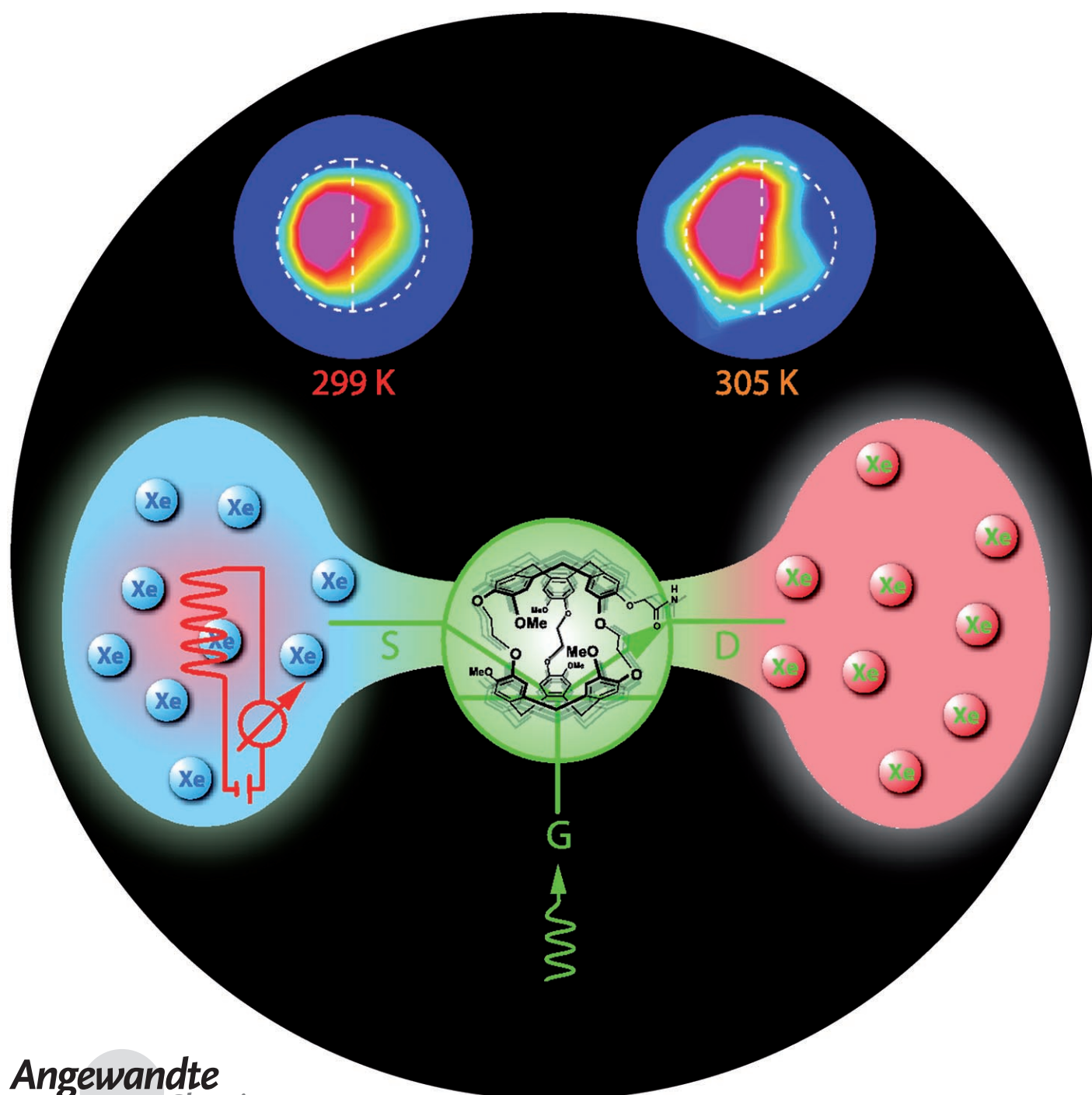


Molekulare Steuerelemente zur temperaturempfindlichen Depolarisierung in der kernmagnetischen Resonanz**

Leif Schröder,* Lana Chavez, Tyler Meldrum, Monica Smith, Thomas J. Lowery, David E. Wemmer und Alexander Pines



