

Rhodaminderivate als Nahinfrarotfarbstoffe und ihre Anwendung in Fluoreszenzsonden**

*Yuan-Qiang Sun, Jing Liu, Xin Lv, Yunlong Liu, Yun Zhao und Wei Guo**

Fluoreszenzfarbstoffe · Fluoreszenzsonden · Rhodamin

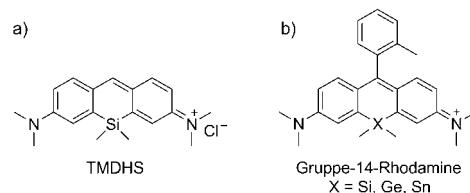
*Der Shanxi University zum
110-jährigen Bestehen gewidmet*

Fluoreszenzsonden mit Anregungswellenlängen im fernen roten bis in den nahinfraroten Bereich (NIR; > 600 nm) sind für biologische Anwendungen attraktiv, weil diese Wellenlängen an biologischen Proben nur minimale Photoschäden verursachen, tief in das Gewebe eindringen und mit der Hintergrundfluoreszenz lebender Systeme kaum interferieren.^[1] Beträchtliche Anstrengungen werden unternommen, um NIR-Sonden für bioanalytische Anwendungen zu entwickeln.^[1b-d] Leider zeigen nur wenige Fluorophore genügend hohe Quantenausbeuten im NIR, vor allem in wässrigen Umgebungen. Die einzigen breit eingesetzten NIR-Fluorophore sind Cyaninfarbstoffe, z.B. Cy5 und Cy7, die zum Entwurf von NIR-Fluoreszenzsonden vielfach genutzt wurden.^[2] Allerdings haben auch Cyaninfarbstoffe einige Nachteile; z.B. unterliegen sie in manchen Fällen Photobleichung. Außerdem haben Cyaninfarbstoffe relativ hohe besetzte Molekülorbitale (HOMOs), wodurch das An- und Ausschalten der Cyaninfluoreszenz durch photoinduzierten Elektronentransfer (PET) weniger effizient wird.^[3] Aus diesen Gründen ist die Entwicklung von NIR-Farbstoffen mit hohen Fluoreszenzquantenausbeuten, geringer Photobleichung und leicht regulierbarer Fluoreszenz ein wichtiges Forschungsziel.

Unter den verschiedenen Fluorophoren haben die Rhodaminfarbstoffe aufgrund ihrer exzellenten photophysikalischen Eigenschaften, wie z.B. hohen molaren Extinktionskoeffizienten, ausgezeichneten Fluoreszenzquantenausbeuten und hoher Photostabilität, ein beträchtliches Interesse gefunden. Infolgedessen finden Rhodamine breite Anwendung als Fluoreszenzsonden und molekulare Markierungen in der Chemie und Biologie.^[4] Allerdings liegen die Absorptions- und Emissionswellenlängen der meisten Rhodaminederivate unterhalb 600 nm, was für biologische Anwendungen oft ungeeignet ist. Viele Anstrengungen wurden unternommen, um Rhodaminderivate mit längeren Absorptionswellenlängen zu erhalten, z.B. durch Erweitern der Konjugation

des Xanthenrings, Austausch des zentralen Kohlenstoffatoms gegen ein Stickstoffatom oder eine Cyanogruppe oder Austausch des Sauerstoffbrückenatoms durch andere Elemente wie N, C, S oder Se.^[5] Allerdings haben die Rhodaminderivate, die durch diese Strategien entwickelt wurden, auch einige Nachteile. Sie sind schwierig zu synthetisieren und zeigen verringerte Absorptions- und Fluoreszenzintensitäten und sind daher weit davon entfernt, gegenwärtige Anforderungen zu erfüllen. Vor kurzem berichteten die Forschungsgruppen von Qian, Nagano und Lin unabhängig voneinander über Si-Pyronin-, Si-Rhodamin-, Te-Rhodamin- und Changsha-NIR-Farbstoffe. Diese Farbstoffe zeigen exzellente Eigenschaften und haben großes Potenzial für biologische Anwendungen. In diesem Highlight werden diese wichtigen Entdeckungen zusammengefasst.

