

# 近红外荧光染料的结构、性质及生物荧光成像应用\*

王晓驰 常 刚 曹瑞军 孟令杰\*\*

(西安交通大学理学院化学系 西安 710049)

**摘 要** 近红外荧光生物成像技术由于具有深的组织穿透性、低背景荧光干扰、最小生物样本光损伤等特点引起人们越来越多的关注。开发高荧光效率、低毒性的近红外荧光染料是近红外荧光成像技术发展的关键所在。本文综述了五类主要的有机近红外荧光染料(菁类、BODIPY类、罗丹明类、方酸类、卟啉类)的研究进展,重点分析其结构与光学性质等构效关系,为近红外荧光染料的设计和制备提供指导。另外,总结了有机近红外荧光材料功能化修饰的主要方法以改善生物相容性、靶向性能等,最后对近红外荧光染料存在的主要问题以及未来的热点方向进行了分析和展望。

**关键词** 近红外 有机荧光染料 荧光成像 功能化

中图分类号:O621; TQ619.7 文献标识码:A 文章编号:1005-281X(2015)07-0794-12

## Structure and Properties of Near-Infrared Fluorescent Dyes and the Bioimaging Application\*

Wang Xiaochi Chang Gang Cao Ruijun Meng Lingjie\*\*

(Department of Chemistry, School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

**Abstract** The near-infrared (NIR) fluorescence imaging technologies have attracted considerable interest in recent years. They take great advantages for in vivo bioimaging because of their deep tissue penetration, minimum photo-damage to biological samples, and minimum interference from background auto-fluorescence by biomolecules in the living systems. It is still a crucial issue to develop NIR fluorescent dyes with high efficiency and low toxicity for fluorescence bioimaging technology. This article reviews the advances in the development of organic NIR fluorescent dyes including cyanines, BODIPYs, rhodamine analogues, squaraines, porphyrins; and the relationship between the structure and optical properties is highlighted to guide the design and preparation of NIR fluorescent dyes. In addition, We focus on discussing the main methodologies of functional modification to improve the biocompatibility and targeting capacities of organic NIR fluorescent dyes to realize multifunction and high performance. Finally, the future opportunities and challenges of NIR fluorescent dyes and NIR fluorescence imaging technologies are addressed to our understanding.

**Key words** near-infrared(NIR); organic fluorescent dyes; fluorescent imaging; functionalization

### Contents

#### 1 Introduction

#### 2 Organic NIR fluorescent dyes

##### 2.1 Cyanines

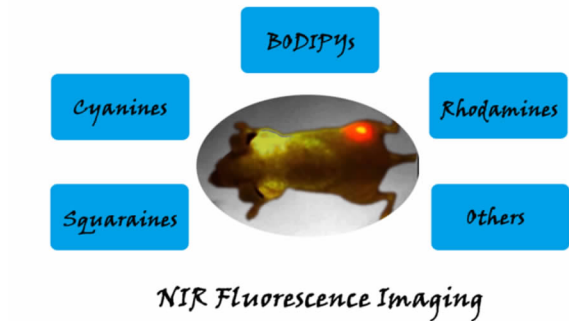
收稿:2014年10月,收修改稿:2015年1月,网络出版:2015年7月1日

\*国家自然科学基金项目(No.21174087,21474079),教育部新世纪优秀人才计划(No.NCET-13-0453),中国博士后面上基金和特别资助基金(No.2013M540738,2014T70909),中央高校基本科研业务费(No.08142027,08143101)资助

The work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.21174087,21474079), the Program for New Century Excellent Talents in University (No.NCET-13-0453), the China Postdoctoral Foundation Fund Project and Special Support Fund (No.2013M540738,2014T70909), and the Fundamental Funds for the Central Universities (No.08142027,08143101).

\*\* Corresponding author e-mail: menglingjie@mail.xjtu.edu.cn

- 2.2 BODIPYs
- 2.3 Rhodamine analogues
- 2.4 Squaraines
- 2.5 Others
- 3 Functional modification and bioimaging applications
  - 3.1 Functional modification
  - 3.2 Fluorescence bioimaging
- 4 Conclusion and outlook



1 引言

生物荧光成像技术能够在三维尺度上对生物分子、细胞及组织/器官进行实时、可视化的检测,能跟踪生物体的各种生理过程,了解生物分子及其结构与功能的关系,已成为当前生物医学领域的一个重要工具<sup>[1-3]</sup>。荧光成像技术具有非侵入、可视化、高时空分辨率、廉价、安全和快速等优势,已被广泛用于肿瘤诊断<sup>[4,5]</sup>、生物分子检测<sup>[6]</sup>、药物分布和代谢<sup>[7,8]</sup>等诸多领域。由于生物体本身缺乏可供有效分析的信号,通常需要借助外来的标记材料对生物样品进行分析。

生物体的一些组分(如黑色素、血红蛋白、细胞色素等)对可见光波段有较高的吸收或散射,会导致可见光的组织穿透性较差,且在此波段内生物组织有一定的自荧光干扰<sup>[9]</sup>。相比之下,血液和人体组织对 700 ~ 1100 nm 的近红外(NIR)光吸收和散射较低<sup>[10]</sup>,所以红色和近红外的荧光容易透过生物组织用于活体荧光成像。近红外荧光材料的吸收发射光谱要求都在近红外区,且应具有好的生物相容性、低毒或无毒性<sup>[5]</sup>。开发高荧光效率、低毒性的近红外荧光材料一直是近红外荧光成像技术发展中的热点和难点之一。

与贵金属纳米晶簇、半导体量子点、稀土掺杂纳米粒子、碳点等无机近红外荧光材料相比<sup>[11]</sup>,有机近红外荧光染料具有高的摩尔消光/吸光系数和荧光量子产率、生物相容性好、结构易调、价格低廉等特点而备受重视。本文综述了五类主要有机近红外

荧光染料(菁类,BODIPY 类,罗丹明类,方酸类和卟啉类等)的研究进展,重点比较其结构(母核结构、取代基的种类和位置)与光学性质(吸收/荧光波长、量子产率、光稳定性等)的关系;总结了有机近红外荧光材料功能化修饰改善生物相容性、靶向性能并实现多功能和高性能的主要方法及在生物成像中的应用,最后分析近红外荧光染料存在的问题并展望了未来的热点发展方向。

2 有机近红外荧光染料

2.1 菁类

菁染料(聚甲川菁染料)是一类优良的荧光染料,由奇数个碳原子组成共振次甲基(甲川基)共轭链并被两个含氮杂环封端构成的一类共轭有机小分子体系。其共振结构通式如图 1 所示。

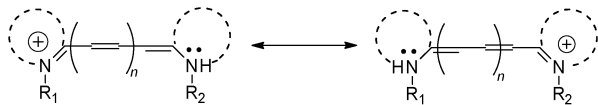


图 1 菁染料的化学共振结构  
Fig.1 The resonance structures of cyanine dyes

单甲川和三甲川菁的吸收波长在可见区,通过增加 1,2-亚乙烯基单元(CH=CH)延长共振聚甲川链可以使吸收波长发生红移。研究表明每增加一个 1,2-亚乙烯基单元可使吸收波长红移约 100 nm<sup>[12]</sup>,因此五甲川菁(Cy5)的最大吸收波长可达到近红外区(>700 nm),而七甲川菁(Cy7)的吸收波长甚至可以超 1000 nm。另外,通过引入稠合芳香烃来增加两端氮杂环的共轭结构也可使吸收波长红移,例如 IR820 的吸收波长(820 nm)比 IR783 的吸收波长红移 38 nm<sup>[13]</sup>。这两种方法都是通过扩大体系的  $\pi$ -共轭程度来有效调控菁染料的吸收和发射波长红移到近红外区域。取代基的电子效应对染料的吸收波长也有影响。通常在染料分子骨架上引入给电子基团时,如在中间位引入乙烯基,由于  $p-\pi$  共轭或  $\sigma-\pi$  共轭效应会增大体系的共轭程度,使最大吸收波长发生红移<sup>[14]</sup>。而共轭骨架上吸电子基团如醛基的存在<sup>[15]</sup>,会使得共轭体系上的电子云密度下降,电子跃迁能级升高,从而导致吸收波长发生蓝移<sup>[16]</sup>。分子链端的杂环核可以是吡啶、苯并吡啶、噻唑、苯并噻唑、萘噻唑、咪唑、喹啉等,其共轭结构大小和推拉电子效应不同也会影响菁染料的吸收和发射波长、荧光效率及光稳定性。其中,吡啶菁绿(ICG)的光稳定性和生物安全性较好,是美国食品