Das Potenzial der kernmagnetischen Resonanz (NMR), spektroskopische Information und Bilder (MRT) auf der Basis molekülspezifischer Signale zu sammeln, wird oft durch die geringe Empfindlichkeit dieser Methode gemindert. Zahlreiche frühere Arbeiten zielten daher auf eine Verstärkung der verfügbaren Magnetisierung ab und führten zu verschiedenen Hyperpolarisierungstechniken wie etwa dem Einsatz von hyperpolarisierten (hp) Edelgasen,^[1,2] einem durch Parawasserstoff induzierten Polarisationstransfer^[3,4] oder der dynamischen Kernpolarisation.^[5] Ein auf chemischem Austausch beruhender Ansatz in Kombination mit einem steuerbaren Transfermechanismus von einem Reservoir hyperpolarisierter Kerne auf ein Ensemble von Targetmolekülen würde einen optimierten, kontrollierten „Verbrauch“ der Hyperpolarisierung ermöglichen (Abbildung 1 a) und Verluste bei Transferreaktionen vermeiden. Da die Austauschraten temperaturabhängig sind, ließe sich die Signalverstärkung beim Transfer vom Targetensemble geringer Konzentration auf ein Detektionsensemble hoher Konzentration variieren. Hier demonstrieren wir die Umsetzung dieses Konzepts mithilfe molekularer Käfige, die hp-Xenon aufnehmen können, und wenden den Ansatz zur nichtinvasiven molekularen Temperaturmessung an.

Xenon wird temporär durch Cryptophankäfige gebunden,^[6] die ein Bestandteil funktionalisierter Biosensoren sind und so die hohe Spezifität bei der Erkennung von Biomolekülen mit der hoch empfindlichen Detektion von hp-¹²⁹Xe verbinden.^[7] Das spezifische Umfeld des Käfigs ermöglicht dann eine selektive Depolarisierung der Spins gebundener Kerne mit einem Radiofrequenz(RF)-Puls. Durch anschließende Abgabe des Xenons in das Reservoir des frei gelösten Edelgases verringert sich die Nettomagnetisierung des umgebenden Mediums. Dieses als Hyper-CEST-Technik^[8] bezeichnete Verfahren ermöglicht einen effizienten Depolarisierungstransfer mithilfe eines Continuous-wave(cw)-Pulses

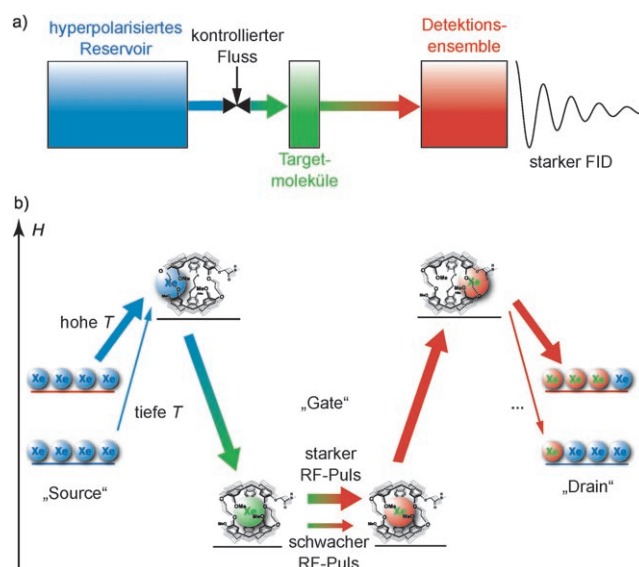


Abbildung 1. NMR-Signalverstärkung durch Magnetisierungstransfer mit Implementierung für hp-Xenon (Transpletor-Konzept). a) Der Magnetisierungstransfer von einem hp-Reservoir greift Information von einem in geringer Konzentration vorhandenen Targetmolekül auf. Durch kontrollierten Spinfluss aus dem Reservoir gelingt ein steuerbarer Informationstransfer in das Detektionsensemble. b) Flussdiagramm für die hyperpolarisierte Magnetisierung durch ein Wirtmolekül zur kontrollierten Depolarisierung von eingeschlossenen ¹²⁹Xe-Atomen. Freie hyperpolarisierte Atome (blau) repräsentieren das „Source“-Ensemble an Magnetisierung und ändern ihre Resonanzfrequenz, wenn sie in das „Gate“ gelangen (grün). Dort können sie durch einen selektiven RF-Puls gesättigt werden und als depolarisierte Kerne (rot) den molekularen Käfig ins „Drain“-Ensemble hinein verlassen. Die Zugänglichkeit des Gates ist durch die Aktivierungsbarriere beim Eindringen in den Käfig bestimmt und lässt sich daher durch die Umgebungstemperatur einstellen.

von einigen Sekunden Dauer, der zur Sättigung des Spinensembles führt.

