



超声法一步合成生物相容的黄绿色荧光碳点

刘慧^{①②}, 杨晓溪^②, 郑佳佳^①, 李原芳^①, 黄承志^{①②*}

① 发光与实时分析教育部重点实验室; 西南大学化学化工学院, 重庆 400715

② 西南大学药学院, 重庆 400715

*通讯作者, E-mail: chengzhi@swu.edu.cn

收稿日期: 2012-10-09; 接受日期: 2012-11-27; 网络版发表日期: 2013-02-28

doi: 10.1360/032012-460

摘要 本文以蜡烛灰为碳源, 在强酸环境中超声法一步合成了粒径均匀的荧光碳点(CDs), 粒径(3.47 ± 1.81) nm, 在紫外灯照射下发出黄绿色荧光. 研究表明, CDs 表面带有-OH、C=O 和-COOH 等官能团, 存在 sp^3 杂化和 sp^2 杂化两种碳原子. 所合成的碳点具有良好的耐光漂白能力和生物相容性, 能潜在地作为黄绿色荧光成像试剂应用于细胞成像.

关键词
荧光碳点
超声法
细胞成像

1 引言

相对于二维的石墨烯和一维的碳纳米管, 新型碳材料——零维的碳点^[1]不仅具有尺寸优势(<10 nm)、强的量子局限和边缘效应^[2~4], 而且具有类似于量子点优良的发光性能^[5, 6], 因此引起研究者的日渐关注^[7]. 同时, 碳点的化学惰性、耐光漂白性和良好的生物相容性^[5, 6, 8, 9]使其在生化分析^[10]、细胞成像^[1, 5, 6, 8, 11~13]、光电动力学^[14, 15]等诸多领域可以得到潜在的应用.

然而, 目前碳点的发展和应用依然处于初期探索阶段. 研究的内容主要集中在碳点的制备, 期望通过简单快速的方法合成具有优良发光性能的碳点^[1~4, 8, 9, 16~19]. 2006年, Sun等^[1]基于激光消融碳靶物的多步处理方法, 得到发光性能较好的荧光碳纳米粒子, 并首次称其为碳点(carbon dots, CDs). 之后, 人们通过水热氧化碳源法^[2, 8, 20~22]、激光消融法^[1, 5, 6, 23]、电化学氧化法^[9, 24]、微波法^[3, 25]、高温煅烧法^[19]、超声合成法^[26]等制备出具有优良发光性能的碳点. 尽管碳点的制备已经取得积极进展, 包括应用各种经济、绿色、环保的物质合成荧光碳点^[16~18], 但大部分合成方法依然操作复杂, 且所合成碳点大多是蓝

色^[16~18, 26]光致发光特性. 而由于细胞具有较强的自发蓝色荧光, 因此将这些碳点用于细胞成像时不利于靶信号与背景信号的区分, 背景干扰较大. 综上所述, 非常有必要发展简便合成其他颜色的碳点, 特别是具有较长波长发光特性的碳点的方法, 这样在生物成像时能够降低背景干扰, 且减小激光对生物体的损伤.

本文以蜡烛灰为碳源, 在强酸环境中通过超声法一步合成黄绿色荧光碳点. 合成方法简单, 原料便宜易得, 所制备的碳点具有良好的稳定性、抗光漂白能力和生物相容性, 能作为潜在的荧光标记探针进行细胞成像.

2 实验部分

2.1 试剂及标准溶液

蜡烛购于西南大学教育超市; 硫酸(H_2SO_4 , 98%)、硝酸(HNO_3 , 37%)、丙三醇、氢氧化钠(NaOH)均购于重庆川东化学试剂厂; cell counting kit-8(CCK-8)细胞毒性检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 多聚甲醛购于北京鼎国昌盛生物技术有限公司; MEM 培养基、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶均购于美国

Gibco 公司. Britton-Robinson 缓冲溶液用于调节碳点溶液的酸度; 5 mol/L NaCl 储备液用于调节溶液的离子强度; 4.5 mg/mL 碳点储备液存于 4 °C 冰箱中. 所有化学试剂均为分析纯, 实验用水为超纯水.

