータが測定溶液中に存在しないため、バックグラウンドの電流が非常に低くなり、高感度に電気化学活性種を検出できる。これまでzepto (10⁻²¹) モルレベルで、神経伝達物質の検出が行われた¹⁹⁾。また、試料表面から一定速度で放出される化学物質の流速を見積もることができる。Bardらは、生細胞に関してメナジオンの解毒代謝速度を見積もることに成功している²⁰⁾。この原理は試料から生成される化学物質だけでなく、消費される化学物質にも適用することが可能である。我々のグループでは、1990年代の後半から細胞の呼吸に伴う酸素消費量を定量的に測定する研究を続けており、薬剤スクリーニングや、牛の受精卵の評価に利用されている^{21~23)}。SECMは、スループットが必ずしも高いとはいえないが、受精卵のようなかけがえない試料を、非侵襲的に測定するには非常に有効である。

2.2 測定システム

SECMは、微小電流を検出するための微小電流増幅器と、プローブの位置を制御するポジショナー、データの取得や機器との通信を行うAD/DAボード、PCから構成されている。ナノ電極を利用し、電極-試料間距離制御が可能なSECMに関してブロック図をFig. 2に示す。

一般的なSECMの微小電極の位置は、ステップモータによりコントロールされている。この場合には、ステップモータのコントローラに対して、PCからシリアル通信によりコマンドを送ることで、コントロールが行われる。ナノ電極を利用する場合には、より精密な位置制御が必要となるため、ピエゾ駆動のポジショナーが利用される。ピエゾ駆動のポジショナー用コントローラに対して、DAボードから電圧シグナルを送ることで、プローブの位置を制御する。

電気化学測定において一般的に使用されている3極方式のポテンシオスタッドも微小電流の計測に利用できるが、Keithleyなどから販売されている微小電流増幅器や

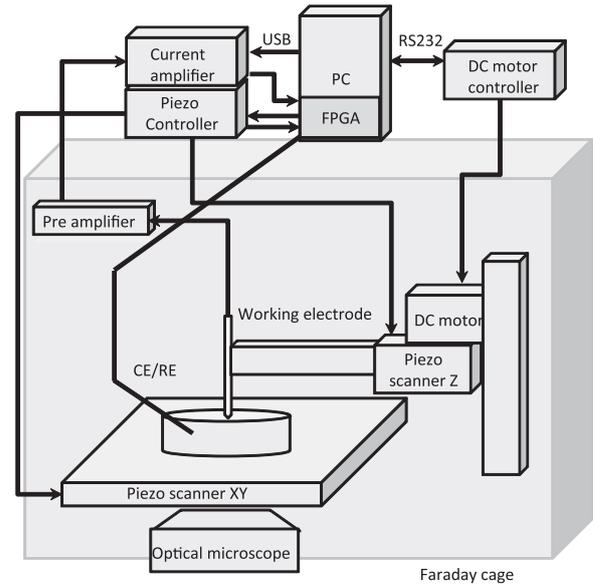


Fig. 2. SECM setup.

Axonなどから販売されているパッチクランプ用の微小電流増幅器も利用できる。この場合には、参照電極を対極とした2電極方式が用いられる。電流そのものが小さいために、IRドロップの影響がほぼ無視できるためである。

AD/DAボードについては、WindowsなどのOSを利用した場合には、システムタイマーの分解能が1msほどであり、電極-試料間距離の制御には時間分解能が十分でない。そのため、一般的に走査型プローブ顕微鏡のコントローラに用いられているデジタルシグナルプロセッサ (Digital Signal Processor: DSP) や FPGA (field-programmable gate array) などPCを介さずに制御が可能なボードを、PCに搭載することが望まれる。

2.3 SECMによる生体センシング

電気化学測定は、溶液中の化学物質の濃度を非侵襲かつ定量的に捉えることができるため、細胞、微生物、酵素などの評価に有効である。

細胞に関しては、酸素、一酸化窒素、神経伝達物質、過酸化水素など生体機能の維持や調整と関連の深い分子の直接酸化/還元が可能であり、前述したようにSECMを用いることで単一細胞から生成/消費される化学物質の流速を定量的に捉えられる。また、電極に酵素を修飾すると、グルコースやATPなども測定することが可能である^{24, 25)}。