Aufbauend auf Arbeiten über Silole und Silaanthracene^[6] berichteten Qian et al. 2008 über den ersten rot emittierenden Si-Pyronin-Fluorophor (TMDHS) (Schema 1a).^[7] Die Emis-



Schema 1. Molekülstrukturen von a) TMDHS und b) Gruppe-14-Rhodaminen.

sionswellenlänge von TMDHS ist auf über 650 nm verschoben, und die Fluoreszenzquantenausbeute ist hoch (0.39 in CH_2Cl_2 , 0.18 in Wasser). Elektrochemische Messungen weisen darauf hin, dass der Austausch von Sauerstoff gegen Silicium die HOMO- und LUMO-Niveaus gleichzeitig beeinflusst, sodass eine kleinere Energielücke einhergehend mit einer großen Rotverschiebung resultiert. Ähnlich wie bei den Silolen wird das niedrige LUMO-Niveau des TMDHS durch die spezielle $\sigma^*\pi^*$ -Konjugation mit den Beiträgen der σ^* -Orbitale der Si-C(Methyl)-Bindungen und dem π^* -Orbital der benachbarten Kohlenstoffatome verursacht. Die Anhebung des HOMO von TMDHS wird dem induktiven elektronenschiebenden Effekt der Dimethylsilylgruppe relativ zum Sauerstoff zugeschrieben.

[*] Y.-Q. Sun, J. Liu, X. Lv, Y. Liu, Y. Zhao, Prof. Dr. W. Guo
School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanxi University
92 Wucheng Road, Taiyuan 030006 (China)
E-Mail: guow@sxu.edu.cn

[**] Die Forschungen der Autoren werden durch die Natural Science Foundation of China (No. 21172137) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201202264> erhältlich.

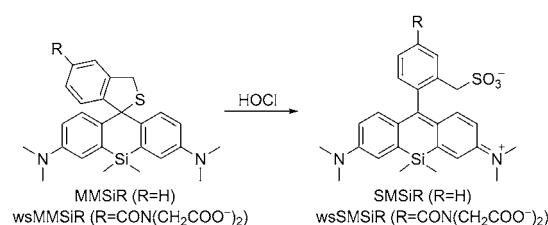
2011 erweiterten Nagano et al. dieses Konzept durch Entwicklung der Rhodamine Si-Rhodamin (SiR), Ge-Rhodamin (GeR) und Sn-Rhodamin (SnR) (Schema 1b).^[8] SiR und GeR sind unter Umgebungsbedingungen stabil, während SnR leicht zerfällt. Ähnlich wie bei TMDHS sind die Absorption und Emission von SiR und GeR stark rotverschoben bis in den NIR-Bereich. SiR und GeR behalten die Vorteile der ursprünglichen Rhodamine bei, einschließlich der hohen Quantenausbeute in wässrigen Medien ($\Phi_f = 0.31$ für SiR und 0.34 für GeR), der Unempfindlichkeit gegen Photobleichung und der guten Wasserlöslichkeit. Bedeutsam ist, dass die Fluoreszenz von SiR und GeR im Unterschied zu den meisten NIR-Fluoreszenzfarbstoffen durch PET-Mechanismen reguliert werden kann. Die Autoren verwendeten diesen Mechanismus, um SiR-basierten NIR-Sonden zur Messung des pH-Werts^[8] sowie von Zn^{2+} ^[8] und Ca^{2+} -Konzentrationen^[9] zu entwerfen.

Bei der In-vivo-Bildgebung werden oftmals zwei Wellenlängenfenster bei 700 nm und 800 nm als Emissionskanäle genutzt.^[10] Durch Erweiterung des Silaanthracenrings erzeugten Nagano et al. kürzlich drei neue NIR-Fluoreszenzfarbstoffe, bezeichnet als SiR680, SiR700 und SiR720 (Schema 2).^[11] Alle drei Farbstoffe zeigen Absorptions- und Emissionsmaxima im NIR-Bereich (670–740 nm). SiR680 und SiR700 zeigen darüber hinaus anwendungstaugliche Fluoreszenzquantenausbeuten ($\Phi_f = 0.35$ und 0.12). Die Autoren stellten auch Amin-reaktive Succinimidylester mit SiR700 her und demonstrierten deren Anwendung in der In-vivo-Bildgebung von Tumoren.



Schema 2. Molekülstrukturen von SiR680, SiR700 und SiR720.

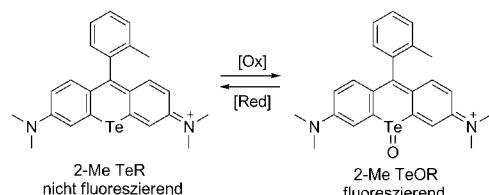
Neben dem PET-Mechanismus nutzten Nagano et al. auch das Ein- und Ausschalten der Fluoreszenz bei einer Spirocyclisierung, um eine SiR-basierte Fluoreszenzsonde (MMSiR) für hypochlorige Säure zu entwickeln (Schema 3).^[12] In Gegenwart von HOCl wird die Thioethergruppe in MMSiR zum Sulfonat oxidiert, begleitet von einer Ringöffnung der Spirocyclus unter Bildung des stark fluoreszierenden SMSiR. Mit MMSiR demonstrierten die Autoren eine Echtzeit-Bildgebung der Phagocytose mittels Fluoreszenzmikroskopie. Außerdem wurde das hydrophilere Derivat



Schema 3. Si-Rhodamin-basierte NIR-Sonde für HOCl.

wsMMSiR genutzt, um eine nichtinvasive In-vivo-Bildgebung der HOCl-Bildung in einem Mausmodell durchzuführen.

