文章编号:1000-7032(2021)08-1307-07

单激发双发射近红外荧光碳量子点制备、 荧光性能与细胞成像

湛志华¹,陈茺而¹,莫大幸¹,谢木标¹, 薛茗月^{1,2}*,韩国成²,毛惠会²,钟菁青¹ (1. 岭南师范学院化学化工学院,广东湛江 524048; 2. 桂林电子科技大学生命与环境科学学院,广西桂林 541004)

摘要:探索合成方法简单的近红外比率荧光探针具有重要意义。本文以高山榕树叶为碳源,乙醇、丙酮为提取剂,采用溶剂热法于 200 ℃ 高压反应釜中反应 10 h,一步合成具有近红外双发射荧光特性的碳量子点 (CDs)。透射电镜(TEM)表明合成的 CDs 分散性好、平均尺寸约为 4.70 nm,晶格常数为 0.32 nm。X 射线衍射(XRD)结果显示该碳点在 2*θ* = 22°附近有一个较宽的衍射峰,表明该 CDs 为 sp² 杂化的无定形碳。傅里叶 红外光谱(FT-IR)显示其含有氨基、羰基、醇羟基和甲基。荧光光谱表明,最大激发波长 410 nm,最大发射波 长为 466 nm 和 676 nm。以硫酸奎宁做参比测得荧光量子产率为 26.31%。实验还探讨了 CDs 的酸碱、光学、 抗盐和金属离子的稳定性以及细胞成像效果。以上结果表明,该碳点具有原料廉价易得、制作简便、对酸碱 稳定、抗光漂白性良好等优点,具有良好的光学成像应用前景。

关 键 词:碳量子点;近红外荧光;细胞成像 中图分类号:0482.31 **文献标识码:**A **DOI**:10.37188/CJL.20210157

Preparation, Fluorescent Properties and Cell Imaging of Near Infrared Fluorescent Carbon Quantum Dots with Single Excited Double Emission

ZHAN Zhi-hua¹, CHEN Chong-er¹, MO Da-xing¹, XIE Mu-biao¹,

XUE Ming-yue^{1,2*}, HAN Guo-cheng², MAO Hui-hui², ZHONG Jing-qing¹

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China;

2. School of Life and Environmental Sciences, Guilin University of Electronic Technology, Guilin 541004, China)

* Corresponding Author, E-mail: xmy818@163.com

Abstract: It is of significance to explore the simple synthetic method and near-infrared ratio fluorescence probe. In this paper, carbon quantum dots(CDs) with near-infrared double-emission fluorescence properties were synthesized by solvothermal reaction in 200 °C high pressure reactor for 10 h using Ficus alba leaves as carbon source, ethanol and acetone as extraction agent. Transmission electron microscopy(TEM) showed that the average size of CDs is about 4.70 nm and the lattice

收稿日期: 2021-04-29;修订日期: 2021-05-15

基金项目: 国家自然科学基金(61861010,81873913);广东省教育厅项目(2019KTSCX091);广西自然科学基金(2018JJA120061); 岭南师范学院人才专项;稀土资源利用与发光材料研究创新团队(2017KCXTD022)资助项目 Supported by National Natural Science Foundation of China(61861010,81873913); Project of Education Department of Guang-

dong Province(2019KTSCX091); Natural Science Fund of Guangxi Province(2018JJA120061); Special Talent Program of Lingnan Normal University; Research Group of Rare Earth Resource Exploiting and Luminescent Materials(2017KCXTD022)

constant is 0.32 nm. X-ray diffraction(XRD) results showed there is a wide diffraction peak at near $2\theta = 22^{\circ}$. It showed the CDs was amorphous carbon sp² hybridized. Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) indicated the CDs had amino, carbonyl, alcohol hydroxyl, and methyl. Fluorescence spectra showed that the maximum excitation wavelength was 410 nm, and the maximum emission wavelength was 466 nm and 676 nm. Using quinine sulfate as a reference, the fluorescence quantum yield was 26.31%. The stability of acid-base, optical, salt resistance and metal ion resistance and the effect of cell imaging were also discussed. The above results show the CDs has the advantages of cheap raw materials, easy to produce, stable to acid and alkali, good photobleaching resistance and so on. It has good prospects for optical imaging applications.