SECMでは、局所的に電極反応を誘起することで、化学物質の濃度勾配を形成することができるため、生体膜や脂質二分子膜 (BLM) の透過性評価にも応用されている。膜の透過性を評価する電気化学メディエータを溶

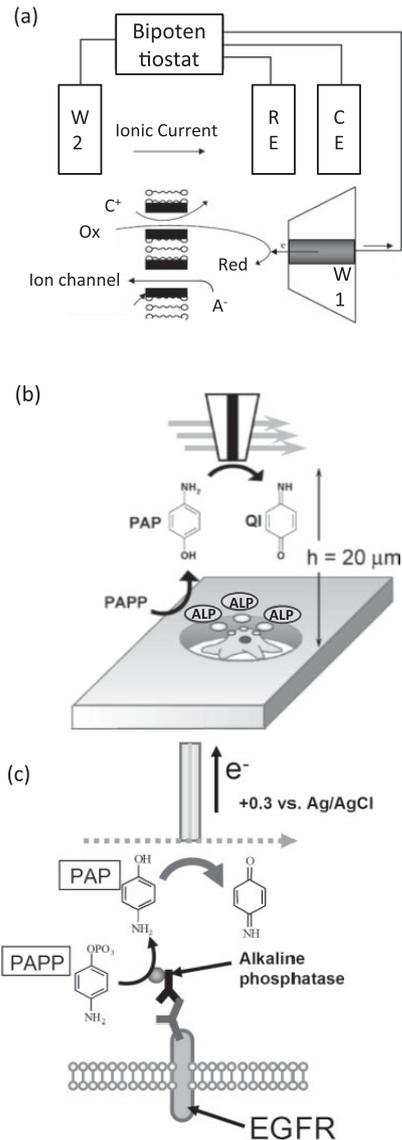


Fig. 3. Schematic diagram of SECM bio-sensing applications. (a) Ionic and redox current simultaneous measurements of transport across a BLM. (b) Characterization of a reporter system using SECM. The expression of the secreted ALP is monitored electrochemically. (c) Membrane protein (EGFR : epidermal growth factor receptor) detection using SECM generation-collection mode.

液に加え、電極を細胞膜表面に近接させた際の電流変化から、細胞膜の透過性を評価する。これまで、イオンチャンネル、動物細胞膜、細胞の核周囲に形成されている孔（核膜孔）の透過性が評価されている^{26,27)} (Fig. 3 (a))。マイクロ・ナノ電極では、高速で物質移動を評価できるため、核膜孔のような比較的大きな孔（直径 120 nm）の透過性評価に有効である。

SECM による酵素の測定では、細胞内や細胞表面など細胞由来の酵素を検出するものと、生体分子の標識とし

て利用するものの二つに大別することができる。

細胞由来の酵素の検出に関する応用例としては、再生医療の材料として注目されている ES 細胞の分化状態の評価や²⁸⁾、レポータータンパク質を利用した細胞センサーの開発が行われた^{29,30)}。ES 細胞に発現しているアルカリフォスファターゼ (ALP) は、細胞の分化が進むにつれて発現量が減少する。この ALP の発現の減少を SECM により捉えることで、ES 細胞の分化状態を評価した。また、細胞センサーでは、ネクロシスを誘導する TNF- α に応答して細胞外に ALP を放出するように細胞に遺伝子操作を施し、ALP の放出量を指標として、TNF- α を検出する (Fig. 3 (b))。細胞の酵素発現状態は、数日単位で変化するため、非侵襲測定が可能な SECM が有効である。

生体分子の標識として利用される酵素には、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) などがある。これまで、HRP を標識酵素としたサンドイッチ型イムノアッセイにより検出する際に、抗原の電気化学的な検出が行われた³¹⁾。さらに、細胞表面の膜タンパク質に酵素を標識し、特定の膜タンパク質の発現状態の評価が行われた (Fig. 3 (c))。これまで、癌細胞の増殖と関連の深い上皮成長因子受容体 (EGFR) に関して、SECM により単一細胞レベルでの発現状態の評価が行われ、膜タンパク質の発現状態を評価する際に一般的に用いられているフローサイトメトリーと良好な相関が得られた^{32,33)}。本手法では、細胞内外を明瞭に識別可能なため、膜タンパク質の膜界面での動きをリアルタイムで観察可能である。