药品管理局 (FDA) 批准临床使用的近红外荧光染料之一<sup>[17]</sup>。

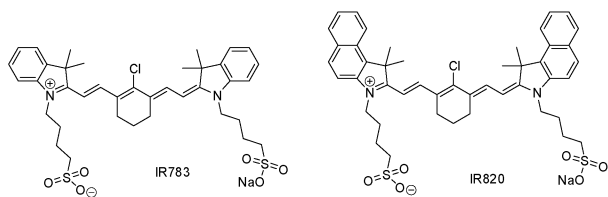


图2 菁染料 IR783 和 IR820 的结构式

Fig.2 The chemical structures of IR783 and IR820

随着菁染料中甲川链的增长,甲川链在光照下容易断裂,导致许多近红外的菁染料光稳定性变差,而且水溶液中量子产率也较低,影响了其生物荧光成像应用。但菁染料的结构具有很强的可修饰性,经过近年持续努力,已经找到一些提高染料稳定性和量子效率的方法。在多甲川链上引入氯原子或刚性桥环,或改变阴离子的种类都可能提高染料的稳定性和量子产率。例如,在聚甲川链的中心引入刚性的氯化环己烯能显著提高菁染料的量子产率和光稳定性<sup>[5,18]</sup>。不同含氮杂环取代中间氯原子(氯化环己烯部分)生成氨基菁染料<sup>[19]</sup> (CyN),相应的氨基菁染料量子产率虽有所降低,但进一步乙酰化的氨基菁染料 (CyNA) 可显著提高光稳定性<sup>[20]</sup>。另外,抑制染料分子中官能团的旋转或染料分子聚集也可以提高光稳定性和荧光量子产率<sup>[21]</sup>。

荧光染料的斯托克斯位移越大,即发射波长与吸收波长的差值越大,受背景荧光的干扰就越小,从而可以获得高精度的荧光信号。ITC (分子内电子转移) 是影响斯托克斯位移的主要因素,因此可通过提高分子内电子云密度的方法扩大斯托克斯位移<sup>[22]</sup>。例如在聚甲川链中心的环己烯上进一步引入含氮杂环,发射光的波长变化不大,但能显著降低

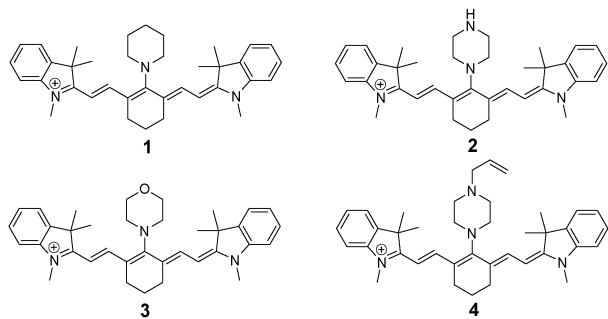


图3 不同氮杂环取代的氨基菁染料的结构式

Fig.3 The chemical structures of aminocyanine dyes with different nitrogen heterocyclic ring

最大吸收波长,含氮杂环中氮原子上的电子云密度越大其斯托克斯位移就越大,而且荧光量子效率也随之增加 (图3 和表1)<sup>[19]</sup>。

表1 甲川链中心环己烯上取代基对斯托克斯位移的影响

Table 1 The effect on stocks shift of substitute of cyclohexenyl on the methine chain

No.	$\lambda_{abs}/nm$	$\lambda_{em}/nm$	Stokes/nm	$\Phi$
1	666	781	115	0.18
2	688	787	99	0.16
3	693	791	98	0.13
4	750	784	34	0.11

近红外菁染料具有大的共轭结构,通常是疏水的,但生物荧光成像要求染料必须能够溶于水中。为改善菁染料的水溶性,通常可以向菁染料中引入羧基、磺酸基等强亲水性基团<sup>[23]</sup>。如果增加菁染料中芳杂环氮上侧链长度可增加亲油性,但这会导致对细胞线粒体的毒性增大<sup>[24]</sup>。

## 2.2 BODIPY 类

4,4'-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) 是二氟化硼二吡咯甲川染料及其衍生物的统称,具有高耐光漂白性、高摩尔吸收系数、高量子产率及对环境的酸碱度不敏感、吸收/发射峰窄等特性<sup>[25]</sup>,是近年研究最多的一类有机荧光化合物。Treibs 和 Kreuzer 在 1968 年首次得到第一个 BODIPY 化合物<sup>[26]</sup>,其母核结构如图 4a 所示。但 BODIPY 母核的吸收/发射波长分别在 490 nm 和 510 nm 左右,均不在近红外区,因此最近大量研究集中于对 BODIPY 母核进行修饰以调节其吸收/发射波长红移到近红外区,从而得到了一系列近红外 BODIPY 荧光染料。

对 BODIPY 母核的修饰主要有四种方法:第一,在母核上引入共轭结构,增大母核分子的  $\pi$ -共轭体系,使吸收和发射光红移;第二,使中心结构“刚性化”,让取代基和母核之间成环,增加化合物的刚性平面,使分子内扭转程度有所减少,从而使发射波长发生红移;第三,在 BODIPY 分子两端分别引入吸电

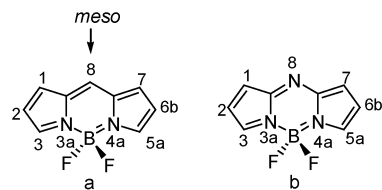


图4 BODIPY 与 Aza-BODIPY 的母核结构

Fig.4 The chemical structures of BODIPY core and Aza-BODIPY core

子基团和给电子基团,形成推拉电子结构;第四,将BODIPY 染料基本结构中 *meso* 位置的碳原子置换成氮原子形成氮杂 BODIPY (Aza-BODIPY, 其母核结构如图 4b 所示),从而使其吸收和发射波长红移到 650 nm,而且光稳定性好。

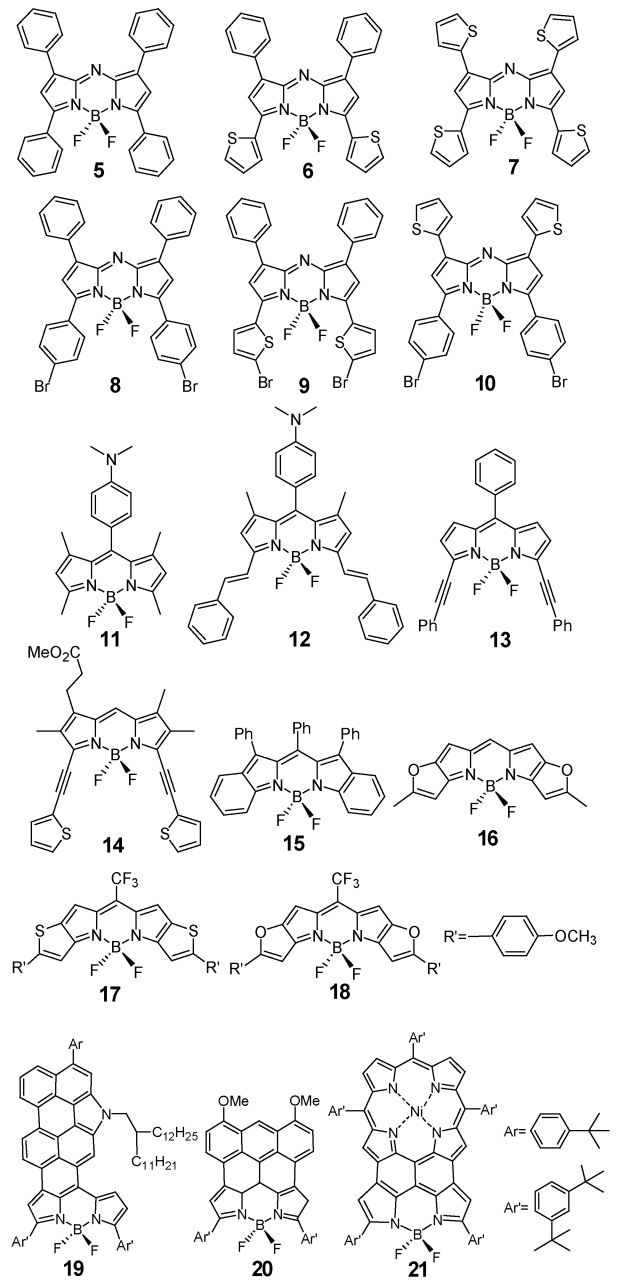


图 5 通过扩大  $\pi$ -共轭体系获得的近红外 BODIPY 分子结构  
Fig.5 The chemical structures of NIR BODIPY by expanding  $\pi$ -conjugate system