2.2 仪器

使用 UV-3600 紫外-可见分光光度计(日立公司, 日本)、F-2500 荧光分光光度计(日立公司, 日本)和 IR Prestige-21 傅里叶变换红外光谱仪(岛津公司, 日本)进行相关的光谱表征; 使用 ESCALAB250 型 X 射线光电子能谱仪(美国热电公司, 美国)、LabRAM HR 高分辨显微拉曼光谱仪(HORIBA Jobin Yvon 公司, 法国)、Tecnai G2 F20 S-TWIN 场发射透射电子显微镜(TEM, FEI 公司, 美国)进行碳点的相关性质表征; 成像分析使用 IX81LCS-DSU 奥林巴斯转盘共聚焦显微镜(奥林巴斯, 日本), 荧光成像时使用 Cy-3 通道发射滤光片, 曝光时间 100 ms. 实验过程中还使用了 H1650-W 台式微量高速离心机(湘仪离心机仪器有限公司, 中国)、CoolSafe 型冷冻干燥机(ScanVac, 丹麦)、超声波清洗机(上海比昂仪器有限公司, 中国)、E-450 数码相机(尼康公司, 日本)、QL-901 旋涡混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 中国)、pH 510 型酸度计(EUTECH 仪器公司, 新加坡)和 EPOCH 超微量全波长酶标仪(Biotek Instruments, 美国)等仪器设备.

2.3 碳点的制备及纯化

使用洁净的玻片在烛焰上方收集蜡烛灰, 然后刮取约 20 mg 蜡烛灰与 20 mL 混酸(浓 H_2SO_4 :浓 $\text{HNO}_3 = 3:1$)于 50 mL 比色管中混匀, 得到黑色悬浊液. 将其置于超声仪中, 60 °C 下超声 8 h, 放置过夜. 接下来, 将反应所得粗溶液离心除去大颗粒的未反应物, 收集上清液, 用饱和 NaOH 溶液调节 pH 至中性, 再用 0.22 μm 滤膜过滤, 得到黄褐色溶液. 将溶液用透析袋(MWCO 3500)于二次水中透析 48 h 除去钠盐. 透析后的溶液冻干, 称重并溶于二次水中, 即得一定质量浓度的碳点溶液.

2.4 细胞毒性及成像实验

使用 cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒检测细胞毒性. 实验中, 首先用胰酶消化 HeLa 细胞, 将其与 MEM 培养液配成一定浓度的细胞悬液, 接种于 96 孔细胞培养板, 置于细胞培养箱(37 °C, 5% CO_2)中孵

育 24 h. 然后将细胞培养板中培养液吸出, PBS 洗涤一次, 加入新鲜 MEM 培养液, 其中空白组每孔 90 μL 培养液和 10 μL PBS 缓冲液. 实验组每孔 90 μL 培养液和 10 μL 样品(不同浓度的碳点溶液), 继续培养 24 h (37 °C, 5% CO_2). 取以上所得细胞培养板, 吸出培养液, PBS 洗涤两次, 然后每孔加入 90 μL 的 PBS 和 10 μL 的 CCK-8 溶液, 继续孵育 1 h. 最后, 在酶标仪上测定细胞溶液在波长 450 nm 处的吸光度, 记录并处理实验结果.

荧光共聚焦显微镜用于细胞成像时, 将 HeLa 细胞接种于 24 孔细胞培养板, 加入含有 2% 胎牛血清(FBS)的 MEM 培养液, 孵育 24 h(37 °C, 5% CO_2). 然后吸出细胞培养板中培养液, PBS 洗涤一次, 再加 270 μL MEM 培养液(含 2% FBS), 30 μL 样品(0.5 mg/mL 碳点溶液), 继续孵育 3 h. 最后, 将以上所得细胞培养板弃去培养液, PBS 洗涤三次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 丙三醇封片, 进行成像.

