



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Green Chemical Engineering—Article

荧光碳点的快速宏量制备及多功能应用

王丹^{a,b}, 王志勇^a, 詹求强^c, 蒲源^{a,*}, 王洁欣^a, Neil R. Foster^{a,d}, 戴黎明^{b,*}

^a Beijing Advanced Innovation Center for Soft Matter Science and Engineering & State Key Laboratory of Organic-Inorganic Composites, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

^b Center of Advanced Science and Engineering for Carbon (Case4Carbon), Department of Macromolecular Science and Engineering, Case School of Engineering, Case Western Reserve University, Cleveland, OH 44106, USA

^c SCNU-ZJU Joint Research Center of Photonics, South China Academy of Advanced Optoelectronics, South China Normal University, Guangzhou 510006, China

^d Department of Chemical Engineering, Curtin University, Perth, WA 6845, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 March 2017

Revised 13 April 2017

Accepted 19 April 2017

Available online 17 May 2017

关键词

宏量

碳点

双光子

荧光寿命成像

图案化

摘要

荧光纳米材料在化学传感、生物成像及光电器件等领域具有重要应用前景,其合成方法的研究得到广泛关注。我们采用柠檬酸和乙二醇作为原料,在150 °C、常压的相对温和条件下,通过“一锅法”反应制备了氮掺杂荧光碳点。所得荧光碳点光学带隙为3.4 eV,在单光子或双光子激发下呈现出明亮的荧光,且荧光发射波长稳定($\lambda = 450$ nm)。基于荧光碳点低细胞毒性和长荧光寿命的优势,实现了荧光碳点作为离体肿瘤细胞(HeLa细胞)标记和荧光寿命成像探针的应用,获得了高对比度的荧光寿命成像结果。通过将所得荧光碳点与普通油墨混合制备均匀分散的荧光墨水,可用于普通纸张及其他基材(如柔性塑料薄膜、纺织品、衣服)的荧光图案化,为固态荧光传感、荧光防伪标记和可穿戴光电子设备应用研究提供了基础。

© 2017 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of the Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 背景介绍

随着纳米材料和纳米技术的飞速发展,近来涌现出许多新型荧光纳米材料[1],包括半导体量子点[2,3]、染料掺杂的聚合物或二氧化硅纳米颗粒[4–6]、金属纳米团簇[7]、稀土掺杂的上转换纳米颗粒[8,9]和荧光碳纳米点[10,11]。其中,碳点(CD)又称碳量子点或碳纳米点,因其制备成本低、原材料丰富、生物相容性高、抗光漂白性能好等优点[12,13],引起广泛关注。目前碳点已在生物传感[14]、生物成像[15]、光动力治疗[16]、太阳能电池[17]、光电显示[18]和催化等领域展现出重要应用前景[19]。相应的荧光碳点制备方法也有大量文献

报道,包括简单的蜡烛燃烧、激光消融和水热碳化等多种方法[20],其中,采用柠檬酸与含氮碱在水热条件下的聚合反应及碳化过程是制备高效率荧光碳点的常用方法[21]。已有研究表明,将一定量的柠檬酸与乙二醇在160 °C下进行水热处理,可制备量子效率高达94%的荧光碳点[22]。尽管传统水热法在制备纳米材料的实验室规模基础研究中有广泛应用,但对相应材料的规模制备和产业化应用存在多种限制,比如传统水热法使用聚四氟乙烯内衬和不锈钢高压釜作为反应器的成本较高、封闭反应器(“黑匣子”)中的反应过程难以实现反应过程的实时监测、高温高压反应条件的规模放大存在较高安全隐患[23]。因此,开发荧光碳点快速宏量制备新方法,

* Corresponding author.