扩大 BODIPY 分子  $\pi$ -共轭体系的方式有:第一, $\alpha$ (3,5 位)或者  $\beta$ (1,7) 位引入芳香类基团如苯基、噻吩基等<sup>[27~30]</sup>,如图 5 中化合物 5~10;第二, $\alpha$  位引入烯属烃或者炔属烃<sup>[26,31]</sup>,如图 5 中化合物 12

表 2 扩大  $\pi$ -共轭体系获得的近红外 BODIPY 染料的吸收、发射波长

Table 2 The wavelength of NIR BODIPY by expanding  $\pi$ -conjugate system

No.	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$
5	650	673
6	646	696
7	710	770
8	658	687
9	735	751
10	694	729
11	500	512
12	620	631
13	605	622
14	674	686
15	658	—
16	579	583
17	731	754
18	723	738
19	670	742
	783	830
20	650, 760, 826	—
21	890	—

14;第三,BODIPY 分子中吡咯环上稠合不同的芳香环如苯、呋喃、噻吩<sup>[8,32]</sup>,如图 5 中化合物 15~18;第四,BODIPY 的“之”字边缘稠合富电子芳环如二萘嵌苯、萸、卟啉等<sup>[33,34]</sup>,如图 5 中化合物 19~21。同时这些方法也适用于 Aza-BODIPY。

通过对不同结构及相关光谱数据比较可知,使 BODIPY 波长红移的规律为电子云密度越大,对分子中  $\pi$ -共轭体系供电子能力越强;共轭体系越长,

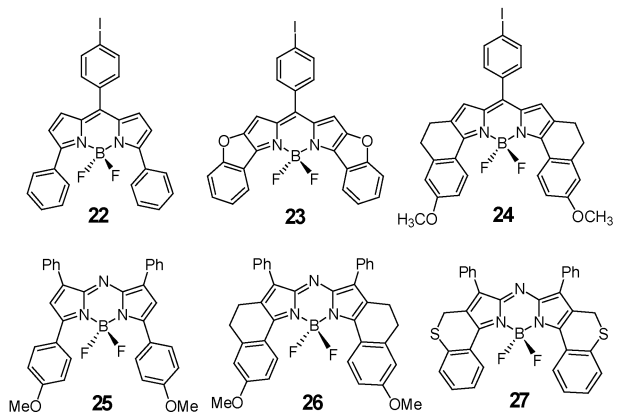


图 6 通过中心结构“刚性化”获得的近红外 BODIPY 分子结构  
Fig.6 The chemical structures of NIR BODIPY by restricting conformation



波长红移越大。具体为:1)取代位置影响, $\alpha$ 位 $>$  $\beta$ 位;2) $\alpha$ 位取代基团,噻吩 $>$ 苯,烯烃 $>$ 炔烃;3)吡咯环上的稠合芳烃,噻吩 $>$ 呋喃 $>$ 苯。

使中心结构“刚性化”是调控发光波长和提高荧光效率的一个有效手段,即将 $\alpha$ 苯基取代的BODIPY中的苯基与BODIPY形成环状链接,从而阻止取代苯基的自由旋转,形成结构受限的BODIPY分子,如图6。此方法不仅可以使波长红移,还能防止因扩大 $\pi$ -共轭体系引起的量子产率降低<sup>[35~37]</sup>,如表3所示。

在BODIPY结构中引入推拉电子基团是调控染料荧光波长和量子效率的另一重要手段。例如,在1,3,5,7-四取代苯基的Aza-BODIPY中,1,7苯基的对位引入吸电子基团并在3,5苯基的对位引入供电子基团,如图7;或在芳环稠合的BODIPY,在中间位(8位)引入吸电子基团,在稠合芳环上引入给电子基团如图5中化合物17、18,可形成推-拉电子结构<sup>[38]</sup>。此方法能同时增加HOMO(最高占有轨道)能量并降低LUMO(最低未占有轨道)能量,使HLG(最高占有轨道与最低未占有轨道的能量间隙)减小,引起波长红移。如表3所示,这些含有推-拉电子结构的BODIPY类荧光染料的量子产率也较高。

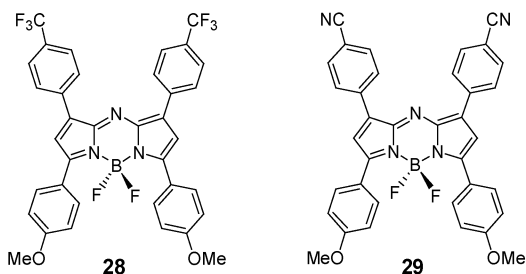


图7 通过推拉电子效应获得的近红外BODIPY分子结构

Fig.7 The chemical structures of NIR BODIPY by a push-pull effect

根据能隙规则,随着 $S_0-S_1$ 能隙的增加, $S_0-S_1$ 的无辐射灭活可能性增加,能量以热或者转移至单线态氧的形式呈现的可能性增加。所以荧光染料在短波长时量子效率较高,而近红外荧光染料的量子产率容易随着 $\pi$ -共轭体系的扩大引起的波长红移而降低(见表3)。另外,重原子效应<sup>[39]</sup>如图5中化合物5、8的量子产率分别为0.36和0.15,乙酰基的荧光猝灭效应如图8中化合物34~36<sup>[25]</sup>也会使染料的量子产率降低(表3)。

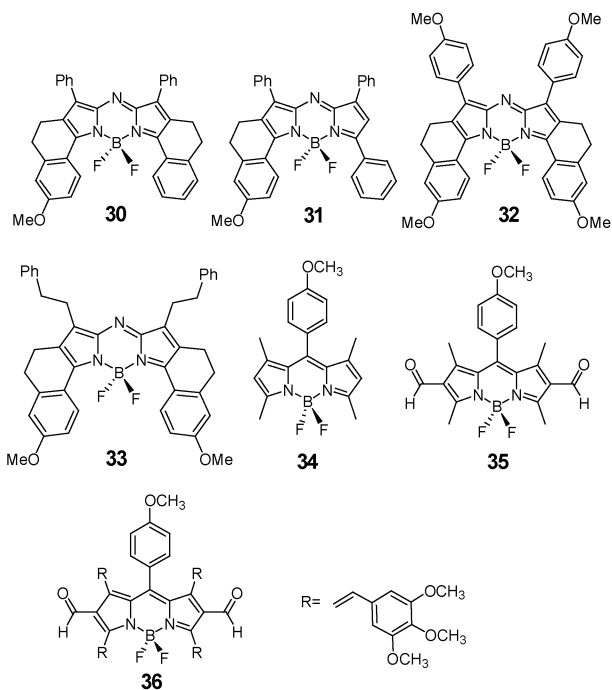


图8 几种量子产率随波长红移而降低的BODIPY分子结构

Fig.8 The chemical structures of BODIPY whose quantum yield decreasing with bathochromic-shift

表3 一系列BODIPY染料的吸收/发射波长及量子产率

Table 3 The wavelength and quantum yield of BODIPY dyes

No.	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi$
22	558	—	0.18
23	637	647	0.34
24	658	673	0.13
25	688	715	0.36
26	740	752	0.28
27	706	730	0.11
28	704	741	0.34
29	716	755	0.29
30	688	710	0.44
31	723	734	0.32
32	736	748	0.29
33	721	732	0.31
34	500	510	0.8
35	504	514	0.48
36	688	722	$<0.1$

## 2.3 罗丹明类

罗丹明是由3,6位氨基取代的氧杂蒽母体与9位碳原子取代芳基构成的一类有机荧光染料。因其具有高摩尔吸收系数、高量子产率以及水溶液中耐光漂白等优良的光物理性质,受到人们的重视并得到广泛应用<sup>[40,41]</sup>。经典的罗丹明染料如罗丹明B、罗丹明6G、罗丹明101的吸收/发射波长在可见光区(500~600 nm)<sup>[42]</sup>,不适于生物体荧光成像。

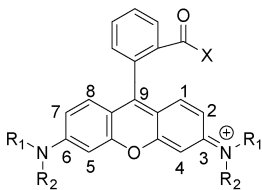


图 9 罗丹明染料的分子结构  
Fig. 9 The chemical structures of rhodamine dyes

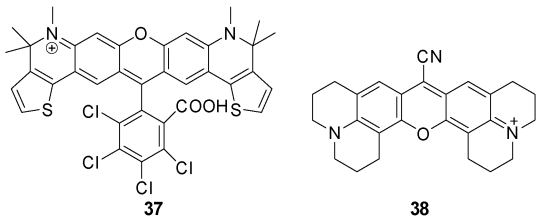


图 10 通过扩大氧杂蒽环得到的近红外罗丹明染料  
的分子结构  
Fig. 10 The chemical structures of NIR rhodamine dyes by  
expanding xanthene