Vor kurzem beschrieben ebenfalls Nagano et al. ein Te-Rhodaminderivat (2-Me TeR) als eine reversible NIR-Fluoreszenzsonde für reaktive Sauerstoffspezies (ROS), deren Wirkung auf dem Schweratomeffekt und den Redoxeigenschaften des Te-Atoms basiert (Schema 4).^[13] Als ein Resultat

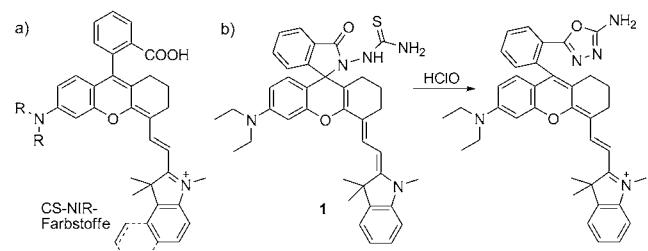


Schema 4. Te-Rhodamin(2-Me TeR)-basierte Fluoreszenzsonde für reaktive Sauerstoffspezies.

des Schweratomeffekts zeigt 2-Me TeR sehr niedrige Fluoreszenz ($\Phi < 0.001$). Dagegen zeigt das oxidierte Produkt 2-Me TeOR, in dem der Schweratomeffekt des Te-Atoms durch die Bindung eines Sauerstoffatoms geschwächt ist, starke Fluoreszenz bei 690 nm ($\Phi_f = 0.18$). 2-Me TeR wird in Gegenwart verschiedener ROS zum fluoreszierenden 2-Me TeOR oxidiert, das wiederum durch Glutathion (GSH) rasch wieder zu 2-Me TeR reduziert wird. 2-Me TeR zeigt damit ein großes Potenzial für die kontinuierliche Verfolgung der ROS-Bildung in vivo.

Tatsächlich wird das Rhodamin-Spirolacton/Spirolactam-System als eines der geeignetesten Systeme für die Entwicklung von Chemosensoren angesehen. Für die Entwicklung von Sensoren basierend auf Gruppe-14-Rhodaminen wurde dieses System bisher jedoch nicht eingesetzt. Dies lässt genügend Spielraum für die weitere Entwicklung dieser Art von Farbstoffen.

Durch Kombinieren des auf Spirocyclisierung basierenden An- und Ausschaltmechanismus von Rhodamin mit den optischen NIR-Profilen von Merocyanin entwickelten Lin et al. eine Serie von NIR-Fluoreszenzfarbstoffen, bezeichnet als Changsha-NIRs (CS-NIRs) (Schema 5).^[14] Bei diesen Farbstoffen liegt sowohl die Absorption (688–728 nm) als auch die Emission (721–763 nm) im NIR-Bereich, mit hohen Fluoreszenzquantenausbeuten ($\Phi_f = 0.29$ –0.56) in EtOH. Ähnlich wie klassische Rhodamine können auch die CS-NIRs



Schema 5. Molekülstrukturen von a) NIR-Farbstoffen und b) einer CS-NIR-basierten Sonde für HOCl.

zum Entwurf von NIR-Fluoreszenzsonden genutzt werden. Zum Beispiel wurde mit CS₂ (einem der CS-NIRs) der Fluoreszenzsensor **1** hergestellt, der endogen erzeugtes HOCl in lebenden Tieren abbilden kann.

Neben den oben beschriebenen Rhodamin-inspirierten NIR-Farbstoffen wurden in den letzten Jahren auch viele exzellente NIR-emittierende Bordipyromethen(Bodipy)-Farbstoffe entwickelt, darunter Styryl-Bodipys und Azo-Bodipys. Informationen hierzu können mehreren Übersichtsartikeln von Ziessel^[15a] Burgess^[15b] und Dehaen^[15c] entnommen werden.