E-mail address: puyuan@mail.buct.edu.cn; liming.dai@case.edu

是当前碳点研究中面临的重大挑战,也是实现其商品化应用的关键。

本文报道了一种柠檬酸与乙二胺在常压条件下,通过“一锅法”快速宏量制备氮掺杂荧光碳点的方法。所得碳点光学带隙为3.4 eV,在单光子或双光子激发下呈现出明亮的荧光,且荧光发射波长稳定($\lambda = 450$ nm)。与传统水热法相比,本研究方法具有如下优点:①反应过程在150 °C常压条件下进行,符合节能环保绿色化学的要求[24];②相对温和的反应条件,利于规模放大和宏量制备;③所得碳点荧光发射波长稳定且与激发波长无关,有别于传统碳点荧光特性。所得碳点具备低细胞毒性和长荧光寿命,可作为细胞荧光寿命成像的探针,获得具有高对比度和高分辨率的成像结果。由于碳点表面具有丰富的亲水基团,使其能够很好地分散在水相介质,进而制备高分散荧光墨水分散体,通过与普通油墨混合,可用于普通纸张及其他基板(如柔性塑料薄膜、纺织品、衣服)的荧光图案绘制,在固态荧光传感、荧光防伪和可穿戴光电子设备领域具有潜在应用。

2. 材料和实验方法

2.1. 荧光碳点的制备和表征

碳点的制备采用柠檬酸与乙二胺在常压条件下加热煮沸回流实现。具体而言,首先将2 g 柠檬酸和3 mL 去离子水在50 mL容量的烧杯中混合均匀,随后在室温条件加入3 mL乙二胺。将混合溶液加热(加热速率为15 °C·min⁻¹)至沸腾状态并保持30 min,通过温度计实时监测反应过程的温度。待反应物中的水完全蒸发后,进一步对烧杯中的产物进行加热,至反应混合物从黄色液体转变为深棕色黏稠状,使柠檬酸与乙二胺充分缩合形成聚合物,进而碳化得到荧光碳点。反应完全后将产物冷却至室温,可得棕色固体荧光碳点材料。

碳点样品微观尺寸和形貌采用Hitachi H-9500型高分辨率透射电子显微镜(HRTEM)在明场成像模式成像观察。通过使用Pierce™预染蛋白(Thermo Fisher Scientific)分子质量标准,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分析碳点的分子量[25]。使用PerkinElmer傅里叶变换红外光谱仪(FTIR)测定样品红外光谱。X射线光电子能谱分析(XPS)的数据采集通过VG Microtech ESCA 2000型XPS仪器完成,实验过程中使用单色Al源。热重分析(TGA)采用TA Instruments公司设备,加热速率为15 °C·min⁻¹。紫外-可见吸收光谱测试使用Shimadzu UV

1800型扫描分光光度计。单光子激发光谱和荧光发射光谱通过Hitachi F-2500荧光分光光度计获得,双光子激发荧光光谱通过Ideoptics PG 2000型光纤光谱仪采集,激发光为波长750 nm、脉冲宽度150 fs的脉冲激光。荧光寿命测量通过时间相关单光子计数系统(TCSPC)完成,激发光和荧光发射光波长分别为390 nm和450 nm。

2.2. 细胞培养和细胞毒性研究

离体细胞毒性研究使用HeLa细胞作为研究对象,HeLa细胞在含有10%胎牛血清(FBS)、1%青霉素和1%两性霉素B的细胞培养基中培养。在细胞毒性研究实验的前一天,将HeLa细胞接种至96孔培养皿中,每个孔中的细胞数约为6000个。将一定量的荧光碳点溶液滴加入不同实验组细胞的培养液中,使碳点浓度分别为0、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、150 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将细胞与荧光碳点共同孵育3 h和24 h后,通过MTT[3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐]法测定细胞存活率。未经荧光碳点处理的对照细胞(即碳点浓度为0)的细胞存活率记为100%,并与其他实验组细胞的相对存活率结果进行比较。

2.3. 双光子激发细胞成像

离体细胞双光子荧光成像使用HeLa细胞作为研究对象。首先将HeLa细胞接种至35 mm细胞培养皿中并使其贴壁生长24 h,随后向细胞培养液中加入100 μL 荧光碳点分散体(浓度为1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。未加荧光碳点的一组HeLa细胞作为对照。待细胞在含荧光碳点的培养液中孵育2 h后,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗细胞三次,并在双光子荧光寿命成像系统下观察细胞荧光信号。所用双光子荧光寿命成像系统由Olympus FV1000型激光扫描共聚焦显微系统耦合飞秒脉冲激光器(作为激发光源),以及PicoQuant MicroTime 200型荧光寿命成像单元组成。