3 结果与讨论

3.1 碳点的表征

通过 TEM 对碳点的形态进行表征. 如图 1 所示, 所合成的碳点为球形和类球形, 粒径相对比较均匀, 平均粒径约 3.5 nm. 该碳点极易溶于水, 其溶液单分散性非常好, 在紫外灯(λ_{ex} , 365 nm)光照下发射出肉

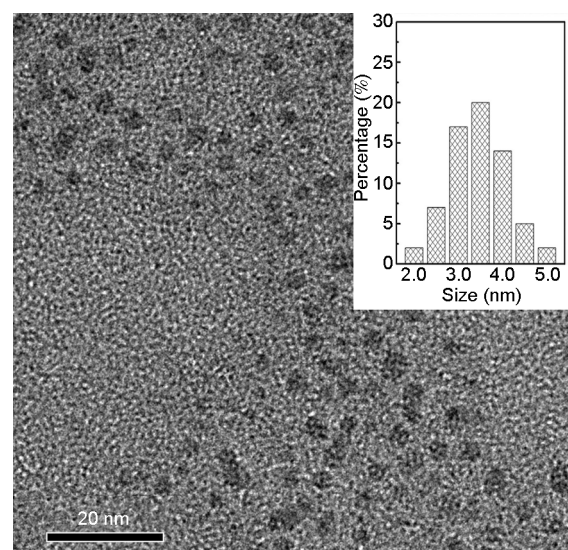


图 1 碳点的透射电镜照片; 内嵌图为粒径分布图(共统计 80 个颗粒粒径, $d = (3.47 \pm 1.81) \text{ nm}$)

眼可见的黄绿色荧光, 显示出优良的光致发光特性. 为了进一步探索该碳点的发光性质, 分别对其进行进行了吸收和荧光光谱扫描. 如图 2(a)所示, 碳点在紫外-可见区没有特征吸收峰, 这与间接半导体材料的吸收性质一致; 其荧光发射光谱随着激发波长增加而逐渐红移, 呈现出多元激发、多元发射的光谱特性, 这些特性与文献报道相符^[7], 可能是由于 CDs 表面发光位点不同, 以及制备过程中不均匀纳米粒径的量子尺寸效应等所造成的^[1, 27].

为了进一步表征碳点的性质, 测定了其红外光谱、X 射线光电子能谱(XPS)和拉曼光谱. 图 3(a)出现了位于 3425 cm^{-1} 的羟基($-\text{OH}$)伸缩振动吸收峰、饱和 $\text{C}-\text{H}$ 伸缩振动峰(2924 cm^{-1} 和 2858 cm^{-1})、羰基($\text{C}=\text{O}$)伸缩振动吸收峰(1708 cm^{-1})、碳碳双键($\text{C}=\text{C}$)伸缩振动吸收峰(1608 cm^{-1} 及 1400 cm^{-1}). 特别需要指出的是, 结合 1708 cm^{-1} 处 $\text{C}=\text{O}$ 的吸收峰, 3425 cm^{-1} 处 $-\text{OH}$ 较宽的吸收峰形, 说明是羧酸($-\text{COOH}$)上的 $-\text{OH}$ 发生了弯曲振动. 也就是说, CDs 表面部分氧化成 $-\text{OH}$, $\text{C}=\text{O}$ 以及 $-\text{COOH}$. XPS 测试结果显示, 碳点主要含有碳元素和氧元素(图 3(b)), 而在 $\text{C } 1s$ 谱图(见图 3(c))中有 285.08 , 286.68 , 287.98 , 289.28 eV 四种信号峰, 分别对应碳碳单键和双键($\text{C}-\text{C}/\text{C}=\text{C}$), 烷氧基和环氧基或羟基碳($\text{C}-\text{O}/\text{C}-\text{O}-\text{C}/\text{C}-\text{OH}$), 羰基($\text{C}=\text{O}$)和羧基(COOH). 拉曼光谱(图 3(d))显示, 分别在 1358 cm^{-1} 和 1580 cm^{-1} 处出现两个较强的 D 峰和 G 峰, 表明存在 sp^3 杂化碳原子和 sp^2 杂化碳原子, 此结果与红外和 XPS 数据相符. 以上数据表明, 蜡烛灰前体在强氧化性混酸的腐蚀下, 得到表面部分功能化的荧光碳点.