2.4 高解像度システムの開発

SECM の解像度は、ほかの SPM と比べ非常に低い。その原因は、マイクロメートルスケールの電極を用いて、溶液中を拡散する化学物質を検出するためである。そのため、解像度の向上を目指したナノ電極の開発が盛んに行われている。その手法は三つに大別できる。一つは、ガラス管内に Pt あるいは Au の細線（約 10 μm ）を封止した状態で、CO₂ レーザープレーを利用して伸長する手法である。この手法は、ナノ電極の作製において最も一般的に行われている。集光イオンビームなどを利用し、先端を切断することで、比較的簡便にナノ電極を作製できる^{34,35)}。二つ目は、Pt あるいは Au の細線（約 10 μm ）を電解エッチングする手法である。この手法は比較的古くから行われているが、ナノ電極を作製するたびに、金属細線のエッチングやエッチングを行った細線をガラス管で封止し、研磨を行う必要があるため職人技が要求される³⁶⁾。三つ目の手法として、焼成カーボン電極が挙げられる。この手法は非常に簡便であり、比較的簡単に電極を作製できる。ブタンガスを先端を尖らせた石

英管に充填し、先端部を加熱することで、焼成カーボン層を形成する。これまで 10 nm 以下の電極が作製されている^{14, 37, 38)}。

これらのナノ電極の作製法の開発により、ナノ電極が比較的容易に作製可能となったが、ナノ電極を SECM に利用する場合には、その検出範囲が非常に短いため、電極半径と同等の距離に電極と試料を近接させながら電極の走査を行う必要がある。このため、電極を試料に近接させる電極-試料間距離制御システムの導入が進められてきた。これまで、シアフォース^{39, 40)}、原子間力顕微鏡 (AFM)⁴¹⁾、インピーダンスを利用した距離制御システムが¹³⁾、SECM に搭載された。しかし、これらの手法は、電極と試料との接触や解像度の問題があり、生細胞に適用した場合には、細胞の微小器官などの細部を明瞭に識別しながら測定を行うことは厳しい。我々は、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡 (SICM) の距離制御システムを SECM に搭載し、光学顕微鏡の分解能の回折限界を超えた解像度での電気化学測定に成功した^{37, 42)}。

SICM は、電解質溶液を充填したピペットに塩化銀線を挿入し、バスに存在する塩化銀線との間に電圧を印加した際に得られるイオン電流を利用し、ピペットと試料との距離を制御する手法である^{43, 44)}。この技術を SECM の電極の位置制御に利用して (Fig. 4 (a)), 基板にスポット固定した GOx の活性を電気化学的に捉えた。スポット固定した GOx の縁部分において、ドーナツ状に高い酵素活性を示すことが、マイクロ電極を利用した SECM により観察されていた⁴⁵⁾ (Fig. 4 (b, c))。我々の開発した SECM-SICM では、光学顕微鏡では識別が困難な縁部分に形成された規則正しい窪みが確認できた。SICM の距離制御システムにより、SECM の解像度を飛躍的に向上させることができたが、イオン電流とファラデー電流を同時に測定できるための複合電極が必要であり、小型化に限界がある。そこで、ナノ電極への印加電圧を切り替え、電極の位置制御のための電流と、試料表面での電気化学測定のための電流を分離した¹⁴⁾ (Fig. 4 (c))。半径が 100 nm 以下のナノ電極では、定常電流に達するまでの時間が 20 ms 以下と非常に短く、印加電圧の切り替えの際の待ち時間を劇的に短縮することができた。この手法により、高解像度な形状と電気化学同時イメージングに成功した。このような技術革新により、神経伝達物質の放出サイトのマッピングなど、細胞表面における不均一な化学物質の濃度プロファイルの取得が期待できる。