Drei Effekte sind beim temperaturgesteuerten Depolarisierungstransfer zu berücksichtigen: Erstens erhöht ein Temperaturanstieg die Austauschraten der Xenonatome in den Käfigmolekülen.^[6,9,10] Zweitens zeigt die Bindungskonstante des Xenon-Käfigkomplexes einen Anstieg bei Erwärmung,^[11] sodass mehr Xe für den Sättigungspuls empfindlich wird. Drittens sinkt die Löslichkeit von Xe in Wasser bis 310 K. Dadurch wird das Reservoir kleiner und einfacher zu sättigen.

Allerdings werden Temperaturanstiege nur von Vorteil sein, wenn die signifikant verkürzte Verweildauer des Xe im Gastmolekül nicht zu einem deutlichen Verlust an Sättigungseffizienz führt. Xenon-Biosensoren werden sich in Kombination mit einem selektiven RF-Puls ähnlich wie ein Transistor verhalten. Abbildung 1 b verdeutlicht das Konzept des „Transpletors“, der die Löschung einer Magnetisierung zwischen zwei Ensembles mit einem kontrollierbaren Fluss an gesättigten Xe-Spins transferiert („transferred depletion“). Zunächst entspricht die Gesamtheit der frei gelösten hyperpolarisierten Kerne einer „Source“-Einheit. Durch die Bindung im Cryptophan werden die Kerne empfindlich für eine selektive Sättigung, weshalb die Käfige als „Gate“ aufgefasst

[*] Dr. L. Schröder, Dr. L. Chavez, T. Meldrum, Prof. A. Pines
Lawrence Berkeley National Laboratory
Materials Sciences Division
und
University of California Berkeley, Department of Chemistry
Berkeley CA 94720 (USA)
Fax: (+1) 510-486-5744
E-Mail: LSchroeder@lbl.gov
Pines@berkeley.edu

M. Smith
Lawrence Berkeley National Laboratory
und
University of California Berkeley, Biophysics Graduate Group
Dr. T. J. Lowery,^[†] Prof. D. E. Wemmer
Lawrence Berkeley National Laboratory
und
University of California Berkeley, Department of Chemistry

[†] Derzeitige Adresse: T2 Biosystems, Cambridge MA 02141 (USA)

[**] Diese Arbeit wurde durch das US-Energieministerium unterstützt (Fördernummer DE-AC03-76SF00098). L.S. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SCHR 995/1-1) für ein Emmy-Noether-Stipendium. T.J.L. dankt dem Graduate Research and Education in Adaptive bio-Technology (GREAT) Training Program des UC system wide Biotechnology Research and Education Program (#2005-264).

werden können, das passiert werden muss, um in das Ensemble depolarisierter Kerne zu gelangen, das als „Drain“ fungiert. Veränderungen im Fluss durch den Transpletor enthalten kombinierte Information über Änderungen der Austauschrate und der Sättigungseffizienz.

Diese temperaturgesteuerte Verstärkung lässt sich anhand von Sättigungskurven bei verschiedenen Temperaturen T demonstrieren. Solche Kurven zeigen die Abnahme der Magnetisierung im Xe-Reservoir mit der Sättigungszeit t_{sat} . In dieser Studie wurde ein Biosensor verwendet, der über einen Biotinliganden in wässriger Lösung an Avidin binden kann.^[12] Abbildung 2a verdeutlicht das schnellere Erreichen der kompletten Sättigung beim Übergang von 290 zu 310 K. Unter Verwendung der Funktion $I_{\text{norm}}(t_{\text{sat}}) = I_0 \exp(-t_{\text{sat}}/\tau)$ zur Modellierung der Daten ist der Fluss proportional zum Kehrwert der Zeitkonstante τ . Abbildung 2b zeigt, dass τ^{-1} bei der Erwärmung um 20 K um mehr als das 10-Fache ansteigt.