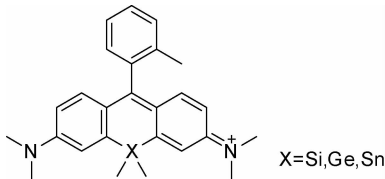


图 11 14 族罗丹明分子结构  
Fig. 11 The chemical structures of Group14 rhodamine

为得到近红外罗丹明类染料,可通过对氧杂蒽中心进行修饰:稠合芳杂环以扩大氧杂蒽环如化合物 **37** ( $\lambda_{\text{abs}}$ :631 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ :648 nm)<sup>[43]</sup>,9 位引入强吸电子基团—CN 等如化合物 **38** (罗丹明 800,  $\lambda_{\text{abs}}$ :680 nm,  $\lambda_{\text{em}}$ :700 nm)<sup>[44]</sup>,用 N、S 等其他原子取代 O 桥原子<sup>[45]</sup>。

上述方法制备的近红外罗丹明类化合物存在合成工艺复杂、吸收和荧光强度低、斯托克斯位移较小 (<35 nm) 等问题<sup>[46,47]</sup>。最近陆续有一些新型近红外罗丹明类化合物被报道,包括 Si-派洛宁,14 族 (Group14) 罗丹明<sup>[48]</sup> 和 Changsha 近红外荧光染料<sup>[49]</sup> (CS NIRs),它们的合成相对简单而且具有较高的量子效率,在生物成像方面具有很大的潜能。

2008 年肖义和钱旭红团队首次用 Si 原子取代 O 桥原子形成 Si 杂蒽化合物<sup>[50]</sup>,  $\lambda_{\text{abs}}$  (641 nm) 和  $\lambda_{\text{em}}$  (659 nm) 比相同结构的 O 杂蒽化合物红移约 90 nm。随后用 Si、Ge、Sn 原子取代罗丹明中 O 桥原子形成的 14 族罗丹明近红外荧光染料被大量报道,分别命名为 Si-罗丹明 (SiR)、Ge-罗丹明 (GeR)

表 4 SiR、GeR 吸收/发射波长及量子产率

group14 rhodamine	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi$
SiR	646	660	0.31
GeR	635	649	0.34

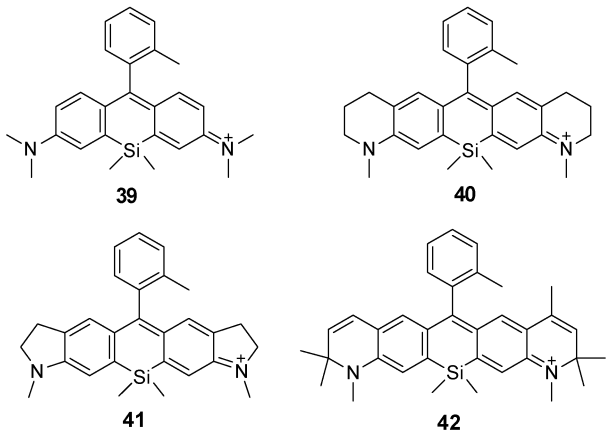


图 12 几种近红外 SiR 荧光染料分子结构  
Fig. 12 The chemical structures of NIR SiR dyes

表 5 一系列近红外 SiR 荧光染料吸收/发射波长,量子产率

SiR	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi$
SiR650	646	660	0.31
SiR680	674	689	0.35
SiR700	691	712	0.12
SiR720	721	740	0.05

和 Sn-罗丹明 (SnR) (图 11)。该团队还进一步阐明光谱红移的机制:Si/Ge/Sn-C (甲基) 的  $\sigma^*$  轨道与相邻的一个  $\pi^*$  轨道形成  $\sigma^*-\pi^*$  共轭效应,使 LUMO 能级降低和 HOMO 能级升高,从而引起的能隙显著减小,吸收和发射波长均发生红移<sup>[50]</sup>。其中, SiR 和 GeR 具有传统罗丹明染料的良好物理性质,如良好的水溶性、水溶液中较高量子产率和耐光漂白性,具有重要应用潜力。另外,基于扩大氧杂蒽环可延长波长的思想,对 SiR650 (化合物 **39**) 经进一步修饰得到了一系列近红外荧光 Si-罗丹明染料<sup>[51]</sup>: SiR680 (化合物 **40**)、SiR700 (化合物 **41**) 和 SiR720 (化合物 **42**),它们在 PBS 水溶液 (pH = 7.4) 中光稳定性好,量子产率较高,已成功用于小鼠癌细胞的荧光成像。需要指出的是,这些染料的荧光效率随荧光波长的红移迅速下降,制备高量子效率的近红外 SiR 仍是一个具有挑战性的工作。

CS NIRs 是最近研究得到的一类同时具有罗丹明结构和花菁结构的新型近红外荧光染料。由于共轭结构的增加,CS NIRs 的吸收/发射波长比传统罗丹明染料有明显红移,同时又具有罗丹明染料优良

的光物理学性质,如高摩尔吸收系数,高量子产率,耐光漂白,化学稳定性好等。例如,经典罗丹明染料的吸收/发射波长与氨基取代基关系密切(罗丹明 6G > 罗丹明 B > 罗丹明 101),而相应的 CS NIRs 的吸收/发射波长也具有类似性质,见表 6。

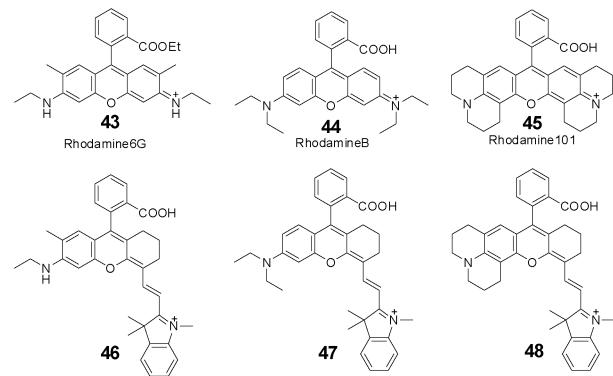


图 13 几种传统罗丹明染料与 CS NIRs 分子结构

Fig. 13 The chemical structures of traditional rhodamine dyes and CS NIRs

表 6 几种传统罗丹明染料与 CS NIRs 的吸收/发射波长,量子产率

Table 6 The wavelength and quantum yield of traditional rhodamine dyes and CS NIRs

dyes	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\Phi$
rhodamine 6G	530	551	0.95
46	688	721	0.56
rhodamine B	553	572	0.53
47	720	750	0.30
rhodamine 101	574	599	0.89
48	728	765	0.29

## 2.4 方酸类

方酸类荧光染料具有图 14 所示的大平面  $\pi$  共轭体系,并具有独特的供体-受体-供体结构,容易形成刚性平面的稳定两性离子共振结构,因此其溶液在红外区有强的吸收和发射。方酸类染料通常具有良好的光稳定性,可通过二羟基环丁烯二酮与富电子芳环或芳杂环化合物(如 *N,N*-二烷基苯胺、酚、吡咯、喹啉等)进行亲核取代反应制得<sup>[52,53]</sup>。

方酸染料中含有两性离子性质的氧,使得分子的极性大于开链的阳离子菁染料,在水溶液中的荧光量子产率和荧光寿命较短。但是,当它与疏水的蛋白质(如牛血清蛋白、免疫球蛋白 IgG)结合时,荧光寿命和量子产率会显著提高<sup>[54]</sup>,因此特别适合蛋白等生物分子的荧光标记。

