论文

机械研磨法制备荧光可调碳量子点

戚淑燕¹, 赵璐¹, 李明悦¹, 樊择坛¹, 李淑花¹, 范楼珍^{1*}, 范红^{2*}

1. 北京师范大学化学学院, 北京 100875

2. 山西省人民医院, 太原 030012

*通讯作者, E-mail: lzf@bnu.edu.cn; fanhong661016@163.com

收稿日期: 2017-02-09; 接受日期: 2017-06-01; 网络版发表日期: 2017-08-29

国家自然科学基金(编号: 21233003, 21573019)资助项目

摘要 以有机小分子丙酮为前驱体, 在碱性条件下, 采用机械研磨法制备了蓝绿色荧光碳量子点(carbon quantum dots, CQDs-1), 其荧光发射波长为500 nm. 加入氟化钾(或氯化钾)共同研磨后得到黄色荧光CQDs(CQDs-2, 荧光发射波长为560 nm), 而加入溴化钾(或碘化钾)共同研磨得到红色荧光CQDs(CQDs-3, 荧光发射波长为600 nm). 通过紫外可见吸收光谱(UV-Vis)和荧光光谱(PL)测定了3种CQDs的光学性质; 通过透射电子显微镜(TEM)、原子力显微镜(AFM)、X射线粉末衍射(XRD)和拉曼光谱(Raman)对制得的CQDs进行了形貌及结构表征, 并推断了CQDs的形成机理. 采用简单的机械研磨法制备的荧光可调CQDs具有低细胞毒性、良好的水溶性和生物相容性, 可进入肿瘤细胞用于细胞成像研究.

关键词 碳量子点, 机械研磨法, 荧光, 细胞成像

1 引言

碳量子点(carbon quantum dots, CQDs)是粒径在10 nm以下的准零维碳纳米粒子. 自2004年美国南卡罗来纳州立大学的科学家们通过凝胶电泳法对制备的单层碳纳米管进行纯化获得碳量子点以来^[1], 碳量子点迅速引起了生物、医学、材料等各领域研究者的关注. 相对于传统的半导体量子点和有机染料分子, 碳量子点水溶性好、易于功能化、耐光漂白、毒性低, 并且具有良好的生物相容性, 被广泛应用于光电器件、燃料电池、生物传感、荧光成像、癌症治疗等领域^[2-15].

目前, 碳量子点的合成方法主要分为自上而下法和自下而上法两类. 自上而下法是通过化学或物理方

法从碳纳米管、石墨、石墨烯等较大的碳骨架上剥落纳米碳颗粒的合成方法, 包括激光消融法、电化学法、弧光放电法、水热切割法等^[16-19]. 自下而上法则是以含碳的有机分子小分子(如柠檬酸、葡萄糖、甘油、氨基酸、尿素等)为前驱体, 通过一系列溶液化学反应合成碳量子点的方法, 包括热分解法、微波辅助法、化学氧化法、水热合成法等^[20-25]. 这些常用于制备碳量子点的方法一般在高温高压、强氧化剂、高电流、电压等剧烈的反应条件下进行, 同时存在耗时耗能、设备复杂、操作繁琐、成本高、产率低等问题. 因此, 探究一种仪器设备易得、实验操作简单的制备碳量子点的方法十分必要.

本文以丙酮为前驱体, 在碱性条件下, 采用机械研磨法制备了蓝绿色荧光CQDs(CQDs-1, 荧光发射波长

引用格式: 戚淑燕, 赵璐, 李明悦, 樊择坛, 李淑花, 范楼珍, 范红. 机械研磨法制备荧光可调碳量子点. 中国科学: 化学, 2017, 47: 1132-1139
Qi S, Zhao L, Li M, Fan Z, Li S, Fan L, Fan H. Preparation of fluorescence tunable carbon quantum dots by mechanical trituration method. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1132-1139, doi: 10.1360/N032017-00020

为500 nm), 加入氟化钾(或氯化钾)共同研磨后得到黄色荧光CQDs (CQDs-2, 荧光发射波长为560 nm), 而加入溴化钾(或碘化钾)共同研磨后得到红色荧光CQDs (CQDs-3, 荧光发射波长为600 nm). 这种方法简单方便、可操作性强、成本低, 制备的CQDs荧光可调、毒性低、水溶性和生物相容性好, 可被应用于肿瘤细胞成像.

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

试剂: 氢氧化钾、丙酮、氟化钾、氯化钾、溴化钾、碘化钾均购自北京化工厂(中国).