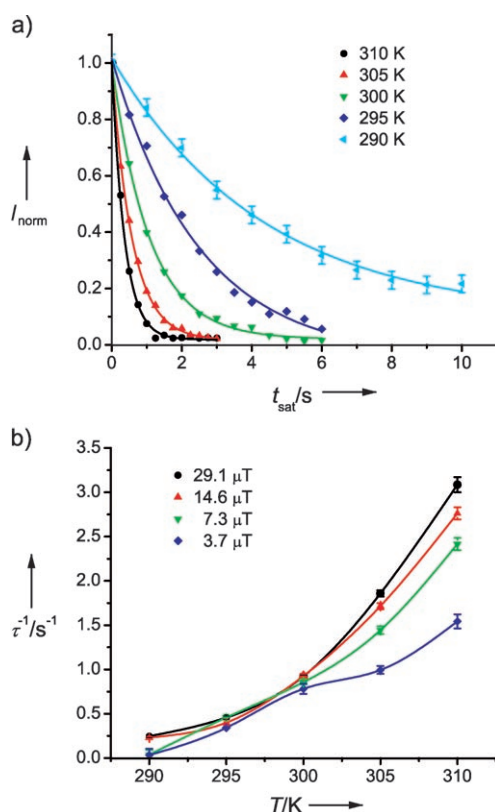


Abbildung 2. Kontrolle des Depolarisierungsflusses durch einen Cryptophan-A-Käfig mithilfe von Hyper-CEST bei verschiedenen Temperaturen. a) Sättigungskurven für die normalisierte Signalintensität I_{norm} von frei gelöstem Xe in Gegenwart von 20 µM Biosensor bei unterschiedlichen Temperaturen und einer Pulsstärke von $B_1 = 14.6$ µT. Die Zeitkonstante τ variiert zwischen 4.34 s für 290 K und 0.36 s für 310 K. b) τ^{-1} aus Sättigungskurven wie in (a) als Funktion der Temperatur. Die Unterschiede in τ^{-1} für verschiedene Pulsamplituden weisen auf eine unvollständige Sättigung bei hohen Temperaturen hin. Ein Puls mit $B_1 = 3.7$ µT hat eine Bandbreite von $\Omega \approx 72$ Hz und ist daher nur geringfügig breiter als die zu sättigende Resonanz bei 310 K. Die Verwendung eines stärkeren Pulses ($B_1 = 29.1$ µT) mit $\Omega \approx 614$ Hz gewährleistet auch bei hohen Temperaturen eine vollständige Sättigung und spiegelt den effizienten Depolarisierungstransfer als Folge des erhöhten Xe-Flusses wider.

Das Problem einer verminderten Sättigungseffizienz spiegelt sich in der Beobachtung wider, dass die Zunahme des Flusses hinein ins „Drain“-Ensemble für hohe Temperaturen zunehmend von der Sättigungsleistung abhängt. Eine verkürzte Verweildauer verursacht eine homogene Linienverbreiterung, die einen RF-Puls mit einer Amplitude von $B_1 = 29.1$ µT bei 310 K beinahe doppelt so effizient macht wie ein Puls von 3.7 µT (Abbildung 2b). Dennoch ist selbst für die schwachen Pulse eine temperaturgesteuerte Verstärkung zu beobachten. Dieses Prinzip ist in zwei Fällen von Bedeutung: Erstens ist die applizierbare RF-Leistung bei Hyper-CEST-Experimenten in biomedizinischen Anwendungen aus Sicherheitsgründen begrenzt. Zweitens ist die Anwendung schmalbandiger Sättigungspulse ein wichtiger Schritt hin zur parallelen Detektion verschiedener Sensorsignale („Multiplexing“^[7,10]).