Key words: carbon quantum dots(CDs); near-infrared fluorescence; cell imaging

1引言

碳量子点(CDs)是继富勒烯、碳纳米管、石墨 烯之后最受关注的碳基纳米材料。从 2004 年 Xu 等^[1]通过电弧放电的方法第一次得到这种具有 明亮荧光的纳米粒子到 2006 年 Sun 等^[2]以水蒸 气为载体激光烧蚀碳靶制得碳点、进行表面钝化 并首次提出碳量子点的概念以来, CDs 因其形貌 为小于 10 nm 的类球形结构、有大的 Stokes 位 移^[3]、低毒性、生物相容性好^[4]、制备简单、荧光 性能稳定及易于表面修饰^[5]等优点,被广泛应用 于生物传感^[6-7]、光学成像^[8-9]、药物载送^[10]、光催 化^[11-12]等领域。此外,碳点还具有光引发电子转 移的行为,其在光伏设备及光捕获材料上也有潜 在的应用价值^[13]。

自碳点被发现以来,制备方法就一直不断地 丰富且向着绿色环保、安全高效、操作简单等方向 发展,主要分为自上而下法(Top-down)和自下而 上法(Bottom-up)两类。自上而下法包括:激光烧 蚀法、电化学法、氧化石墨烯法、弧光放电法等,是 由宏观尺寸的碳经过加工变为纳米颗粒的方法, 产物大多为混合物,需要一定的分离提纯工序,合 成效率较低。自下而上法有:水热法、微波法、溶 剂热法、热解法、激光化学反应法等,是将有机碳 化合物分子合成为纳米粒子,制备工艺简单,有的 甚至能一步合成碳点,且实验设备要求低,适合大 规模制备,是目前采用比较多的一种制备 方法^[14]。

目前报道的荧光碳点发光主要集中在蓝绿 光^[9,14-15],与生物体自身荧光背景相近,不利于其 在细胞成像中应用。而红光和近红外光碳点的报 道较少,且前躯体的选择多为化学试剂,制备工艺 繁琐,荧光量子产率偏低^[16-18]。因此,探索绿色 天然物质制备 CDs 的工艺,制备出高荧光产率的 红光或近红外光碳点甚至更长波长的光,将有力 推进碳点在生物医学领域、水处理环境保护领域、 量子点敏化太阳能电池、光催化合成化学品等众 多研究领域的应用。单发射探针不可避免地受到 生物样品不均、仪器激发光波动、探针浓度不均一 等环境因素影响^[19],单激发双发射的比率荧光分 析方法能有效克服上述缺点。比率荧光传感器可 消除外界因素变化对测量信号强度的影响,例如 比率荧光探针浓度、光源不稳定和生物组织背景 荧光等;也可以消除假阳性信号,例如光漂白、细 胞膜厚度、探针在细胞内或者不同细胞之间的差 异造成的不均匀分布等引起的失真信号^[20-22]。

基于此,本文以绿色生物质高山榕树叶为碳 源,通过溶剂热法一步合成了单激发双发射近红 外比率型荧光 CDs。采用 TEM、XRD 和 FT-IR 等 手段对其粒径大小及分布、形貌、表面官能团等进 行了表征,并探讨了 CDs 耐酸碱、光学、抗盐以及 细胞成像效果。

2 实 验

2.1 碳量子点(CDs)合成

将洗净的新鲜高山榕树叶打碎,加入 50 mL 的无水乙醇和 50 mL 丙酮混合,浸泡提取 30 min 后,取上层清液 25 mL 放入聚四氟乙烯反应釜,于 电烘箱中 200 ℃加热 10 h。冷却至室温后10 000 r/min 离心 10 min,转移至透析袋中避光透析 2 h,得到合成的 CDs,用旋转蒸发仪蒸干,于4 ℃冰 箱保存,实验前用超纯水稀释。