仪器: 透射电子显微镜(transmission electronic microscope, TEM, Tecnai F20, 工作电压为200 kV, 美国)、原子力显微镜(atomic force microscope, AFM, Multi-Mode V SPM VEECO, 美国)、X射线衍射仪(X-ray diffraction, XRD, PANalytical X' Pert Pro MPD, Cu靶, K α 射线, 荷兰)、激光共聚焦显微拉曼光谱仪(laser confocal micro-Raman spectroscopy, LabRAM Aramis, 激发光源为633 nm He-Ne激光, 法国)、荧光分光光度计(PerkinElmer-LS55, 英国)、紫外分光光度计(UV-2450, 岛津公司, 日本)、高速离心机(TGL-18C-C, 上海安亭科学仪器厂, 中国)、手提式紫外分析仪(CB10-UV2A, 北京赛百奥科技有限公司, 中国).

2.2 荧光可调碳量子点的制备

称取5.00 g氢氧化钾固体于研钵中, 加入10.0 mL丙酮, 在室温下研磨15~20 min. 研磨过程中, 液体颜色由无色变为黄色, 最后变为红棕色, 得到CQDs-1粗产品. 将CQDs-1乳状液体转移至离心管中, 超声后, 在10000 r/min下离心10 min, 除去不溶性杂质. 离心后取上清液于圆底烧瓶中, 旋转蒸发, 除去多余的丙酮, 加去离子水得到澄清透明的棕黄色溶液. 为了除去溶液中的电解质, 将溶液用1 mol/L的盐酸溶液中和后, 倒入透析袋(截留分子量为3500 Da)中透析3 d, 得到pH为7的CQDs-1水溶液. 该溶液在365 nm的紫外灯照射下发出明亮的蓝绿色荧光.

其他条件不变, 在研钵中添加氟化钾或氯化钾, 可制得黄色荧光CQDs-2水溶液; 在研钵中添加溴化钾或碘化钾, 可制得红色荧光CQDs-3水溶液.

2.3 碳量子点用于肿瘤细胞成像研究

将人宫颈癌细胞系(HeLa)在6孔显微板中人工培养, 细胞密度为每孔 3×10^5 个细胞. 在37℃恒温条件下将培养好的HeLa细胞分别与10 μ g/mL的CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3水溶液孵育24 h. 用磷酸盐缓冲溶液洗涤3次, 除去细胞外面的CQDs, 并在室温下用多聚甲醛固定细胞20 min. 用载玻片封片后, 在激光共聚焦荧光显微镜下观察, 研究3种CQDs分别对HeLa细胞的标记情况.

采用细胞活性比色检测法(MTT检测)测定3种CQDs水溶液的细胞毒性. 分别用不同浓度的CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3水溶液与HeLa细胞共同孵育, 72 h后, 根据酶标仪上的读数计算细胞活性.

3 结果与讨论

3.1 碳量子点的制备和光学性质研究

以丙酮为前驱体, 在碱性条件下, 采用机械研磨法可以制备蓝绿色荧光CQDs (CQDs-1), 当加入氟化钾或碘化钾共同研磨, 可分别制备黄色荧光CQDs (CQDs-2)和红色荧光CQDs (CQDs-3). 图1(a), (b)分别为CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3水溶液在日光灯下和365 nm的紫外灯照射下的图片.

为了进一步探究CQDs的光学性质, 分别测定了这3种CQDs的紫外可见(UV-Vis)吸收光谱和荧光光谱图. 从这3种CQDs水溶液的UV-Vis吸收光谱(图2(a))可以发现, CQDs在240和300 nm左右出现了两个特征吸收峰, 分别为CQDs的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁和 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收峰. 并且 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁吸收峰随着CQDs发射波长的增大而红

图1 日光(a)和365 nm的紫外灯(b)照射下的CQDs水溶液(从左往右分别为CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3)(网络版彩图)

图2 (a) CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3的UV-Vis吸收光谱图; CQDs-1 (b), CQDs-2 (c)和CQDs-3 (d)的荧光光谱图(网络版彩图)

移, 从290 nm (CQDs-1) 增加到330 nm (CQDs-3). 不同荧光发射的CQDs水溶液的荧光发射光谱图如图2(b)~(d)所示. 随着激发波长的增加, 这3种CQDs水溶液荧光发射光谱的强度先增加后减小, 但其发射峰位置没有移动, 分别为500 nm (CQDs-1)、560 nm (CQDs-2)和600 nm (CQDs-3). 这一结果表明, 采用简单的机械研磨法, 可以制备荧光可调的CQDs, 且得到的CQDs具有独特的荧光性质——荧光不依赖激发.