文 献

- 1) T. Matsue : *Anal. Sci.* **29**, 171 (2013).
- 2) W.P. Wightman : *Nature* **208**, 958 (1965).
- 3) Y.H. Shao and M.V. Mirkin : *J. Phys. Chem. B* **102**, 9915 (1998).
- 4) J.L. Amphlett and G. Denuault : *J. Phys. Chem. B* **102**, 9946 (1998).
- 5) M.V. Mirkin and A.J. Bard : *Anal. Chem.* **64**, 2293 (1992).
- 6) M.V. Mirkin, T.C. Richards and A.J. Bard : *J. Phys. Chem.* **97**, 7672 (1993).
- 7) R.B. Keithley, P. Takmakov, E.S. Bucher, A.M. Belle, C.A. Owesson-White, J. Park and R.M. Wightman : *Anal. Chem.* **83**, 3563 (2011).
- 8) B.M. Kile, P.L. Walsh, Z.A. McElligott, E.S. Bucher, T.S. Guillot, A. Salahpour, M.G. Caron and R.M. Wightman : *ACS Chem. Neurosci.* **3**, 285 (2012).
- 9) S. Amemiya, A.J. Bard, F.R.F. Fan, M.V. Mirkin and P.R. Unwin : *Annual Review of Analytical Chemistry* **1**, 95 (2008).
- 10) R.E. Ripple, R. Oreilly, L. Wightman and J. Dacey : *Psychol. Rep.* **17**, 633 (1965).
- 11) C.D. Arnaud, H. Kneubuhl, V.L. Seiling, B.K. Wightman and N.H. Engbring : *J. Clin. Invest.* **44**, 1287 (1965).

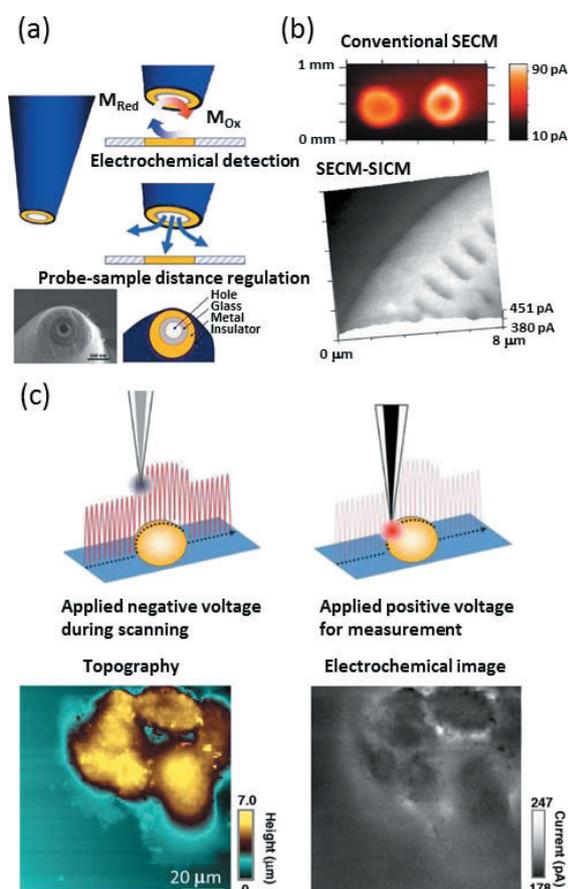


Fig. 4. (color online). (a) Schematic of SECM-SICM. (b) GOx images of conventional SECM and SECM-SICM. (c) Schematic of voltage-switching mode SECM. Topography (Left) and electrochemical (Right) images of A431 cells.