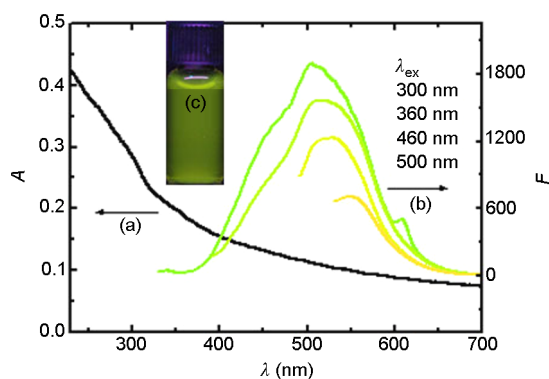


图 2 (a) 碳点水溶液的紫外-可见吸收光谱; (b) 不同激发波长下归一化的荧光发射光谱; (c) 碳点水溶液荧光照片, λ_{ex} , 365 nm

3.2 碳点稳定性考察

首先, 考察了不同 pH 对碳点荧光强度的影响. 当溶液 $\text{pH} \leq 7.0$ 时, 碳点的荧光强度随着溶液 pH 增大而线性增强, 线性增强方程为 $F = 119.4\text{ pH} + 351.9$ ($n = 6$, $r = 0.99$); 而在 $\text{pH} > 7.0$ 的碱性条件下, 碳点的荧光强度基本趋于稳定, 如图 4 所示. 这可能是由于在酸性条件下, 碳点表面的功能基团 $-\text{OH}$ 和 $-\text{COOH}$ 易发生氢键缔合作用, 碳点聚集从而导致荧光猝灭^[28]; 在碱性条件下, 则因为去质子作用, 使羟基和羧基带上负电荷, 从而使碳点间因为静电排斥作用保持单分散, 其荧光较强. 需要说明的是, 在酸性条件下荧光强度随 pH 增大线性增加, 表明去质子化可能只发生在一种官能团上, 要么是 $-\text{OH}$ 、要么是 $-\text{COOH}$.

此外, 该碳点具有优良的光稳定性及抗盐能力, 与文献相符^[7]. 研究表明, 当碳点溶液中的氯化钠浓度低于 1.8 mol/L 时, 碳点的荧光强度基本保持不变, 说明该碳点具有很强的抗盐能力, 为碳点在生物方面的应用提供了保障. 碳点溶液在 300 nm 激发光条件下连续照射 30 min , 其荧光强度基本没有变化, 说明所合成碳点非常稳定, 几乎没有光漂白现象.

3.3 碳点发光机理探讨

有关碳点的发光机理还不清楚, 目前仍处于推测阶段. 该反应体系中, 碳点的制备是由蜡烛灰前体在强氧化性混酸的环境下, 通过超声过程所完成的. 其中混酸不仅将蜡烛灰前体腐蚀为极小粒径的碳纳米粒子, 同时还扮演了强氧化剂的重要角色. 众所周知, 溶液在超声的过程中由于产生交替的高压波和低压波, 形成微小的气泡, 这些小气泡在超声场的作用下振动、生长并不断聚集声场能量, 当能量达到某个阈值时, 空化气泡急剧崩溃闭合, 这种“超声空化”现象直接导致液体流的高速碰撞和强的流体剪力. 因此, 在超声条件下, 空化现象的产生导致混酸与蜡烛灰发生强烈碰撞, 将其腐蚀并分裂为微小的碳纳米粒子^[26]. 所形成的碳纳米粒子表面具有很多缺陷能带, 当用激发光照射时, 由于其电子和空穴被量子限域(粒径在 $1 \sim 10\text{ nm}$), 连续的能带结构变成具有分子特性的分立能级结构, 受激后激子会发生辐射重组而发射荧光^[1].