3. 结果与讨论

3.1. 荧光碳点的合成与表征

图1(a)是本文采用柠檬酸和乙二胺为原料制备荧光碳点的反应过程示意图。实验过程中,在柠檬酸与乙二胺混合之初,由于对外部加热(加热速率约15 °C·min⁻¹)以及柠檬酸与乙二胺反应放热的共同作用,混合溶液温度迅速升高。5 min后,混合溶液温度达到100 °C,并伴

有明显的气泡产生。待水分完全蒸发后,将反应混合物进一步加热至150 °C (通过数字红外线温度计监测),使柠檬酸与乙二胺充分缩合,形成聚合物状纳米点,进而通过自组装和碳化,形成纳米尺寸的荧光碳点。图1(b)展示了采用“一锅法”合成荧光碳点所得产物的照片,表明该方法易于放大,有利于荧光碳点的快速宏量制备。图1(c)是所得荧光碳点的高分辨率透射电子显微

镜照片,可以看出碳点为平均粒径为3 nm的颗粒。图1(c)中的插图是单个碳点的高分辨率照片,从图中可以清楚地看到所得碳点具有晶格相结构,且晶格间距为0.205 nm,与石墨中的(102)晶面的间距相一致[26]。PAGE分析结果表明,所得碳点分子质量在20~25 kDa范围,且分子质量分布较窄[图1(d)]。

图2(a)是实验制备荧光碳点的X射线衍射(XRD)

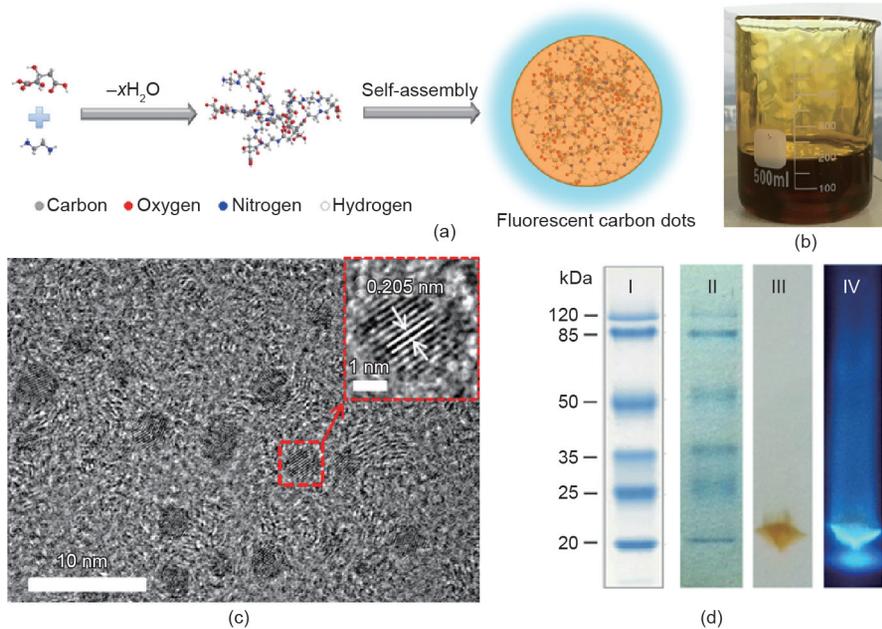


图1. (a) 柠檬酸和乙二胺反应制备荧光碳点的反应过程示意图; (b) “一锅法”宏量制备荧光碳点产物照片; (c) 荧光碳点高分辨率透射电子显微成像照片,插图:单个碳点高分辨率晶格相照片,晶格间距为0.205 nm; (d) 荧光碳点PAGE分析结果, I: 作为参照的预染色蛋白谱带数据, II: 实验中参照蛋白的谱带结果, III: 可见光下荧光碳点的谱带分布, IV: 紫外灯(365 nm)照射下荧光碳点的谱带成像。