以罗丹明6G为标准参比物质, 分别配置5个不同浓度的罗丹明6G乙醇溶液和CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3水溶液, 在1.00 cm的石英比色皿中分别采用430 nm (CQDs-1)、490 nm (CQDs-2)、510 nm (CQDs-3)的激发波长的光测定其荧光光谱, 同时测定溶液在各自激发波长处的紫外吸收, 以吸收值对荧光强度积分数据作图(图3). 根据以下公式分别测定其荧光量子产率.

$$\Phi_x = \Phi_{ST} \left(\frac{m_x}{m_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_x^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

其中 Φ_x 是待测溶液的量子产率, Φ_{ST} 是罗丹明6G乙醇溶液的量子产率, 文献报道值是0.95. m 是直线的斜率, η 是溶剂的折光率, 对于乙醇是1.36, 而水溶液是1.33. 根据上述方法测得机械研磨法制备获得的CQDs的相对荧光量子产率分别为20.14% (CQDs-1)、12.47% (CQDs-2)和8.68% (CQDs-3).

3.2 碳量子点的形貌和结构表征

为了探究所制得的荧光CQDs的形貌, 我们对制备的3种CQDs进行了透射电镜表征, 如图4(a)~(c)所示. 将CQDs水溶液滴在铺有超薄碳膜的铜网上观察, 可以发现, 机械法制备的3种CQDs大小均匀, 粒径分别为2.75 nm (CQDs-1)、3.42 nm (CQDs-2)、4.85 nm (CQDs-3). 由此推测, CQDs的荧光波长可能与其尺寸有关, 尺寸增大, 波长红移. 原子力显微镜可测定制备的CQDs的厚度, 从而推测其层数. 将3种CQDs水溶液滴在洁净的云母片上, 在匀胶机上甩膜后在真空干燥箱中干燥, 并进行AFM表征. 如图4(d)~(f)所示, 3种CQDs

图3 罗丹明6G (a), CQDs-1 (b), CQDs-2 (c), CQDs-3 (d)的荧光强度积分面积-紫外吸收图(网络版彩图)

图4 CQDs-1 (a), CQDs-2 (b), CQDs-3 (c)的TEM图; CQDs-1 (d), CQDs-2 (e), CQDs-3 (f)的AFM图(网络版彩图)

的厚度均在1~2 nm,可推测它们由2~3层石墨烯组成^[26]。

为了进一步探究CQDs的结构,分别测定了3种CQDs的X射线粉末衍射(XRD)和拉曼光谱图(Raman)。CQDs的XRD图(图5(a))显示,3种CQDs点均在 26° 处出

现了一个宽而弱的C(002)衍射峰,表明机械研磨法制备的CQDs为粉末型。从Raman图(图5(b))中看出,3种CQDs在 1372 和 1608 cm^{-1} 处出现了碳材料特有的D峰和G峰。其中D峰代表碳材料的结构缺陷,G峰表示碳

图5 CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3的XRD (a)和Raman (b)图(网络版彩图)

原子杂化方式, 两者的比例可以衡量碳材料的缺陷. 从图中可以计算, CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3的D峰和G峰的比例分别为0.77、0.76、0.74, 低于文献报道^[27-29]. 表明CQDs的晶格缺陷较少, 且随着CQDs发射波长的红移, 晶格缺陷减少.

X射线光电子能谱(XPS)是研究CQDs表面官能团的有力手段. 分别将CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3水溶液滴在单晶硅片上, 在真空干燥箱中烘干, 得到均匀

的膜, 用X射线光电子能谱仪进行表征. 如图6(a)所示, 利用机械研磨法制备的CQDs主要含C、O两种元素. 从C1s图(图6(b)~(d))中可以看出, 3种CQDs均含有碳碳双键、碳氧双键、碳氧单键, 且碳氧双键、碳氧单键的含量随CQDs发射波长的红移而减少.

3.3 碳量子点的形成机理推断

丙酮在碱性条件下可发生羟醛缩合反应. 如图7(a)

图6 (a) CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3的XPS全谱图; CQDs-1 (b), CQDs-2 (c), CQDs-3 (d)的C1s谱图(网络版彩图)

图 7 (a) 丙酮的羟醛缩合反应机理图; (b) 多丙酮缩合形成CQDs反应机理图

所示, 丙酮 α 碳上的氢在碱催化下易被“拔去”, 生成碳负离子. 碳负离子作为亲核试剂对另一分子丙酮进行亲核加成, 生成 β -羟基醇, β -羟基醇受热脱水形成不饱和酮. 三分子的丙酮发生羟醛缩合反应可合成一分子的1,3,5-三甲基苯. 可以推测, 多个丙酮反应可生成层状的纳米石墨烯片层, 最终形成CQDs (图7(b)). 卤素离子的存在, 在一定程度上促进了反应的发生.