3.4 碳点的生物应用

为了考察该碳点的生物相容性, 本研究通过

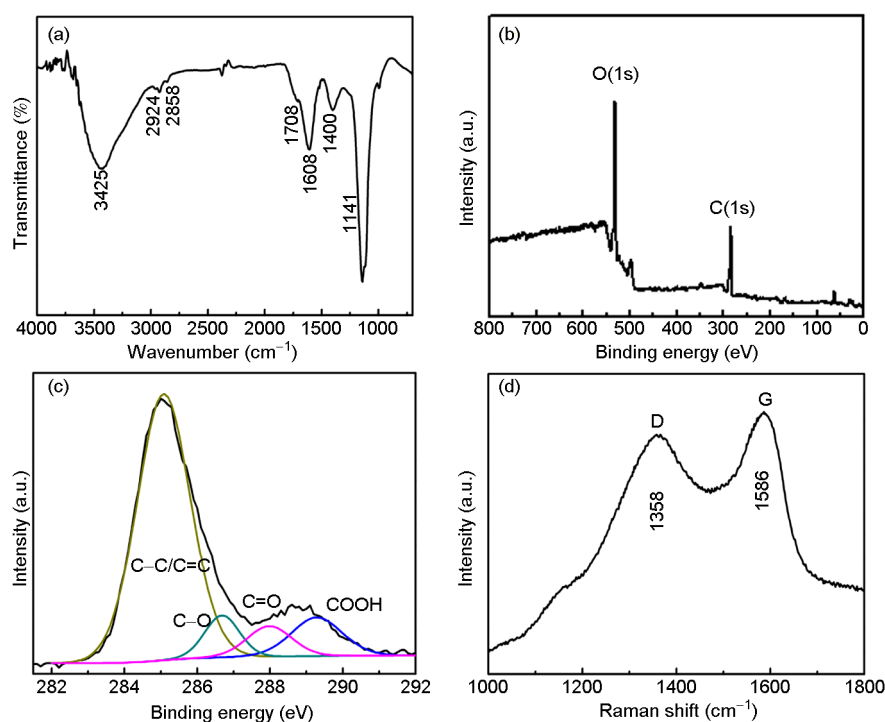


图3 (a) 碳点的红外吸收光谱; (b) 碳点固体样品的 XPS 能谱; (c) C 1s 电子结合能谱; (d) 碳点的拉曼光谱

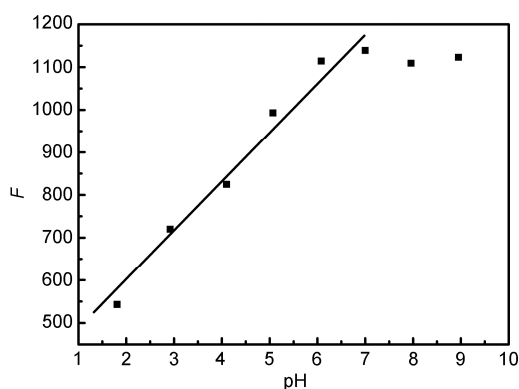


图4 不同 pH 下碳点的荧光发射(λ_{ex} , 300 nm). BR 作为缓冲溶液

CCK-8 实验法对所合成的碳点进行了细胞毒性评价, 结果如图 5(a)所示. 当碳点浓度低于 3 mg/mL 时, 细胞存活率均在 80%以上, 表明该碳点具有较低的细胞毒性. 除了具有优异的光稳定性、强的抗盐能力和良好的生物相容性外, 该碳点具有黄绿色光致发光的性质, 这与细胞本身所具有的蓝色自发荧光有显著对比, 将更有利于细胞成像中靶信号与背景信号的区分. 基于此, 本研究将该碳点进一步用于细胞成像. 实验发现, HeLa 细胞具有微弱的背景荧光(图

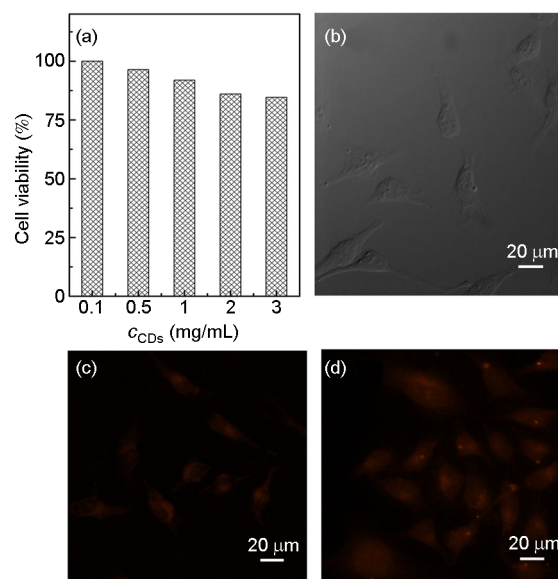


图5 细胞毒性及成像实验. (a) 碳点对 HeLa 细胞的活性影响; (b) HeLa 细胞明场图; (c) 空白对照 HeLa 细胞荧光成像; (d) 碳点与 HeLa 细胞孵育 3 h 后的荧光成像(c_{CDs} 为 0.50 mg/mL)

5(c)), 而将碳点与 HeLa 细胞共同孵育 3 h 后, 能够观察到较强的荧光信号(图 5(d)). 因为其荧光量子产率较低(以硫酸奎宁为参照约为 0.6%), 所以成像效果仍

然需要通过碳点表面功能化增强其荧光量子产率而得以改善,使得该碳点可作为一种优良成像试剂应用于细胞成像.