- 图 1 CDs 的合成路线及应用
- Fig. 1 Schematic representation for the fabrication and application of CDs

2.2 实验仪器

FluoroMax-4型荧光光谱仪(Horiba, France) 用于荧光光谱测定;T9型紫外-可见分光光度计 (普析,北京)用于紫外-可见吸收光谱测定;Philips Tecnai G2 F20 S-TWIN 场发射透射电子显微 镜(Transmission electron microscope, TEM, PhilipS, Netherlands)用于 CDs 粒径的测定;Nicolet 6700 傅里叶变换红外光谱仪(Thermo Fisher Scientific, USA)用于 CDs 表面基团表征;X'pert Pro MPD X 射线衍射仪(PANalytical, Netherlands)用于 CDs 形貌表征;Zeiss LSM710 共聚焦激光扫描显微镜 系统(CLSM, Zeiss, Germany)用于细胞成像的测 定。除细胞毒性实验外,其他实验 CDs 的浓度均 为100 μg/mL。所有实验均在室温下完成。

3 结果与讨论

3.1 CDs 的表征

从 CDs 的透射电镜(TEM)图(图 2)可以看 出,合成的 CDs 分散性好、粒径较小、比较均匀 (2.0~8.0 nm),几乎 90% 的 CDs 的粒径集中在 3.0~6.0 nm 之间(图 2(c))。平均尺寸约为 4.70 nm,粒径小,有利于 CDs 进入细胞。图 2(b) 为 CDs 的高分辨透射电镜图,晶格常数为 0.32 nm,与石墨烯的(002)面一致。

为得到合成 CDs 的晶面常数,进行 XRD 表 征得到图 3, CDs 在 $2\theta = 22^{\circ}$ 处有一个较宽的衍 射峰,表明得到的碳点中心为 sp² 杂化的无定 型碳。

通过傅里叶红外光谱仪对碳点表面基团进行 检测,结果如图4。3 457 cm⁻¹处的宽峰表示样品



- 图 2 CDs 的 TEM 图像(a)、高分辨 TEM 图像(b)及粒径 分布图(c)。
- Fig. 2 TEM image(a), high resolution TEM image(b) and particle size distribution of CDs(c).

中含水的氢键对碳点中的醇羟基产生的影响; 2900 cm⁻¹处的3个峰为饱和 C—H 键的特征峰, 1462 cm⁻¹的特征吸收表明该 C—H 键为面内不 对称变形振动;由于1639 cm⁻¹处的 C == 0 特征 峰发生了较大的位移,结合3457 cm⁻¹处的宽峰 内或许也包含氨基,推断1639 cm⁻¹处的 C == 0 上连接了—NH₂,因孤对电子的共轭作用使 C == 0键的力常数减小,振动频率向低波数位移;1384 cm⁻¹的特征吸收为—NO₂的对称伸缩振动。



3.2 CDs 的光学性质

如图 5 所示,所得的 CDs 在紫外和可见光区 均有明显的吸收,且在 360 nm 激发波长下发出红 色荧光。从荧光光谱可以看到该 CDs 的最大激 发波长为 410 nm,最大发射波长为 466 nm 和 676 nm,表示合成的碳点具有单激发双发射近红外荧 光特性,可构建比率型荧光探针。

以硫酸奎宁作为参比,在 360 nm 激发波长下,按照公式

$$\varphi_x = \varphi_s \times \frac{F_x}{F_s} \times \frac{A_s}{A_s}, \qquad (1)$$

计算得到该 CDs 荧光量子产率为 26.31%。其中 φ_x 和 φ_s 分别表示待测物质和参比物质的荧光量 子产率, F_x 和 F_s 分别表示待测物质和参比物质的



图 5 CDs 的紫外吸收光谱和激发、发射荧光光谱。

Fig. 5 Fluorescence spectra and UV-Vis absorption spectra of the obtained CDs. Emission spectrum was recorded at an excitation wavelength of 410 nm and excitation spectrum was recorded at emission wavelength of 466, 676 nm. Inset in: a photograph of the obtained CDs solution under the irradiation of natural light (left) and 365 nm UV light(right).