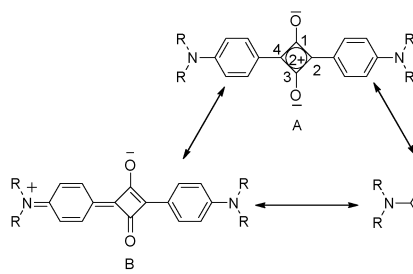


图 14 方酸类荧光染料的共振结构

Fig. 14 The resonance structures of squarain dyes

为调整方酸类染料的吸收和荧光波长,可以通过改变  $\pi$ -共轭体系的大小来实现,例如用苯并噻唑,喹啉替代方酸中的苯基<sup>[53]</sup>。如果在芳环上有卤素取代时(如图 15),也能使吸收/发射波长红移,并提高量子产率,这种卤素效应顺序为  $\text{I} > \text{Br} > \text{Cl}$ <sup>[55]</sup>(如表 7)。值得注意的是,方酸染料中的 Br、I 等重原子效应刚好和 BODIPY 中的重原子效应相反。另外,当方酸类中心环的 4 位用各种的吸电子基团取代时(如图 16)<sup>[56]</sup>,也会明显影响其吸收/发射波长、量子产率和摩尔吸收系数(如表 8)。其中,二氰基乙烯基取代能在轻微减少量子产率和摩尔吸收系数的情况下使吸收/发射波长分别红移 46/52 nm。

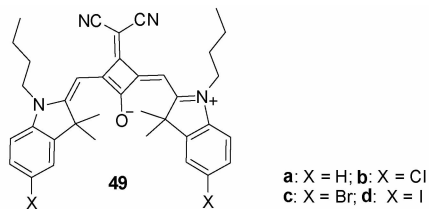


图 15 卤素取代的方酸染料分子结构

Fig. 15 The chemical structures of halogen substituted squarain dyes

表 7 染料 49 的吸收/发射波长,荧光强度,量子产率

Table 7 The wavelength and quantum yield of squarain dyes 49

No.	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\varepsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\Phi$
49a	683	698	195 000	0.37
49b	694	708	215 000	0.47
49c	695	710	216 000	0.47
49d	699	713	24 000	0.58

方酸类荧光分子中同时引入两个羧基及多个磺酸基时,可提高其水溶性<sup>[57]</sup>。但磺酸基是较强的吸电子基团,它的位置对吸收/荧光波长、量子效率等都会有显著影响,因此通常将磺酸基修饰在取代烷基的末端而不与  $\pi$ -共轭结构直接相连。

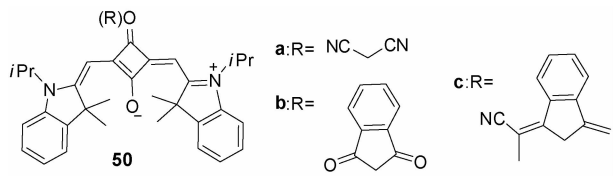


图 16 吸电子基取代的方酸染料分子结构  
Fig. 16 The chemical structures of acceptor-substituted squaraine dyes

表 8 染料 50 的吸收/发射波长, 荧光强度, 量子产率  
Table 8 The wavelength, intensity and quantum yield of squaraine dyes (50, 50a, 50b, 50c)

No.	$\lambda_{\text{abs}}/\text{nm}$	$\lambda_{\text{em}}/\text{nm}$	$\varepsilon(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$	$\Phi$
50	637	646	250 000	0.24
50a	683	698	185 000	0.21
50b	678	705	113 000	0.07
50c	657	701	80 000	0.01

2.5 其他类

卟啉类、茚类、轮烯类等具有大共轭结构的有机分子也可能产生强烈的近红外荧光, 个别化合物在近红外荧光成像中也有重要应用。其中卟啉类化合物包含四个或四个以上吡咯环或杂环以及四个或以上桥碳原子(甲川), 是一类天然或合成的聚吡咯大环化合物。最简单的卟啉母核为 18 $\pi$  电子共轭体系(如图 17 所示), 在可见光区有较高的吸收, Soret band 约 400 nm, Q-bands 约 500 ~ 600 nm。其电子性质很灵活, 特别容易受外围共轭部分的影响, 因此在卟啉环外围偶联不同的芳香环(芳香烃或芳杂环)来扩大  $\pi$  共轭体系<sup>[58]</sup>, 容易将吸收光谱红移于近红外区。外围耦合的主要方式可分为 3 类: (1)  $\beta, \beta$  芳烃耦合(化合物 51,  $\lambda_{\text{abs}}$ : 790 nm) (2) meso,  $\beta$  芳烃耦合(化合物 52,  $\lambda_{\text{abs}}$ : 677 nm) (3)  $\beta$ , meso,  $\beta$  耦合(如化合物 53,  $\lambda_{\text{abs}}$ : 677 nm 和 1204 nm), 如图 18。

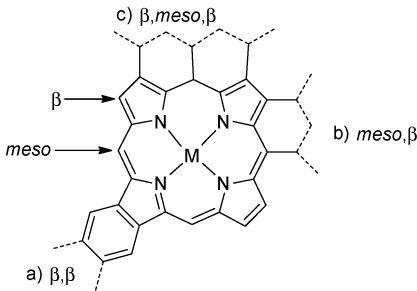


图 17 卟啉母核结构及外围偶合方式  
Fig. 17 The core structure of porphyrin and fusion types

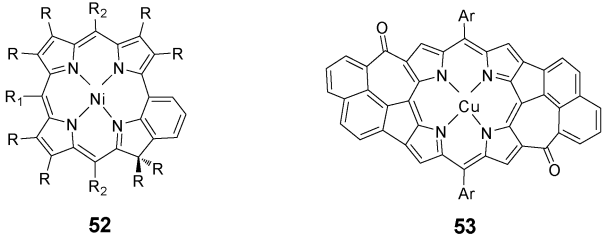
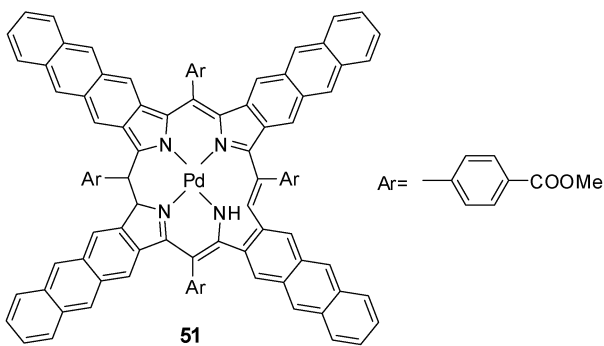


图 18 不同类型芳烃耦合的卟啉分子结构  
Fig. 18 The chemical structure of different types fused porphyrin

另外, 对卟啉的环内进行修饰也可以扩大其  $\pi$  共轭体系。普通卟啉环中的一个吡咯环反转得到 N-confused 卟啉(NCP, 如图 19 所示)。如果将功能基团如炔基进一步连接于中心的  $\text{sp}^2$  碳原子上可得到亚乙烯基桥 NCP(化合物 54)<sup>[59]</sup>。由于环内功能基团可相互作用, 可扩大卟啉环的  $\pi$ -共轭体系, 能明显提高 HOMO 能量, 使其最大吸收波长在  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中为 775 nm。

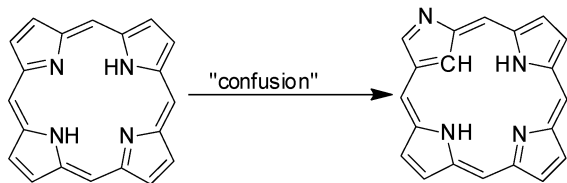


图 19 标准卟啉与 NCP 分子结构  
Fig. 19 The chemical structure of standard porphyrin and NCP

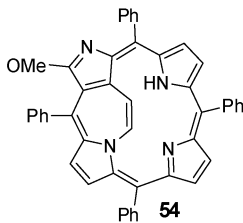


图 20 亚乙烯基桥 NCP  
Fig. 20 The chemical structure of etheno-bridged NCP



由四个以上吡咯环或杂环以及四个以上桥碳原子构成的卟啉衍生物称为大环卟啉类化合物,其光物理性质与分子中的电子芳香性和结构平面性密切相关。用 S 或 Se 原子取代吡咯环上的部分 N 原子来对大环卟啉中心进行修饰,可以增加腔内分子间氢键的相互作用,其分子结构相对于全部 Aza 式的大环卟啉更具平面性<sup>[60]</sup>,使其吸收和荧光波长红移。

### 3 荧光染料的功能化修饰和荧光成像应用

#### 3.1 功能化修饰

有机荧光染料用于生物荧光成像时,除了要具有近红外的吸收/发射波长、高的量子效率和较高的耐光漂白性外,还应该具有良好的水溶性、低的生物毒性、特异的组织或细胞靶向性以及良好的细胞穿透性等,从而达到更安全、高效、灵敏的荧光成像目的。有些情况下,还可以将荧光分子修饰到生物分子、药物以及纳米载体表面,在研究生物分子功能、药物分布和代谢、疾病尤其是肿瘤的诊断与治疗中发挥重要作用。