4 结论

本文以蜡烛灰为碳源,在强烈的混酸环境中超声

法一步合成荧光碳点;合成方法简单,所需原料经济.合成的碳点具有较好的黄绿色光致发光特性、耐光漂白性、低毒和良好的生物相容性,可以作为一种潜在的优良成像试剂用于细胞成像.由于表面没有特定的钝化试剂,该碳点荧光量子产率不乐观;期待引入特异的功能基团,钝化碳点表面,制备出荧光性能更好的碳点;进一步研究工作正在进行中.

致谢 本工作得到国家自然科学基金重点项目(21035005)和中央高校基本科研业务费专项资金(XDJK2010C066)资助,特此一并致谢.

参考文献

- 1 Sun YP, Zhou B, Lin Y, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen BL, Veca LM, Xie SY. Quantum-sized carbon dots for bright and colorful photoluminescence. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7756–7757
- 2 Tian L, Ghosh D, Chen W, Pradhan S, Chang XJ, Chen SW. Nanosized carbon particles from natural gas soot. *Chem Mater*, 2009, 21: 2803–2809
- 3 Peng H, Travas-Sejdic J. Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates. *Chem Mater*, 2009, 21: 5563–5565
- 4 Shen JH, Zhu YH, Chen C, Yang XL, Li CZ. Facile preparation and upconversion luminescence of graphene quantum dots. *Chem Commun*, 2011, 47: 2580–2582
- 5 Yang ST, Wang X, Wang HF, Lu FS, Luo PG, Cao L, Meziani MJ, Liu JH, Liu YF, Chen M, Huang YP, Sun YP. Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 18110–18114
- 6 Yang ST, Cao L, Luo PG, Lu FS, Wang X, Wang HF, Meziani MJ, Liu YF, Qi G, Sun YP. Carbon dots for optical imaging in vivo. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 11308–11309
- 7 Baker SN, Baker GA. Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. *Angew Chem Int Ed*, 2010, 49: 6726–6744
- 8 Ray SC, Saha A, Jana NR, Sarkar R. Fluorescent carbon nanoparticles: Synthesis, characterization, and bioimaging application. *J Phys Chem C*, 2009, 113: 18546–18551
- 9 Zhao QL, Zhang ZL, Huang BH, Peng J, Zhang M, Pang DW. Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chem Commun*, 2008, 5116–5118
- 10 Zhao HX, Liu LQ, Liu ZD, Wang Y, Zhao XJ, Huang CZ. Highly selective detection of phosphate in very complicated matrixes with an off-on fluorescent probe of europium-adjusted carbon dots. *Chem Commun*, 2011, (47): 2604–2606
- 11 Cao L, Wang X, Meziani MJ, Lu FS, Wang HF, Luo PG, Lin Y, Harruff BA, Veca LM, Murray D, Xie SY, Sun YP. Carbon dots for multiphoton bioimaging. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 11318–11319
- 12 Li Q, Ohulchanskyy TY, Liu RL, Koynov K, Wu DQ, Best A, Kumar R, Bonoiu A, Prasad PN. Photoluminescent carbon dots as biocompatible nanoprobe for targeting cancer cells *in vitro*. *J Phys Chem C*, 2010, 114: 12062–12068
- 13 Shi W, Li XH, Ma HM. A tunable ratiometric pH sensor based on carbon nanodots for the quantitative measurement of the intracellular pH of whole cells. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 6432–6435
- 14 Ho JA, Lin YC, Wang LS, Hwang KC, Chou PT. Carbon nanoparticle-enhanced immunoelectrochemical detection for protein tumor marker with cadmium sulfide biotracers. *Anal Chem*, 2009, 81: 1340–1346
- 15 Wang F, Chen YH, Liu CH, Ma DG. White light-emitting devices based on carbon dots' electroluminescence. *Chem Commun*, 2011, (47): 3502–3504
- 16 Liu S, Tian JQ, Wang L, Zhang YW, Qin XY, Luo YL, Asiri AM, Al-Youbi AO, Sun XP. Hydrothermal treatment of grass: A low-cost, green route to nitrogen-doped, carbon-rich, photoluminescent polymer nanodots as an effective fluorescent sensing platform for label-free detection of Cu(II) ions. *Adv Mater*, 2012, 24: 2037–2041
- 17 Sahu S, Behera B, Maiti TK, Mohapatra S. Simple one-step synthesis of highly luminescent carbon dots from orange juice: Application as excellent bio-imaging agents. *Chem Commun*, 2012, (48): 8835–8837