图 6 不同激发波长下 CDs 的荧光发射光谱



积分荧光强度, A_x和 A_x分别表示待测物质和参比物质对该波长激发光的吸收强度。

图 6 为不同激发波长下 CDs 的发射光谱,由 图中可知,随着激发波长从 360 nm 增加到 410 nm,466 nm 处的最大发射峰稍有红移,具有激发 依赖性;676 nm 处的发射峰位置不变,荧光强度 逐渐增加。从 3D 图(图7)也可明显看出,随着激 发波长增加,676 nm 处的发射峰荧光强度逐渐 增大。



图 7 不同激发、发射波长下 CDs 的 3D 荧光光谱图。

Fig. 7 3D fluorescence spectra of CDs at different excitation and emission wavelengths

3.3 CDs 的稳定性

3.3.1 pH 的影响

CDs 的荧光强度一定程度上受溶液酸碱度影 响,可通过调节 pH 值来确定 *I*466/*I*676 对溶液酸碱 度的敏感程度,由图 8 可知 pH 的变化对 CDs 的 荧光强度影响不大。CDs 的 pH 效应可能是由于 碳点上同时存在—COOH 和酰胺,中性和酸性条 件下分子间有氢键缔合作用,碳点聚集导致荧光 猝灭^[23]。在 pH = 11 时,由于羧基发生去质子化 反应带上负电荷,使碳点间保持单分散而荧光强 度增大。





3.3.2 抗光漂白性

410 nm 紫外灯照射不同的时间测定 CDs 的 发射荧光强度如图 9 所示,从图中可以看出 CDs 在 466 nm 处的发射峰荧光强度基本不发生变化, 而在 676 nm 处荧光强度稍有降低,可能原因是酰 胺受热易发生水解。将 4 ℃保存的该 CDs 每隔 15 d 测其荧光强度,如图 10 所示。同时,在 37 ℃



图 9 410 nm 紫外灯照射时间对 CDs 荧光强度的影响

Fig. 9 Effect of illumination time under 410 nm UV light on the fluorescence intensity



图 10 不同存储时间对 CDs 荧光强度的影响(4 ℃)





图 11 不同存储时间对 CDs 荧光强度的影响(37 ℃)



下保存,每隔1d测其荧光强度,如图11所示。 荧光强度均基本保持不变,表明CDs具有良好的 抗光漂白性、优秀的光学稳定性,这些性质均有利 于CDs在细胞成像、靶向示踪等生化分析方面的 应用。

3.3.3 CDs 的抗盐性

为考察 CDs 受共存分子和离子的干扰情况, 在 pH =4 的条件下分别加入不同浓度的 NaCl、 KCl 测定 466 nm 和 676 nm 处的荧光值。实验结 果表明, I_{466}/I_{676} (如图 12(a)、(b))几乎不发生 改变,有利于碳点在生物传感、细胞成像方面的 应用。



- 图 12 不同浓度的 KCl/NaCl 对 CDs 荧光强度的影响 (NaCl 浓度分别为 0,0.25,0.5,0.75,1.25,2,2.5 mol/L;KCl 浓度分别为 0,0.25,0.5,0.75,1, 1.25,1.5 mol/L)
- Fig. 12 Effect of NaCl and KCl concentrations on the fluorescence intensity (NaCl: 0, 0. 25, 0. 5, 0. 75, 1.25, 2, 2.5 mol/L; KCl: 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5 mol/L)

3.4 细胞毒性与活细胞荧光成像

为了探讨 CDs 的生物应用,本文进行了细胞 毒性实验,利用 T24 细胞株,通过 CCK-8 分析法 测定了 CDs 的细胞毒性。如图 13 所示,该碳纳米



图 13 T24 细胞与不同浓度 CDs 孵育 24 h 后的相对细胞 活性

Fig. 13 Cell viability of T24 cells in the presence of diffferent concentrations of CDs for 24 h



- 图 14 CDs 和 T24 细胞共同孵育 10 h 后的 CLSM 成像 图。(a)蓝光通道;(b)明场;(c)红光通道;(d)叠 加图。
- Fig. 14 Intracellular fluorescence with CLSM of T24 cells. (a)
 Fluorescent image of CDs for the blue channel. (b)
 Bright field. (c) Fluorescent image of CDs for the red channel. (d) Merged images of (a), (b) and (c).