为了提高有机荧光染料的水溶性和生物相容性,可以将一些天然或人工合成的生物分子修饰到荧光染料上<sup>[57,61]</sup>。例如,PEG 具有柔软的亲水链和低毒性,能避开体内网状内皮系统 (reticuloendothelial system, RES) 的识别和血液中巨噬细胞的清除,常用来修饰治疗性多肽、蛋白质和化疗药物等以提高药物的水溶性和生物相容性并延长在体内的循环时间<sup>[62]</sup>。因此,PEG 也已被用于近红外荧光染料的修饰,可有效提高其水溶性、生物相容性与体内循环时间<sup>[63]</sup>。另外,血清蛋白(BSA)是血浆中存在最丰富的蛋白之一,它对内生或外源性配体在血液中的运输、沉积起到重要作用。用 BSA 对近红外荧光染料进行修饰,不仅可以增加水溶性和生物相容性,还可以提高它们的荧光强度<sup>[64,65]</sup>。

为了提高对肿瘤等病灶的荧光成像检测的灵敏性,可以将与肿瘤细胞中特有的受体准确结合的靶分子修饰到近红外荧光染料上。当用于肿瘤的诊断与治疗时,有助于将染料分子靶向的送达肿瘤组织或细胞部位,提高成像时的特异性、灵敏性。目前常用的靶向分子包括如叶酸、单克隆抗体和一些多肽分子等。例如,在许多的肿瘤组织中存在叶酸受体过表达的现象,因此用叶酸对近红外荧光染料进行表面修饰可使其能选择性的富集于肿瘤组织中,特别适用于肿瘤的早期检测<sup>[66]</sup>(图 21)。如果用叶酸修饰的 PEG 对荧光染料进行改性,能同时提高染料

的水溶性、生物相容性和靶向性能,极大地提高近红外荧光染料在生物体内荧光成像的效果<sup>[62]</sup>。有些肿瘤组织(如卵巢癌细胞)中存在  $\beta$ -D-半乳糖受体的过表达,因此用对包含  $\beta$ -D-半乳糖受体的 H-凝集素有靶向作用的半乳糖基人血清蛋白(hGSA)和葡萄糖基人血清蛋白(Glu-HSA)来修饰近红外荧光染料,也可以显著提高这些肿瘤组织的荧光成像灵敏度<sup>[67,68]</sup>。另外,利用单抗与靶细胞特异性结合的特点,可用单克隆抗体修饰近红外荧光染料,能将荧光分子靶向运送并累积于病灶,实现高效荧光成像分析。例如,表皮生长因子受体是一种重要的靶向受体,存在于多种肿瘤组织中,已有文献证明用表皮生长因子受体对应的单克隆抗体修饰近红外荧光染料,可对肿瘤的非侵害性光免疫疗法进行指导与疗效检测<sup>[69,70]</sup>。

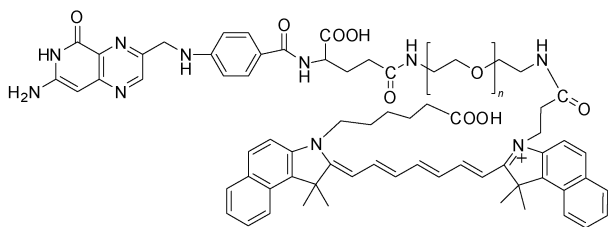


图 21 PEG 和叶酸修饰的 NIR 染料结构<sup>[66]</sup>

Fig. 21 The chemical structure of NIR dye modified by PEG and folate<sup>[66]</sup>

#### 3.2 生物荧光成像

近红外荧光探针可对细胞或组织内的一些重要物质如活性氧( $\text{H}_2\text{O}_2$ 、氢氧自由基、单线态等)、活性氮( $\text{ONOO}^-$ 、 $\text{NO}$ 、 $\text{NO}^+$ 等)、硫醇、 $\text{H}_2\text{S}$ 、金属离子( $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 等)、酶、pH 等进行检测<sup>[71]</sup>。这些物质在体内含量过高或过低都严重影响着人体健康,对它们的有效检测对人体健康水平评价和疾病诊疗都具有重要意义。这些分子通过与 NIR 染料上的功能基团相互作用而使荧光熄灭或增强,这是荧光法分子检测的基础。

例如硒(Se)功能化的菁染料 Cy-PSe<sup>[72]</sup>和

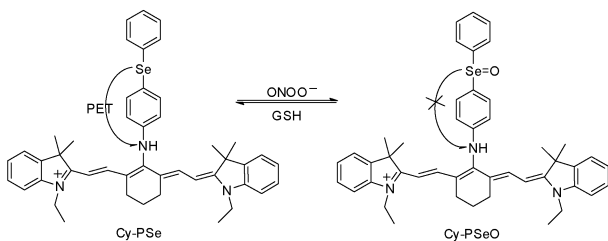


图 22 Cy-PSe 检测  $\text{ONOO}^-$  的机理<sup>[72]</sup>

Fig. 22 A mechanism for sensing  $\text{ONOO}^-$  by Cy-PSe<sup>[72]</sup>

SeCy7<sup>[73]</sup>可用于分别检测具有氧化性的 ONOO<sup>-</sup> 和 ClO<sup>-</sup> 如图 22 所示。利用光致电子转移 (PET) 机理,活性硒的菁染料荧光很弱,而被氧化后的染料荧光显著增强。该菁染料在溶液及活细胞中均有响应,并且对活细胞毒性极小。

又如图 23 所示,具有螺环结构的 SiR 染料 SiR-Hg<sup>[74]</sup> 荧光很弱,而与 Hg<sup>2+</sup> 特异性反应后螺环打开,在 680 nm 左右荧光增强,且随着 Hg<sup>2+</sup> 浓度增大荧光逐渐增强。实验表明此染料可透过细胞膜而应用于活细胞内 Hg<sup>2+</sup> 的成像检测。

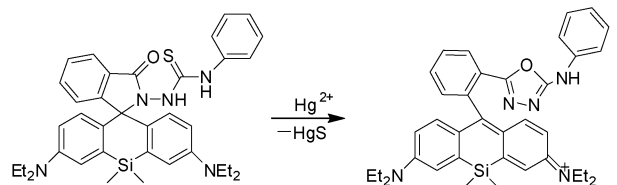


图 23 SiR-Hg 检测 Hg<sup>2+</sup> 的机理<sup>[74]</sup>

Fig. 23 A mechanism for sensing Hg<sup>2+</sup> by SiR-Hg<sup>[74]</sup>

一些具有扭曲分子结构的近红外荧光染料的荧光性能与环境黏度密切相关<sup>[75]</sup>。将它们送入细胞后,通过荧光成像和荧光性能检测还可以用来评估细胞内不同位置的黏度、线粒体的黏度和细胞内溶酶体的黏度等关键数据<sup>[76~79]</sup>。通过对活细胞内微环境黏度的荧光成像能有效评价细胞的健康水平和药物性能。

如果将近红外荧光染料靶向聚集于肿瘤部位,可以通过荧光成像获得肿瘤的位置、分布和尺寸等检测和诊断的重要信息。例如表皮生长因子(低分子量多肽)修饰的 NIR 染料(Cy5.5)与荧光熄灭剂(BHQ-3)可形成纳米粒子(EGF-NP)<sup>[80]</sup>。该纳米粒子因自猝灭荧光极弱,被靶向运送到对表皮生长因子受体过表达的肿瘤组织之中后,由于内化及溶酶体降解作用使染料与熄灭剂分离,可以显示出强的近红外荧光。由于该纳米粒子具有靶向性、成像速度快、代谢快等特点可被用于多种肿瘤的诊断。另外,高密度脂蛋白修饰的一种卟啉类 NIR 纳米粒子也同样实现了对体外和活体 KB 癌细胞的高分辨荧光成像<sup>[81]</sup>。Kelderhouse 等将叶酸和 DUA 两种靶向分子修饰到 NIR 荧光探针上,可以高分辨获得多种肿瘤的位置和尺寸信息。在荧光成像指导下,能完全切除肿瘤组织而不过分伤害周围的正常组织,这种荧光成像指导下的可视化手术为精确的肿瘤手术提供了可能<sup>[82]</sup>。