Das Konzept des Transpletors lässt sich nun für ein Experiment zur Biosensor-Bildgebung mit einem Sättigungspuls von nur $\Omega \approx 30$ Hz Bandbreite (entsprechend $B_1 = 1.6$ µT) verwenden. Während dies eine ineffektive Sättigung bei $T \approx 300$ K ergeben sollte, ist bei etwas höheren Temperaturen eine deutliche Auslöschung zu erwarten. Datensätze zur ^{129}Xe -MRT wurden mit dem weiter unten beschriebenen Aufbau aufgenommen. Abbildung 3a zeigt ein koronares ^1H -

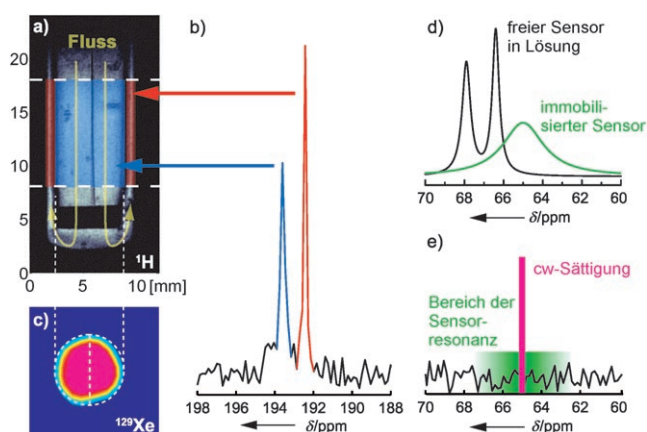


Abbildung 3. ^{129}Xe -MR-Bildgebung funktionalisierter Cryptophan-Käfige zur Detektion mikroskopischer Perlen. a) Koronares ^1H -Bild (12×24 mm² Gesichtsfeld) des Perfusionsphantoms mit Darstellung der 10 mm dicken transversalen Schicht zur Xe-Bildgebung (eingefärbte Bereiche). Das zentrale Volumen mit den Agaroseperlen ist in zwei Kompartimente aufgeteilt, von denen nur eines funktionalisiertes Cryptophan-A enthält. Der mit Agarose gefüllte Bereich (blau) zeigt eine Resonanz bei $\delta = 193.6$ ppm, der umgebende Bereich des Auslasses (rot) zeigt ein Signal bei $\delta = 192.5$ ppm. b) Einzelaufnahme eines schichtselektiven ^{129}Xe -NMR-Spektrums mit den Signalen aus den beiden in (a) eingefärbten Bereichen. c) Ein transversales ^{129}Xe -Bild (12×12 mm² Gesichtsfeld), erzeugt aus der Resonanz bei $\delta = 193.6$ ppm, zeigt die räumliche Verteilung der Agaroseperlen. d) Veränderungen der Linienform des Biosensorsignals infolge der Immobilisierung durch mikroskopische Strukturen wie Agaroseperlen (schematische Spektren mit repräsentativen Linienbreiten^[8,9]). e) Die Biosensor-Resonanz mit einer Linienbreite um 210 Hz bei $\delta = 65$ ppm (grüner Bereich) verschwindet im Rauschen (Hochfeldbereich des Spektrums in (b)). Dennoch wird eine schwache Sättigung mit $B_1 = 1.6$ µT (entsprechend einer Sättigungsbandbreite um 30 Hz; rosa Balken) einen effizienten Sättigungstransfer bei erhöhter Temperatur erzielen (siehe Abbildung 4).

MR-Bild eines Phantoms mit zwei Kompartimenten mit Agaroseperlen, von denen eines mit dem Biosensor markiert ist. Das Signal bei $\delta = 193.6$ ppm (Xe in wässriger Lösung mit Agarose) kann in einem schichtselektiven Spektrum mit einer einzelnen Akquisition detektiert werden (Abbildung 3b) und ermöglicht die Darstellung der örtlichen Verteilung der mikroskopischen Perlen (Abbildung 3c). Dagegen macht eine erhebliche Linienverbreiterung (Abbildung 3d) und die niedrige Konzentration des Sensors eine Detektion von gebundenem Xe bei $\delta = 65$ ppm ohne extensive Signalmittelung unmöglich (Abbildung 3e).