材料的浓度从 100 μg/mL 增加到 500 μg/mL 时,细胞的存活率从 99%降低到 92%,在很宽的 浓度范围内细胞毒性均保持在 90% 以上,证明 该 CDs 的细胞毒性很低并且具有良好的生物相 容性,说明在活细胞成像领域具有巨大的应用 潜力。这些也表明制备的 CDs 可以安全地应用 于细胞实验。

采用激光共聚焦显微成像技术,比率荧光检测活细胞成像,在405 nm 激发波长下,可以在蓝 光通道中看到细胞膜、细胞质中发出蓝色荧光,在 红光通道中看到细胞膜、细胞质中有红色荧光 (图 14),表明该 CDs 生物相容性好,对细胞、组 织穿透能力强,可有效避免生物体内的背景干扰。

4 结 论

本文以绿色高山榕树叶为原料,通过溶剂热 法一步合成单激发双发射的近红外碳基荧光纳米 传感器。其优势在于:(1)以天然生物质为原料, 绿色环保、原料廉价易得、生物毒性低;(2)合成 纯化步骤简单;(3)荧光量子产率高、发出近红外 荧光;(4)该碳点具有良好的水溶性、抗盐、抗光 漂白性;(5)生物相容性好,能有效避免生物体内 背景干扰。以上结果表明,所得 CDs 作为环境友 好材料在生物传感、光学成像等领域具有广泛的 应用前景。

本文专家审稿意见及作者回复内容的下载地址: http://cjl.lightpublishing.cn/thesisDetails#10.37188/ CJL.20210157.

参考文献:

- XUXY, RAYR, GUYL, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments
 J. J. Am. Chem. Soc., 2004, 126(40):12736-12737.
- [2] SUN Y P,ZHOU B, LIN Y, et al. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence [J]. J. Am. Chem. Soc., 2006,128(24):7756-7757.
- [3]张川洲,谭辉,毛燕,等.发光碳量子点的合成、性质和应用[J].应用化学,2013,30(4):367-372.
 ZHANG C Z, TAN H, MAO Y, et al. Synthesis and properties of luminescent carbon dots and its applications [J]. Chin.
 J. Appl. Chem., 2013,30(4):367-372. (in Chinese)
- [4] SONG Y C, FENG D, SHI W, et al. Parallel comparative studies on the toxic effects of unmodified cdte quantum dots, gold nanoparticles, and carbon nanodots on live cells as well as green gram sprouts [J]. Talanta, 2013, 116:237-244.
- [5] MOMPER R, STEINBRECHER J, DORN M, et al. Enhanced photoluminescence properties of a carbon dot system through surface interaction with polymeric nanoparticles [J]. J. Colloid Interface Sci., 2018,518:11-20.
- [6] DA SILVA J C G E, GONÇALVES H M R. Analytical and bioanalytical applications of carbon dots [J]. TrACTrends

Anal. Chem., 2011,30(8):1327-1336.