近红外荧光染料也可以作为一种辅助手段修饰化学进展, 2015, 27(7): 794 ~ 805

到药物或药物载体的表面,通过荧光成像的方法追踪并检测药物在体内的运输、释放、分布,使这些过程可视化并利于进行控制。例如将荧光分子与喜树碱用双硫键连接,封装于 PEG-PLA 纳米粒中,由于肿瘤组织中富集的 GSH 能有效切断双硫键,使得荧光分子荧光增强,而喜树碱则用于杀死癌细胞,能同时实现靶向送药和可视化检测疗效等多重目的<sup>[83]</sup>。另外,如果将荧光染料作为功能性单元修饰到多功能纳米载药系统中,与其他的成像剂协同作用可构成多模成像体系能增强疾病诊断以及与疗效评价的质量。例如,在脂质体等药物载体上同时修饰磁性金属氧化物颗粒、近红外荧光分子等,综合利用这些非侵入式成像诊断技术有望对药物在体内的转运进行精确地检测和控制<sup>[84~86]</sup>。

#### 4 总结和展望

理想的生物荧光成像用荧光染料应该具有近红外的吸收/发射峰、大的斯托克斯位移、稳定的光性能(耐光漂白)、良好的水溶性、低的生物毒性,并具有一定的反应性官能团便于进一步高性能和多功能的修饰。经过科学家的努力,近年已经获得了大量性能优异的近红外荧光染料,并获得了一系列荧光染料的构效关系。例如,吸收和发射波长与化合物的共轭结构密切相关,当共轭程度达到一定程度方可产生近红外荧光。但随着共轭程度增加,荧光量子效率和耐光漂白性能会显著下降。如果在共轭结构中引入刚性结构,能同时提高染料的量子效率和光稳定性。而且与柔性链烃类有机物(菁类)相比,具有刚性共平面结构的芳烃类化合物通常具有更好的量子效率。另外,取代基的类型和位置也常用来调整荧光性能,例如在共轭结构中引入推拉电子基团,可方便的调控吸收/发射波长,并优化斯托克斯位移和荧光量子效率。在荧光染料中引入羧基、磺酸基、羟基、氨基等强亲水性基团,还能有效改善其水溶解性能,但需要注意如果直接和共轭结构相连会影响荧光性能。这些强亲水性基团同时也可以作为反应性基团与生物分子等相连,改善荧光染料的生物相容性和靶向性能等或用于构筑多功能体系。

2008 年和 2014 年,诺贝尔化学奖分别授予荧光蛋白的发现者(美国科学家 Osamu Shimomura, Martin Chalfie 和钱永健)和高分辨荧光显微技术的重要推动者(美国科学家 Eric Betzig, William Moerner 和德国科学家 Stefan Hell)。6 年内生物荧光成像技术相关领域两次获得诺贝尔化学奖,一方

面说明生物荧光成像技术的重要性,另一方也必然极大的推动该技术领域的关注和发展。

近红外荧光探针就是该领域最关键的核心技术之一,虽然对于有机近红外荧光染料的合成方法和构效关系的研究上已经取得大量成果,但目前商业化的产品并不多,在使用过程中还存在诸多问题,主要体现在:(1)相对于半导体量子点等无机荧光探针相比,虽然结构灵活易调,斯托克斯位移大,但其耐光漂白性比较差,大多数染料的荧光量子效率尚待进一步提高;(2)改善荧光染料光稳定性、量子效率和水溶性的同时,必须考虑和系统研究结构变化对毒性或安全性的影响;(3)荧光染料在生物荧光成像过程中容易和生物体内的蛋白等生物分子相互作用,从而影响其光学性能和蛋白的生理功能,但这一领域的研究还比较欠缺;(4)大部分染料对待检测的组织、细胞或生物分子缺乏特异性,如何提高染料分子的靶向性能和进入细胞的能力,有待深入研究。

因此,在有机近红外荧光染料的研究方面仍有诸多领域和方向值得关注:(1)进一步深入研究染料分子的构效关系,优化和提高染料的光稳定性和量子效率;(2)深入研究染料分子与生物分子、细胞器、细胞等的相互作用,优化染料分子结构,增强其作用的特异性并减少其生物毒性;(3)开发新的合成路线和合成方法,推动性能优异近红外荧光染料商业化和实用化;(4)将染料分子作为功能单元与其他功能结构结合构筑多功能和高性能体系,也是目前和未来的一个研究热点。相信随着超高分辨荧光显微设备的出现和近红外荧光染料的快速发展,生物荧光成像技术在解释生命现象、示踪药物作用过程以及疾病的诊断等领域会发挥更加重要的作用。

### 参 考 文 献

- [1] Weissleder R, Pittet M J. *Nature*, 2008, 452: 580.
- [2] Chen M, Yin M. *Prog. Polym. Sci.*, 2014, 39: 365.
- [3] Yuan L, Lin W, Zheng K, He L, Huang W. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 42: 622.
- [4] Yuan A, Wu J, Tang X, Zhao L, Xu F, Hu Y. *J. Pharm. Sci. Us.*, 2013, 102: 6.
- [5] Luo S, Zhang E, Su Y, Cheng T, Shi C. *Biomaterials*, 2011, 32: 7127.
- [6] Guo Z Q, Park S, Yoon J, Shin I. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41: 15.
- [7] Han J, Burgess K. *Chem. Rev.*, 2010, 110: 2709.
- [8] Ni Y, Wu J. *Org. Biomol. Chem.*, 2014, 12: 3774.
- [9] Hayashi K, Nakamura M, Miki H, Ozaki S, Abe M, Matsumoto T, Ishimura K. *Adv. Funct. Mater.*, 2012, 22: 3539.
- [10] Hilderbrand S A, Weissleder R. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, 14: 71.
- [11] Qian G, Wang Z Y. *Chem. Asian J.*, 2010, 5: 1006.
- [12] Mishra A, Behera R K, Behera P K, Mishra B K, Behera G B. *Chem. Rev.*, 2000, 100: 1973.
- [13] James N S, Chen Y, Joshi P, Ohulchanskyy T Y, Ethirajan M, Henary M, Strekowski L, Pandey R K. *Theranostics*, 2013, 3: 692.
- [14] Peng X, Yang Z, Wang J, Fan J, He Y, Song F, Wang B, Sun S, Qu J, Qi J, Yang M. *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, 133: 6626.
- [15] Cao J, Hu C, Sun W, Xu Q, Fan J, Song F, Sun S, Peng X. *RSC. Adv.*, 2014, 4: 13385.
- [16] Wang L Y, Chen Q W, Zhai G H, Wen Z Y, Zhang Z X. *J. Mol. Struct.: THEOCHEM*, 2006, 778: 15.
- [17] Desmettre T, Devoisselle J M, Mordon S. *Surv. Ophthalmol.*, 2000, 45: 15.
- [18] Strekowski L, Lipowska M, Patonay G. *J. Org. Chem.*, 1992, 57: 4578.
- [19] Yu L, Li T, Wang Q, Li L, Chen L. *Res. Chem. Intermediat.*, 2014, 40: 1469.
- [20] Samanta A, Vendrell M, Das R, Chang Y. *Chem. Commun.*, 2010, 46: 7406.
- [21] Silva G L, Ediz V, Yaron D, Armitage B A. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, 129: 5710.
- [22] Wu X, Chang S, Sun X, Guo Z, Li Y, Tang J, Shen Y, Shi J, Tian H, Zhu W. *Chem. Sci.*, 2013, 4: 1221.
- [23] Bouteiller C, Clavé G, Bernardin A, Chipon B, Massonneau M, Renard P. *Bioconjugate Chem.*, 2007, 18: 1303.
- [24] Luo S, Tan X, Qi Q, Guo Q, Ran X, Zhang L, Zhang E, Liang Y, Weng L, Zheng H, Cheng T, Su Y, Shi C. *Biomaterials*, 2013, 34: 2244.
- [25] Zhu S, Zhang J, Vegesna G, Tiwari A, Luo F, Zeller M, Luck R, Li H, Green S, Liu H. *RSC Adv.*, 2011, 2: 404.
- [26] Boens N, Leen V, Dehaen W. *Chem. Soc. Rev.*, 2012, 41: 1130.
- [27] Killoran J, Allen L, Gallagher J F, Gallagher W M, O'Shea D F. *Chem. Commun.*, 2002, 17: 1862.
- [28] Bellier Q, Dalier F, Jeanneau E, Maury O, Andraud C. *New J. Chem.*, 2012, 36: 768.
- [29] Hall M J, McDonnell S O, Killoran J, O'Shea D F. *J. Org. Chem.*, 2005, 70: 5571.
- [30] Zhang X, Yu H, Xiao Y. *J. Org. Chem.*, 2012, 77: 669.
- [31] Zhang X, Wang C, Han Z, Xiao Y. *ACS. Appl. Mater. Interfaces*, 2014, 6: 21669.
- [32] Ulrich G, Goeb S, De Nicola A, Retailleau P, Ziessel R. *J. Org. Chem.*, 2011, 76: 4489.
- [33] Sarma T, Panda P K, Setsune J. *Chem. Commun.*, 2013, 49: 9806.
- [34] Zeng L, Jiao C, Huang X, Huang K, Chin W, Wu J. *Org. Lett.*, 2011, 13: 6026.
- [35] Zhao W, Carreira E M. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 1677.
- [36] Zhao W, Carreira E M. *Chem. Eur. J.*, 2006, 12: 7254.
- [37] Chen J, Burghart A, Derecskei-Kovacs A, Burgess K. *J. Org.*