Abbildung 4 illustriert die erwartete temperaturgeregelte Verstärkung der Sensordetektion. Bei 299 K ist die Hyper-CEST-Auslöschung noch sehr wenig effektiv; das Signal-Rausch-Verhältnis S/N eines Spektrums aus dem sensor-

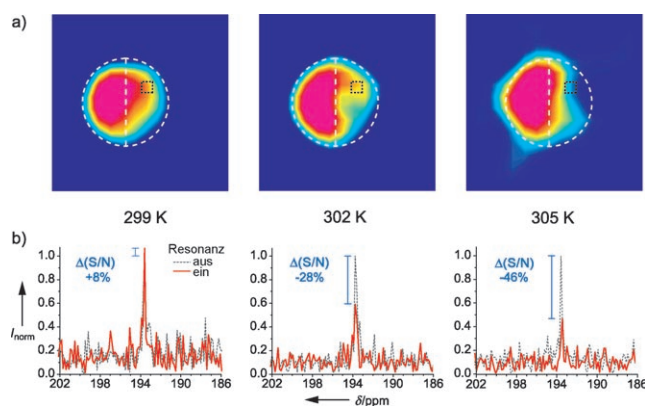


Abbildung 4. Anwendung des Transpletorkonzepts zur temperaturempfindlichen molekularen Bildgebung. a) Transversale ^{129}Xe -Bilder mit steigendem Kontrast beim Erhöhen der Temperatur von 299 K auf 305 K. Das rechte der beiden Kompartimente (Konturen sind durch gestrichelte weiße Linien angedeutet) enthält den Biosensor mit dem funktionalisierten Cryptophan-A-Käfig und reagiert bei 299 K nur schwach auf eine Sättigung mit $B_1 = 1.6 \mu\text{T}$ für 1.5 s. Eine Erwärmung verstärkt den Hyper-CEST-Kontrast und führt zu signifikant erhöhter Sättigung. b) Zugehörige Spektren aus dem Zentrum des rechten Kompartiments zeigen die Signalveränderungen für resonante Sättigung (rote Spektren im Vergleich zu schwarzen Datenpunkten für nichtresonante Sättigung). Während das Signal-Rausch-Verhältnis bei 299 K praktisch unverändert ist, wird nach Erwärmung um 6 K ein Rückgang um 46 % beobachtet.

kierten Bereich ändert sich bei Vergleich von resonanter und nichtresonanter Sättigung nur um 8 %, was unterhalb der Detektionsgrenze der Methode liegt. Wird T um 3 K gesteigert, so beträgt die Änderung von S/N schon -28% . Weiteres Heizen auf 305 K induziert einen signifikanten Fluss durch das „Gate“ und folglich eine Signallöschung von 46 %, weshalb nur noch das Volumen ohne Sensor im Bild erscheint.

Diese Daten veranschaulichen, dass trotz der verkürzten Verweildauer der Kerne im Käfig ein signifikanter Anstieg im Signalkontrast bei erhöhten Temperaturen beobachtet wird. Die starke Linienverbreiterung der agarosegebundenen Sensoren von ca. 200 Hz^[8] ist in diesem Zusammenhang nicht von Bedeutung und hat keinen Einfluss auf die Sättigung, da es sich um eine inhomogene Verbreiterung durch Immobilisierung handelt. Damit wird die Detektion von Strukturen im

Mikrometerbereich mit dieser Technik möglich, während herkömmliche NMR-Auslesetechniken selbst für ^1H -Signale eine zu geringe Empfindlichkeit für die lokalisierte Detektion von Makromolekülen haben.