- [7] GONÇALVES H M R, DUARTE A J, DA SILVA J C G E. Optical fiber sensor for Hg(II) based on carbon dots [J]. Biosens. Bioelectron., 2010,26(4):1302-1306.
- [8] LIU C J, ZHANG P, ZHAI X Y, et al. Nano-carrier for gene delivery and bioimaging based on carbon dots with PEI-passivation enhanced fluorescence [J]. Biomaterials, 2012,33(13):3604-3611.
- [9] BAJPAIS K, D' SOUZA A, SUHAIL B. Carbon dots from guar gum: synthesis, characterization and preliminary in vivo application in plant cells [J]. Mater. Sci. Eng. : B, 2019, 241:92-99.
- [10] FENG T, AI X Z, AN G H, et al. Correction to charge-convertible carbon dots for imaging-guided drug delivery with enhanced in vivo cancer therapeutic efficiency [J]. ACS Nano, 2016,10(5):5587-5587.
- [11] CHANG Q, HAN X J, XUE C R, et al. Cu_{1.8}S-passivated carbon dots for enhancing photocatalytic activity [J]. Chem. Commun., 2017,53(15):2343-2346.
- [12] JIANG K, ZHANG L, LU J F, et al. Triple-mode emission of carbon dots: applications for advanced anti-counterfeiting [J]. Angew. Chem. Int. Ed., 2016,55(25):7231-7235.
- [13] 高宁萧,徐玉龙,刘勇. 豆奶粉提取碳点及含碳点荧光纳米纤维的制备 [J]. 高等学校化学学报, 2019,40(3):555-559.

GAO N X, XU Y L, LIU Y. Preparation of carbon dots from soy milk powder and fluorescent nanofibers containing carbon dots [J]. *Chem. J. Chin. Univ.*, 2019,40(3):555-559. (in Chinese)

- [14] 王胜达,袁楠,朱志峰,等. 荧光碳点的合成、性质和应用 [J]. 影像科学与光化学, 2016,34(3):203-218.
 WANG S D, YUAN N, ZHU Z F, et al. Synthesis, properties and applications of the fluorescent carbon dots [J]. Imaging Sci. Photochem., 2016,34(3):203-218. (in Chinese)
- [15] YANG Z C, WANG M, YONG A M, et al. Intrinsically fluorescent carbon dots with tunable emission derived from hydrothermal treatment of glucose in the presence of monopotassium phosphate [J]. Chem. Commun., 2011, 47 (42): 11615-11617.
- [16] LIU Y L, AI K L, LIU J H, et al. Dopamine-melanin colloidal nanospheres: an efficient near-infrared photothermal therapeutic agent for in vivo cancer therapy [J]. Adv. Mater., 2013,25(9):1353-1359.
- [17] JIANG B P,ZHOU B,SHEN X C, et al. Selective probing of gaseous ammonia using red-emitting carbon dots based on an interfacial response mechanism [J]. Chem. Eur. J., 2015,21(52):18993-18999.
- [18] AMJADI M, HALLAJ T, ASADOLLAHI H, et al. Facile synthesis of carbon quantum dot/silver nanocomposite and its application for colorimetric detection of methimazole [J]. Sens. Actuators B: Chem., 2017,244:425-432.
- [19] KERMIS H R, KOSTOV Y, HARMS P, et al. Dual excitation ratiometric fluorescent pH sensor for noninvasive bioprocess monitoring: development and application [J]. Biotechnol. Prog., 2002, 18(5):1047-1053.
- [20] ROYZENM, DAI Z H, CANARY J W. Ratiometric displacement approach to Cu (II) sensing by fluorescence [J]. J. Am. Chem. Soc., 2005, 127(6):1612-1613.
- [21] ZHOU X F, SU F Y, LU H G, et al. An FRET-based ratiometric chemosensor for *in vitro* cellular fluorescence analyses of pH [J]. *Biomaterials*, 2012,33(1):171-180.
- [22] LI G,ZHU D J, XUE L, et al. Quinoline-based fluorescent probe for ratiometric detection of lysosomal pH [J]. Org. Lett., 2013,15(19):5020-5023.
- [23] WANG Q L, ZHENG H Z, LONG Y J, et al. Microwave-hydrothermal synthesis of fluorescent carbon dots from graphite oxide [J]. Carbon, 2011,49(9):3134-3140.



湛志华(1980 -),男,湖北监利人, 博士,2011年于中南大学获得博士
学位,主要从事生物传感及天然产
物提取与利用方面的研究。
E-mail: 517537695@qq.com



薛茗月(1979 -),女,湖北钟祥人,博 士,教授,硕士研究生导师,2016 年于 广西师范大学获得博士学位,主要从 事纳米材料及生物传感方面的研究。 E-mail: xmy818@163.com