- 12) J.M. Liebetrau, H.M. Miller and J.E. Baur : *Anal. Chem.* **75**, 563 (2003).
- 13) R.T. Kurulugama, D.O. Wipf, S.A. Takacs, S. Pongmayteegul, P.A. Garriss and J.E. Baur : *Anal. Chem.* **77**, 1111 (2005).
- 14) Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, B. Babakinejad, J. Macpherson, P.R. Unwin, H. Shiku, J. Gorelik, D. Klenerman, Y.E. Korchev and T. Matsue : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 11540 (2012).
- 15) F.R.F. Fan and A.J. Bard : *Science* **267**, 871 (1995).
- 16) S.G.Lemay, S. Kang, K. Mathwig and P.S. Singh : *Acc. Chem. Res.* **46**, 369 (2013).
- 17) D.T. Pierce, P.R. Unwin and A.J. Bard : *Anal. Chem.* **64**, 1795 (1992).
- 18) W.J. Feng, S.A. Rotenberg and M.V. Mirkin : *Anal. Chem.* **75**, 4148 (2003).
- 19) T.K. Chen, G.O. Luo and A.G. Ewing : *Anal. Chem.* **66**, 3031 (1994).
- 20) J. Mauzeroll, A.J. Bard, O. Owhadian and T.J. Monks : *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 17582 (2004).
- 21) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue : *Anal. Chem.* **71**, 4637 (1999).
- 22) H. Shiku, T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi and M. Kobayashi : *Anal. Chem.* **73**, 3751 (2001).
- 23) Y.S. Torisawa, T. Kaya, Y. Takii, D. Oyamatsu, M. Nishizawa and T. Matsue : *Anal. Chem.* **75**, 2154 (2003).
- 24) E. Llaudet, S. Hatz, M. Droniou and N. Dale : *Anal. Chem.* **77**, 3267 (2005).
- 25) M. Ciobanu, D.E. Taylor, J.P. Wilburn and D.E. Cliffel : *Anal. Chem.* **80**, 2717 (2008).
- 26) T. Matsue, H. Shiku, H. Yamada and I. Uchida : *J. Phys. Chem.* **98**, 11001 (1994).
- 27) J. Kim, A. Izadyar, N. Nioradze and S. Amemiya : *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2321 (2013).
- 28) J.L. Williams and J.A. Wightman : *Br. J. Surg.* **53**, 780 (1966).
- 29) Y.S. Torisawa, N. Ohara, K. Nagamine, S. Kasai, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue : *Anal. Chem.* **78**, 7625 (2006).
- 30) T. Murata, T. Yasukawa, H. Shiku and T. Matsue : *Biosens. Bioelectron.* **25**, 913 (2009).
- 31) H. Shiku, T. Matsue and I. Uchida : *Anal. Chem.* **68**, 1276 (1996).
- 32) Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, R. Asano, T. Yasukawa, I. Kumagai and T. Matsue : *Anal. Chem.* **81**, 2785 (2009).
- 33) Y. Takahashi, T. Miyamoto, H. Shiku, K. Ino, T. Yasukawa, R. Asano, I. Kumagai and T. Matsue : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 16569 (2011).
- 34) P. Sun and M.V. Mirkin : *Anal. Chem.* **78**, 6526 (2006).
- 35) M.A. Mezour, M. Morin and J. Mauzeroll : *Anal. Chem.* **83**, 2378 (2011).
- 36) B. Zhang, J. Galusha, P.G. Shiozawa, G.L. Wang, A.J. Bergren, R.M. Jones, R.J. White, E.N. Ervin, C.C. Cauley and H.S. White : *Anal. Chem.* **79**, 4778 (2007).
- 37) Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, Y.J. Zhang, N. Ebejer, J.V. Macpherson, P.R. Unwin, A.J. Pollard, D. Roy, C.A. Clifford, H. Shiku, T. Matsue, D. Klenerman and Y.E. Korchev : *Angew. Chem., Int. Ed.* **50**, 9638 (2011).
- 38) Y.T. Kim, D.M. Scarnulis and A.G. Ewing : *Anal. Chem.* **58**, 1782 (1986).
- 39) A. Hengstenberg, A. Blochl, I.D. Dietzel and W. Schuhmann : *Angew. Chem., Int. Ed.* **40**, 905 (2001).
- 40) Y. Takahashi, H. Shiku, T. Murata, T. Yasukawa and T. Matsue : *Anal. Chem.* **81**, 9674 (2009).
- 41) J.V. Macpherson, P.R. Unwin, A.C. Hillier and A.J. Bard : *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 6445 (1996).
- 42) Y. Takahashi, A.I. Shevchuk, P. Novak, Y. Murakami, H. Shiku, Y.E. Korchev and T. Matsue : *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 10118 (2010).
- 43) Y.E. Korchev, C.L. Bashford, M. Milovanovic, I. Vodyanoy and M.J. Lab : *Biophys. J.* **73**, 653 (1997).
- 44) Y. Takahashi, Y. Murakami, K. Nagamine, H. Shiku, S. Aoyagi, T. Yasukawa, M. Kanzaki and T. Matsue : *Phys. Chem. Chem. Phys.* **12**, 10012 (2010).
- 45) R. Lei, L. Stratmann, D. Schafer, T. Erichsen, S. Neugebauer, N. Li and W. Schuhmann : *Anal. Chem.* **81**, 5070 (2009).