- Chem. , 2000 , 65 : 2900.
- [38] Jiao L, Wu Y, Wang S, Hu X, Zhang P, Yu C, Cong K, Meng Q, Hao E, Vicente M. J. Org. Chem. , 2014 , 79 : 1830.
- [39] Gorman A, Killoran J, O'Shea C, Kenna T, Gallagher W M, O'Shea D F. J. Am. Chem. Soc. , 2004 , 126 : 10619.
- [40] Pastierik T, Šebej P, Medalová J, Štacko P, Klán P. J. Org. Chem. , 2014 , 79 : 3374.
- [41] Yang Y K, Cho H J, Lee J, Shin I, Tae J. Org. Lett. , 2009 , 11 : 859.
- [42] Beija M, Afonso C, Martinho J. Chem. Soc. Rev. , 2009 , 38 : 2410.
- [43] Liu J, Diwu Z, Leung W, Lu Y, Patch B, Haugland R P. Tetrahedron Lett. , 2003 , 44 : 4355.
- [44] Alessi A, Salvalaggio M, Ruzzon G. J. Lumin. , 2013 , 134 : 385.
- [45] Detty M R, Prasad P N, Donnelly D J, Ohulchanskyy T, Gibson S L, Hilf R. Bioorgan. Med. Chem. , 2004 , 12 : 2537.
- [46] Yuan L, Lin W, Chen H. Biomaterials, 2013 , 34 : 9566.
- [47] Sun Y, Liu J, Lv X, Liu Y, Zhao Y, Guo W. Angew. Chem. Int. Ed. , 2012 , 51 : 7634.
- [48] Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Terai T, Nagano T. ACS Chem. Biol. , 2011 , 6 : 600.
- [49] Yuan L, Lin W, Yang Y, Chen H. J. Am. Chem. Soc. , 2012 , 134 : 1200.
- [50] Fu M, Xiao Y, Qian X, Zhao D, Xu Y. Chem. Commun. , 2008 , 15 : 1780.
- [51] Koide Y, Urano Y, Hanaoka K, Piao W, Kusakabe M, Saito N, Terai T, Okabe T, Nagano T. J. Am. Chem. Soc. , 2012 , 134 : 5029.
- [52] Hu L, Yan Z, Xu H. RSC Adv. , 2013 , 3 : 7667.
- [53] Avirah R R, Jayaram D T, Adarsh N, Ramaiah D. Org. Biomol. Chem. , 2012 , 10 : 911.
- [54] Markova L I, Terpetschnig E A, Patsenker L D. Dyes Pigments, 2013 , 99 : 561.
- [55] Mayerhöffer U, Fimmel B, Würthner F. Angew. Chem. Int. Ed. , 2012 , 51 : 164.
- [56] Mayerhöffer U, Gsänger M, Stolte M, Fimmel B, Würthner F. Chem. Eur. J. , 2013 , 19 : 218.
- [57] Umezawa K, Citterio D, Suzuki K. Anal. Sci. , 2008 , 24 : 213.
- [58] Mori H, Tanaka T, Osuka A. J. Mater. Chem. C, 2013 , 1 : 2500.
- [59] Toganoh M, Kimura T, Furuta H. Chem. Eur. J. , 2008 , 14 : 10585.
- [60] Yoon M, Misra R, Yoon Z S, Kim K S, Lim J M, Chandrashekar T K, Kim D. J. Phys. Chem. B, 2008 , 112 : 6900.
- [61] Zhu S, Dorh N, Zhang J, Vegesna G, Li H, Luo F, Tiwari A, Liu H. J. Mater. Chem. , 2012 , 22 : 2781.
- [62] Schädlich A, Caysa H, Mueller T, Tenambergen F, Rose C, Göpferich A, Kuntsche J, Mäder K. ACS Nano, 2011 , 5 : 8710.
- [63] Cheng L, He W, Gong H, Wang C, Chen Q, Cheng Z, Liu Z. Adv. Funct. Mater. , 2013 , 23 : 5893.
- [64] Xu Y, Li Z, Malkovskiy A, Sun S, Pang Y. J. Phys. Chem. B, 2010 , 114 : 8574.
- [65] Gao F P, Lin Y X, Li L L, Liu Y, Mayerhoffer U, Spent P, Su J G, Li J Y, Wurthner F, Wang H. Biomaterials, 2014 , 35 : 1004.
- [66] Liu F, Deng D, Chen X, Qian Z, Achilefu S, Gu Y. Mol. Imaging Biol. , 2010 , 12 : 595.
- [67] Harada T, Sano K, Sato K, Watanabe R, Yu Z, Hanaoka H, Nakajima T, Choyke P L, Ptaszek M, Kobayashi H. Bioconjugate Chem. , 2014 , 25 : 362.
- [68] Alexander V M, Sano K, Yu Z, Nakajima T, Choyke P L, Ptaszek M, Kobayashi H. Bioconjugate Chem. , 2012 , 23 : 1671.
- [69] Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum L T, Choyke P L, Kobayashi H. Nat. Med. , 2011 , 17 : 1685.
- [70] Nakajima T, Mitsunaga M, Bander N H, Heston W, Choyke P L, Kobayashi H. Bioconjugate Chem. , 2011 , 22 : 1700.
- [71] Guo Z, Park S, Yoon J, Shin I. Chem. Soc. Rev. , 2014 , 43 : 16.
- [72] Yu F, Li P, Li G, Zhao G, Chu T, Han K. J. Am. Chem. Soc. , 2011 , 133 : 11030.
- [73] Cheng G, Fan J, Sun W, Cao J, Hu C, Peng X. Chem. Commun. , 2014 , 50 : 1018.
- [74] Wang T, Zhao Q, Hu H, Yu S, Liu X, Liu L, Wu Q. Chem. Commun. , 2012 , 48 : 8781.
- [75] Benniston A, Harriman A, Whittle V L, Zelzer M. Eur. J. Org. Chem. , 2010 , 3 : 523.
- [76] Yang Z, He Y, Lee J, Park N, Suh M, Chae W, Cao J, Peng X, Jung H, Kang C, Kim J S. J. Am. Chem. Soc. , 2013 , 135 : 9181.
- [77] Wang L, Xiao Y, Tian W, Deng L. J. Am. Chem. Soc. , 2013 , 135 : 2903.
- [78] Kuimova M K, Yahioglu G, Levitt J A, Suhling K. J. Am. Chem. Soc. , 2008 , 130 : 6672.
- [79] Koenig M, Bottari G, Brancato G, Barone V, Guldi D M, Torres T. Chem. Sci. , 2013 , 4 : 2502.
- [80] Ryu J H, Shin M, Kim S A, Lee S, Kim H, Koo H, Kim B S, Song H K, Kim S H, Choi K, Kwon I C, Jeon H, Kim K. Biomaterials, 2013 , 34 : 9149.
- [81] Cao W, Ng K K, Corbin I, Zhang Z, Ding L, Chen J, Zheng G. Bioconjugate Chem. , 2009 , 20 : 2023.
- [82] Kelderhouse L E, Chelvam V, Wayua C, Mahalingam S, Poh S, Kularatne S A, Low P S. Bioconjugate Chem. , 2013 , 24 : 1075.
- [83] Wu X, Sun X, Guo Z, Tang J, Shen Y, James T D, Tian H, Zhu W. J. Am. Chem. Soc. , 2014 , 136 : 3579.
- [84] Li S, Goins B, Zhang L, Bao A. Bioconjugate Chem. , 2012 , 23 : 1322.
- [85] Chen J, Guo Z, Wang H, Gong M, Kong X, Xia P, Chen Q. Biomaterials, 2013 , 34 : 571.
- [86] Ni D, Zhang J, Bu W, Xing H, Han F, Xiao Q, Yao Z, Chen F, He Q, Liu J, Zhang S, Fan W, Zhou L, Peng W, Shi J. ACS Nano, 2014 , 8 : 1231.