In diesem Highlight haben wir mehrere bemerkenswerte Berichte über Rhodamin-inspirierte NIR-Farbstoffe zusammengefasst: Si-Pyronin-, Si-Rhodamin-, Te-Rhodamin- und Changsha-NIR-Farbstoffe. Es wird erwartet, dass die hier beschriebenen Designstrategien zur Entwicklung neuartiger und verbesserter NIR-Farbstoffe beitragen werden. Es wird außerdem erwartet, dass diese Farbstoffe als molekulare Werkzeuge in zahlreichen biologischen Anwendungen dienen können, z.B. zur Markierung von künstlichen Aminosäuren in Proteinen und als Quelle zur Erzeugung von Singulett-Sauerstoff für die photodynamische Therapie. Eine weitere mögliche Entwicklung sind ratiometrische Fluoreszenzfarbstoffe auf der Basis von resonantem Fluoreszenzenergietransfer (FRET).

Eingegangen am 22. März 2012

Online veröffentlicht am 5. Juni 2012

-
- [1] a) R. Weissleder, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 316; b) L. L. Gompels, L. Madden, N. H. Lim, J. J. Inglis, E. McConnell, T. L. Vincent, D. O. Haskard, E. M. Paleolog, *Arthritis Rheum.* **2011**, *63*, 107; c) M. Ogawa, N. Kosaka, P. L. Choyke, H. Kobayashi, *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1268; d) R. A. Sheth, J. M. Tam, M. A. Maricevich, L. Josephson, U. Mahmood, *Radiology* **2009**, *251*, 813.
 - [2] a) A. Mishra, R. K. Behera, P. K. Behera, B. K. Mishra, G. B. Behera, *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1973; b) X. Peng, Z. Yang, J. Wang, J. Fan, Y. He, F. Song, B. Wang, S. Sun, J. Qu, J. Qi, M. Yan, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6626; c) F. Yu, P. Li, G. Li, G. Zhao, T. Chu, K. Han, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 11030.
 - [3] K. Kiyose, S. Aizawa, E. Sasaki, H. Kojima, K. Hanaoka, T. Terai, Y. Urano, T. Nagano, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9191.
 - [4] a) H. N. Kim, M. H. Lee, H. J. Kim, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 1465; b) M. Beija, C. A. M. Afonso, J. M. G. Martinho, *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 2410; c) D. T. Quang, J. S. Kim, *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 6280; d) X. Chen, T. Pradhan, F. Wang, J. S. Kim, J. Yoon, *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 1910.
 - [5] a) U. Lieberwirth, J. Arden-Jacob, K. H. Drexhage, D. P. Herten, R. Müller, M. Neumann, A. Schulz, S. Siebert, G. Sagner, S. Klingel, M. Sauer, J. Wolfrum, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4771; b) M. R. Detty, P. N. Prasad, D. J. Donnelly, T. Ohulchanskyy, S. L. Gibson, R. Hilf, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2537.
 - [6] a) H. Sohn, R. R. Huddleston, D. R. Powell, R. West, K. Oka, X. Yonghua, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2935; b) M. Oba, Y. Watanabe, K. Nishiyama, *Organometallics* **2002**, *21*, 3667; c) D.-H. Kim, J. Ohshita, K.-H. Lee, Y. Kunugi, A. Kunai, *Organometallics* **2006**, *25*, 1511.
 - [7] M. Fu, Y. Xiao, X. Qian, D. Zhao, Y. Xu, *Chem. Commun.* **2008**, 1780.
 - [8] Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 600.
 - [9] T. Egawa, K. Hanaoka, Y. Koide, S. Ujita, N. Takahashi, Y. Ikegaya, N. Matsuki, T. Terai, T. Ueno, T. Komatsu, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 14157.
 - [10] X. Shu, A. Royant, M. Z. Lin, T. A. Aguilera, V. Lev-Ram, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien, *Science* **2009**, *324*, 804.
 - [11] a) T. E. McCann, N. Kosaka, Y. Koide, M. Mitsunaga, P. L. Choyke, T. Nagano, Y. Urano, H. Kobayashi, *Bioconjugate Chem.* **2011**, *22*, 2531; b) Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, W. Piao, M. Kusakabe, N. Saito, T. Terai, T. Okabe, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 5029.
 - [12] Y. Koide, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Terai, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5680.
 - [13] Y. Koide, M. Kawaguchi, Y. Urano, K. Hanaoka, T. Komatsu, M. Abo, T. Terai, T. Nagano, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 3091.
 - [14] L. Yuan, W. Lin, Y. Yang, H. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 1200.
 - [15] a) G. Ulrich, R. Ziessel, A. Harriman, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 1202; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1184; b) A. Loudet, K. Burgess, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 4891; c) N. Boens, V. Leen, W. Dehaen, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 1130.
-