Insgesamt haben wir molekulare Steuerelemente zur temperaturempfindlichen Depolarisierung in der Flüssigphasen-NMR-Spektroskopie vorgestellt, mit deren Hilfe der Gebrauch hyperpolarisierter Kerne optimiert wird. Die Detektion von Biosensoren schließt nun temperaturempfindliche MRT^[13] mit ein – ein Ansatz, der Anwendungspotenzial zur Hyperthermie-Überwachung in der Onkologie hat.^[14] Das Konzept des Transpletors veranschaulicht auch die mögliche Steigerung der Empfindlichkeit bei Körpertemperatur. Dieser Ansatz lässt sich auf andere Probleme übertragen, die auf der NMR-spektroskopischen Detektion austauschender Strukturen beruhen, und kann so Informationen über die Wirtstruktur erbringen oder konkurrierende Gastmoleküle indirekt detektieren.^[6,10,15,16] Solche Experimente würden Studien über die Austauschdynamik anderer Wirtstrukturen (andere Käfige, Kohlenstoffnanoröhren, Zeolithe^[17]) ermöglichen. Des Weiteren würden sowohl konkurrierende Gastmoleküle (z. B. Methanol oder Chloroform in Lösung) mit vergleichbaren oder höheren Bindungskonstanten als auch Parameter, die die Zugänglichkeit der Wirtstruktur für die hyperpolarisierte Gastspezies verändern (etwa die Solvatisierung von Xe), den Fluss an hyperpolarisiertem Xe durch das „Gate“ beeinflussen und könnten mit dem Transpletor detektiert werden. Auf diese Weise führt der Depolarisierungstransfer zur empfindlicheren Detektion von Molekülen, selbst wenn diese für gewöhnlich nicht von einer Hyperpolarisierungstechnik profitieren können.

Experimentelles

Alle Datensätze wurden an einem 7.05-T-NMR-Spektrometer (Varian, Palo Alto, CA) mit einer 10-mm-Spule aufgenommen. Hyperpolarisiertes Xe ($P \approx 4.6\%$) wurde mit einem XenoSpin-Polarisator (Amersham Health, Durham, NC) aus einer Gasmischung aus 89 % He, 10 % N_2 und 1 % nicht isotonenangereichertem Xe (Isotec, Sigma Aldrich) erzeugt. Zur Quantifizierung der Signallöschung mit zunehmender Sättigungsdauer bei verschiedenen Temperaturen wurde dieses Gemisch 25 s bei 0.45 SLM (Standard-Liter pro Minute) in ein NMR-Röhrchen eingeblasen, das ca. 2.5 mL einer 20 μM Biosensordlösung enthielt. Der Gasfluss wurde dann mit einem Ventilsystem^[18] unterbrochen, um nach 5 s Wartezeit (zum Verschwinden der Blasen) einen cw-Puls variabler Länge einzustrahlen. Anschließend wurde das ^{129}Xe -Induktionssignal (FID) für 300 ms ausgelesen. Zum Heizen oder Kühlen der Lösung wurde der Thermostat des Spektrometers benutzt. Nach Fourier-Transformation und Anwendung eines Dämpfungsfilters wurde über das Xe-Signal bei $\delta = 192.5$ ppm integriert, um die Signallöschung zu bestimmen.

Die Bildgebungsexperimente wurden mit einem Gradientenspulensystem (Resonance Research Inc., Billerica, MA) zur räumlichen Kodierung ausgeführt. Ein zuvor beschriebenes Zweikompartimentphantom,^[8] das avidinmarkierte Agaroseperlen (Immobilized Avidin, Pierce Biotechnology, Rockford, IL) enthält, wurde mit 6 mL min⁻¹ Wasser perfundiert, das auf dem Weg in den Magneten mit einem ca. 60 cm langen Heizkabel erwärmt wurde (5 W/30 cm Leistung; BH Thermal Corporation, Columbus, OH). Unmittelbar oberhalb des Phantoms wurde das Wasser mit der Gasmischung aus dem Hyperpolarisator bei einem Fluss von 0.65 SLM gesättigt.^[19] Biosensormoleküle lagen in einem Kompartiment des Phantoms in

einer Konzentration von 50 μM vor. Ein an den Auslassbereich des Phantoms fixiertes Thermoelement diente zur Bestimmung der Wassertemperatur direkt nach dem Verlassen der beiden Kompartimente. Die maximal erreichbare Temperatur betrug 305 K, da das Wasser bereits außerhalb des Magneten geheizt wurde und die thermische Leitfähigkeit des Schlauchs begrenzt ist.