3.4 碳量子点用于肿瘤细胞成像

机械研磨法制备的不同荧光发射的CQDs荧光强度高、水溶性好、有很好的荧光稳定性和生物兼容性, 在肿瘤细胞荧光成像方面具有潜在的应用前景. 将HeLa细胞在6孔显微板中人工培养, 细胞密度为每孔 3×10^5 个细胞. 在 37°C 恒温条件下将培养好的HeLa细胞分别与 $10 \mu\text{g/mL}$ 的CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3水溶液孵育24 h. 然后用磷酸盐缓冲溶液洗涤3次, 除去细胞外面的CQDs并在室温下用多聚甲醛固定细胞20 min. 用载玻片封片后, 在激光共聚焦荧光显微镜下观察, 研究CQDs对HeLa细胞的标记情况. 如图8所示, 当使用激发波长为405 nm的激光照射细胞时, 与CQDs-1共同孵育的细胞呈现明亮的蓝绿色荧光, 与CQDs-2共同孵

图 8 HeLa细胞分别与CQDs-1 (a)、CQDs-2 (b)、CQDs-3 (c)共同孵育后的激光共聚焦荧光显微镜照片((a), (b)激发波长为405 nm; (c)激发波长为488 nm) (网络版彩图)

育的细胞呈现明亮的黄色荧光. 当使用激发波长为488 nm的激光照射细胞时, 与CQDs-3共同孵育的细胞呈现明亮的红色荧光. 该结果表明, 本实验制备的CQDs易进入肿瘤细胞, 用于肿瘤细胞成像研究.

为了研究水溶性CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3的细胞毒性, 采用细胞活性比色检测法(MTT)进行检测. 分别用不同浓度的CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3溶液孵育HeLa细胞, 72 h后, 根据酶标仪上的读数计算细胞活性. 如图9所示, 用 $200 \mu\text{g/mL}$ 的CQDs溶液孵育3 d后, HeLa细胞仍然有70%以上的活性, 表明机械研磨法制备的荧光可调CQDs可以作为一种理想的低毒性的肿

图9 HeLa细胞分别与CQDs-1、CQDs-2、CQDs-3共同孵育后的细胞毒性图

瘤细胞荧光标记材料。

4 结论

以有机小分子丙酮为前驱体,在碱性条件下,采用机械研磨法制备了蓝绿色荧光CQDs-1。加入氟化钾(或氯化钾)共同研磨后得到黄色荧光CQDs-2,而加入溴化钾(或碘化钾)共同研磨后得到红色荧光CQDs-3。与常用的制备CQDs的方法相比,此实验方法简便迅速、成本低,适用于大批量生产。采用简单的机械研磨法制备的荧光可调CQDs具有低细胞毒性、良好的水溶性和生物兼容性,可进入肿瘤细胞应用于细胞成像研究。