- 18 Zhu CZ, Zhai JF, Dong SJ. Bifunctional fluorescent carbon nanodots: Green synthesis via soy milk and as metal-free electrocatalysts for oxygen reduction. *Chem Commun*, 2012, (48): 9367–9369
- 19 Rahy A, Zhou C, Zheng J, Park SY, Kim MJ, Jang I, Cho SJ, Yang DJ. Photoluminescent carbon nanoparticles produced by confined combustion of aromatic compounds. *Carbon*, 2012, 50: 1298–1302
- 20 Bourlinos AB, Stassinopoulos A, Angelos D, Zboril R, Karakassides M, Giannelis EP. Surface functionalized carbogenic quantum dots. *Small*, 2008, 4: 455–458
- 21 Bourlinos AB, Stassinopoulos A, Angelos D, Zboril R, Georgakilas V, Giannelis EP. Photoluminescent carbogenic dots. *Chem Mater*, 2008, 20: 4539–4541
- 22 Liu HP, Ye T, Mao CD. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot. *Angew Chem Int Ed*, 2007, 46: 6473–6475
- 23 Wang X, Cao L, Lu FS, Meziani M J, Li HT, Qi G, Zhou B, Harruff BA, Kermarrec F, Sun YP. Photoinduced electron transfers with carbon dots. *Chem Commun*, 2009, 3774–3776
- 24 Lu J, Yang JX, Wang JZ, Lim AL, Wang S, Loh KP. One-pot synthesis of fluorescent carbon nanoribbons, nanoparticles, and graphene by the exfoliation of graphite in ionic liquids. *ACS Nano*, 2009, 3: 2367–2375
- 25 Zhu H, Wang XL, Li YL, Wang ZJ, Yang F, Yang XR. Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties. *Chem Commun*, 2009, 5118–5120
- 26 Li HT, He XD, Liu Y, Huang H, Lian SY, Lee ST, Kang ZH. One-step ultrasonic synthesis of water-soluble carbon nanoparticles with excellent photoluminescent properties. *Carbon*, 2011, 49: 605–609
- 27 Wang F, Xie Z, Zhang H, Liu CY, Zhang YG. Highly luminescent organosilane-functionalized carbon dots. *Ad Funct Mater*, 2011, 21: 1027–1031
- 28 Liu LQ, Li YF, Zhan L, Liu Y, Huang CZ. One-step synthesis of fluorescent hydroxyls-coated carbon dots with hydrothermal reaction and its application to optical sensing of metal ions. *Sci China Chem*, 2011, 54: 1342–1347

Ultrasonic one-step synthesis of biocompatible yellow-green fluorescent carbon dots

LIU Hui^{1,2}, YANG XiaoXi², ZHENG JiaJia¹, LI YuanFang¹, HUANG ChengZhi^{1,2*}

1 Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis of Ministry of Education; College of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 College of Pharmaceutical Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

*Corresponding author (email: chengzhi@swu.edu.cn)

Abstract: In this paper, fluorescent carbon dots (CDs) with an average diameter of (3.47±1.81) nm was facilely synthesized through one-step by directly treating candle soot with ultrasonic in violent acid condition. Characterizations indicated that CDs had functional groups such as –OH, C=O and –COOH, and there were the sp³ and sp² carbon atoms. The as-synthesized CDs not only had excellent biocompatibility and chemical inertness, but also had yellow-green photoluminescence, which could serve as a potential fluorescent reagent for bioimaging.

Keywords: fluorescent carbon dots, ultrasonic treatment, bioimaging