^{129}Xe -MR-Bilder wurden mit einem Sättigungspuls von 1.5 s Dauer und einer Amplitude von 1.6 μT sowie einem schichtselektiven 90°-Anregungspuls (sinc-Puls von 2 ms Dauer, 10 mm Schichtdicke entlang der z -Achse) mit anschließender zweidimensionaler Phasenkodierung aufgenommen ($12 \times 12 \text{ mm}^2$ Gesichtsfeld, Matrix-Größe 8×8 FIDs, 10.8 min Akquisitionszeit). Jeder Punkt im k -Raum wurde einmal 64 ms mit 100 kHz spektraler Bandbreite ausgelesen. Die Nachbearbeitung der Daten mit MATLAB (MathWorks Inc., Natick, MA) bestand aus einem „Zero-Filling“ auf eine Matrixgröße von 16×16 FIDs, einer zweidimensionalen Fourier-Transformation (FT) zur räumlichen Rekonstruktion und einer eindimensionalen FT zur spektralen Rekonstruktion. Die Aufnahmen zur Verteilung des Signals der Agaroseperlen bei $\delta = 193.6 \text{ ppm}$ wurden durch Summierung der Signalintensität von fünf Datenpunkten ($\delta \approx 0.74 \text{ ppm}$) im Absolutspektrum und anschließende Farbkodierung dieser Werte erzeugt.

Eingegangen am 24. Januar 2008

Online veröffentlicht am 6. Mai 2008

Stichwörter: Biosensoren · Einschlussverbindungen · Imaging-Substanzen · Thermometrie · Xenon

- [1] M. R. Bouchiat, T. R. Carver, C. M. Varum, *Phys. Rev. Lett.* **1960**, 5, 373–375.
- [2] B. M. Goodson, *Concepts Magn. Reson.* **1999**, 11, 203–223.
- [3] C. R. Bowers, D. P. Weitekamp, *Phys. Rev. Lett.* **1986**, 57, 2645–2648.
- [4] D. Canet, C. Aroulanda, P. Mutzenhardt, S. Aime, R. Gobetto, F. Reineri, *Concepts Magn. Reson. Part A* **2006**, 28, 321–330.
- [5] D. A. Hall, D. C. Maus, G. J. Gerfen, S. J. Inati, L. R. Becerra, F. W. Dahlquist, R. G. Griffin, *Science* **1997**, 276, 930–932.
- [6] K. Bartik, M. Luhmer, J.-P. Dutasta, A. Collet, J. Reisse, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 784–791.
- [7] M. M. Spence, S. M. Rubin, I. E. Dimitrov, E. J. Ruiz, D. E. Wemmer, A. Pines, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 10654–10657.
- [8] L. Schröder, T. J. Lowery, C. Hilty, D. E. Wemmer, A. Pines, *Science* **2006**, 314, 446–449.
- [9] T. J. Lowery, S. Garcia, L. Chavez, E. J. Ruiz, T. Wu, T. Brotin, J.-P. Dutasta, D. S. King, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *ChemBioChem* **2006**, 7, 65–73.
- [10] G. Huber, T. Brotin, L. Dubois, H. Desvaux, J.-P. Dutasta, P. Berthault, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6239–6246.
- [11] P. A. Hill, Q. Wei, R. G. Eckenhoff, I. J. Dmochowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 9262–9263.
- [12] T. J. Lowery, S. M. Rubin, E. J. Ruiz, M. M. Spence, N. Winessinger, P. G. Schultz, A. Pines, D. E. Wemmer, *Magn. Reson. Imaging* **2003**, 21, 1235–1239.
- [13] S. Zhang, C. R. Malloy, D. A. Sherry, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 17572–17573.
- [14] C. Weidensteiner, B. Quesson, B. Caire-Gana, N. Keroui, A. Rullier, H. Trillaud, C. T. Moonen, *Magn. Reson. Med.* **2003**, 50, 322–330.
- [15] L. Garel, B. Lozach, J.-P. Dutasta, A. Collet, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, 115, 11652–11653.
- [16] C. Garcia, D. Humilière, N. Riva, A. Collet, J.-P. Dutasta, *Org. Biomol. Chem.* **2003**, 1, 2207–2216.
- [17] C. J. Jameson, A. K. Jameson, R. Gerald II, A. de Dios, *J. Chem. Phys.* **1992**, 96, 1676–1689.
- [18] S.-I. Han, S. Garcia, T. J. Lowery, E. J. Ruiz, J. A. Seeley, L. Chavez, D. S. King, D. E. Wemmer, A. Pines, *Anal. Chem.* **2005**, 77, 4008–4012.
- [19] C. Hilty, T. J. Lowery, D. E. Wemmer, A. Pines, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 76–79; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 70–73.