参考文献

- Xu X, Ray R, Gu Y, Ploehn HJ, Gearheart L, Raker K, Scrivens WA. *J Am Chem Soc*, 2004, 126: 12736–12737
- Xie W, Fu Y, Ma H, Zhang M, Fan L. *Acta Chim Sin*, 2012, 70: 2169–2172
- Zhu J, Liao L, Zhu L, Kong J, Liu B. *Acta Chim Sin*, 2013, 71: 69–74
- Faklaris O, Joshi V, Irinopoulou T, Tauc P, Sennour M, Girard H, Gesset C, Arnault JC, Thorel A, Boudou JP, Curmi PA, Treussart F. *ACS Nano*, 2009, 3: 3955–3962
- Riggs JE, Guo Z, Carroll DL, Sun YP. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 5879–5880
- Yuan F, Li S, Fan Z, Meng X, Fan L, Yang S. *Nano Today*, 2016, 11: 565–586
- Zhang M, Bai L, Shang W, Xie W, Ma H, Fu Y, Fang D, Sun H, Fan L, Han M, Liu C, Yang S. *J Mater Chem*, 2012, 22: 7461–7467
- Li S, Li Y, Cao J, Zhu J, Fan L, Li X. *Anal Chem*, 2014, 86: 10201–10207
- Fan Z, Li Y, Li X, Fan L, Zhou S, Fang D, Yang S. *Carbon*, 2014, 70: 149–156
- Guo R, Zhou S, Li Y, Li X, Fan L, Voelcker NH. *ACS Appl Mater Interf*, 2015, 7: 23958–23966
- Yuan F, Ding L, Li Y, Li X, Fan L, Zhou S, Fang D, Yang S. *Nanoscale*, 2015, 7: 11727–11733
- Fan Z, Li S, Yuan F, Fan L. *RSC Adv*, 2015, 5: 19773–19789
- Ge J, Lan M, Zhou B, Liu W, Guo L, Wang H, Jia Q, Niu G, Huang X, Zhou H, Meng X, Wang P, Lee CS, Zhang W, Han X. *Nat Commun*, 2014, 5: 4596
- Ge J, Jia Q, Liu W, Guo L, Liu Q, Lan M, Zhang H, Meng X, Wang P. *Adv Mater*, 2015, 27: 4169–4177
- Ge J, Jia Q, Liu W, Lan M, Zhou B, Guo L, Zhou H, Zhang H, Wang Y, Gu Y, Meng X, Wang P. *Adv Healthc Mater*, 2016, 5: 665–675
- Sun YP, Zhou B, Lin Y, Wang W, Fernando KAS, Pathak P, Meziani MJ, Harruff BA, Wang X, Wang H, Luo PG, Yang H, Kose ME, Chen B, Veca LM, Xie SY. *J Am Chem Soc*, 2006, 128: 7756–7757
- Bottini M, Balasubramanian C, Dawson MI, Bergamaschi A, Bellucci S, Mustelin T. *J Phys Chem B*, 2006, 110: 831–836
- Nguyen V, Si J, Yan L, Hou X. *Carbon*, 2015, 95: 659–663
- Lee J, Kim K, Park WI, Kim BH, Park JH, Kim TH, Bong S, Kim CH, Chae GS, Jun M, Hwang Y, Jung YS, Jeon S. *Nano Lett*, 2012, 12: 6078–6083
- Yu H, Li X, Zeng X, Lu Y. *Chem Commun*, 2016, 52: 819–822
- Yan X, Cui X, Li LS. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 5944–5945
- Wu X, Tian F, Wang W, Chen J, Wu M, Zhao JX. *J Mater Chem C*, 2013, 1: 4676–4684
- Lai CW, Hsiao YH, Peng YK, Chou PT. *J Mater Chem*, 2012, 22: 14403–14409
- Jia X, Li J, Wang E. *Nanoscale*, 2012, 4: 5572–5575
- Jiang J, He Y, Li S, Cui H. *Chem Commun*, 2012, 48: 9634–9636
- Garcia AC, Gasparotto LHS, Gomes JF, Tremiliosi-Filho G. *Electrocatalysis*, 2012, 3: 147–152
- Qu D, Zheng M, Du P, Zhou Y, Zhang L, Li D, Tan H, Zhao Z, Xie Z, Sun Z. *Nanoscale*, 2013, 5: 12272–12277

- 28 Luo W, Wang Y, Chou S, Xu Y, Li W, Kong B, Dou SX, Liu HK, Yang J. *Nano Energy*, 2016, 27: 255–264
29 Luo W, Wang Y, Wang L, Jiang W, Chou SL, Dou SX, Liu HK, Yang J. *ACS Nano*, 2016, 10: 10524–10532

Preparation of fluorescence tunable carbon quantum dots by mechanical trituration method

Shuyan Qi¹, Lu Zhao¹, Mingyue Li¹, Zetan Fan¹, Shuhua Li¹, Louzhen Fan^{1*}, Hong Fan^{2*}

¹ Department of Chemistry, Beijing Normal University, Beijing 100875, China

² Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030012, China

*Corresponding authors (email: lzf@bnu.edu.cn; fanhong661016@163.com)

Abstract: Carbon quantum dots (CQDs) which emitted blue-green fluorescence (abbreviated as CQDs-1) were prepared by grinding organic small molecule acetone under alkaline conditions. Upon adding KF (or KCl) and grinding with acetone, the fluorescence emission peak of CQDs shifts from 500 nm (CQDs-1) to 560 nm (CQDs-2). And red fluorescent CQDs-3 with a fluorescence emission peak of 600 nm (CQDs-3) were obtained when KF (or KCl) was changed to KBr (or KI) under the same conditions. UV-Vis absorption spectrum and fluorescence spectrum were used to study their optical properties. And their morphologies and microstructures were characterized by transmission electron microscope (TEM), atomic force microscope (AFM), X-ray diffraction (XRD) and Raman spectra. The formation mechanism of CQDs was explored. The results show that CQDs prepared by such simple mechanical trituration method exhibit low cytotoxicity, high water solubility and good biocompatibility, thus they can be used for tumor cell imaging.

Keywords: carbon quantum dots, mechanical trituration method, fluorescence, cell imaging

doi: [10.1360/N032017-00020](https://doi.org/10.1360/N032017-00020)