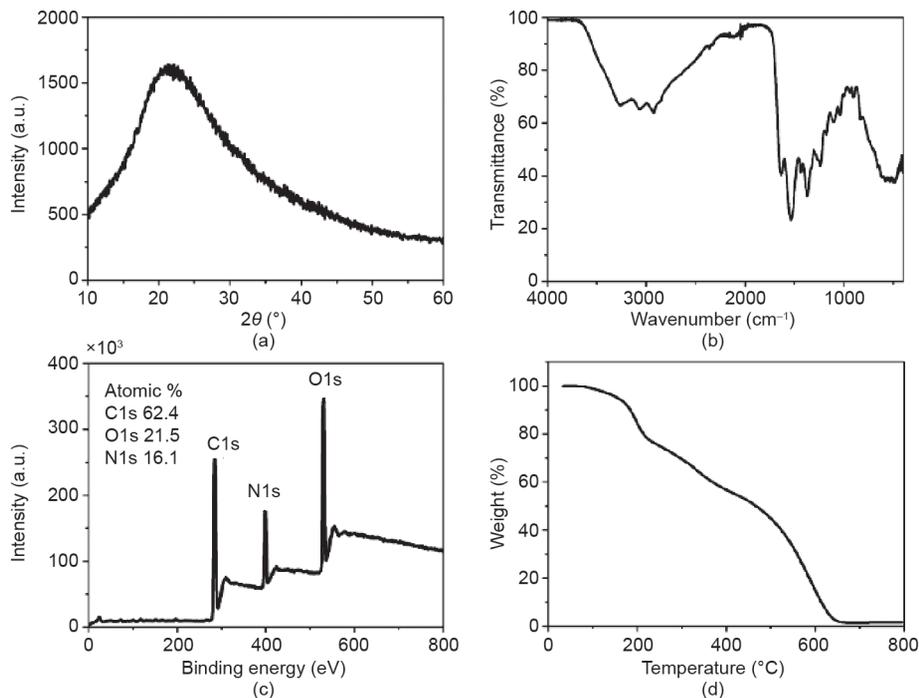


图2. 荧光碳点的结构和组成表征。(a) XRD; (b) FTIR; (c) XPS; (d) TGA结果。

分析结果, 由于碳点尺寸小, 因此呈现出较宽的衍射峰。图2(b)是荧光碳点的FTIR光谱, 可以看到—COOH (3431 cm^{-1} 和 1638 cm^{-1})、—NH (1576 cm^{-1})和C—NH—C (1125 cm^{-1})的特征峰。图2(c)是荧光碳点的XPS数据, 表明荧光碳点碳、氧、氮的原子分数分别为62.4%、21.5%和16.1%[27]。图2(d)是荧光碳点在空气氛围下的TGA分析结果, 可以看到由于碳点物理吸附的水分子的热解, 其在室温至 $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 重量损失为20%, 随后在 $200\sim 500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 由于含氧基团的分解继续失重, 在温度高于 $550\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后, 碳点开始燃烧分解直至完全分解。

3.2. 荧光碳点的单光子和双光子激发荧光特性

图3(a)是荧光碳点分散体(浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)在可见光和暗室中紫外灯(365 nm)激发下的图像及其光学吸收和荧光发射光谱。从图3(a)中的插图可以看出, 荧光碳点可以很好地分散在水中形成透明分散体, 在

紫外光激发下产生明亮的蓝色荧光。由图3(a)中的吸收光谱可以看到, 荧光碳点在波长 350 nm 处有一个强吸收峰, 同时在波长 230 nm 处有一个肩峰, 分别对应碳基的 $n\text{-}\pi^*$ 转变特征峰和氮杂环 sp^2 的 $\pi\text{-}\pi^*$ 转变特征峰。作为对照, 我们分别测试了纯柠檬酸和乙二胺的吸收光谱, 可以看到两种材料在波长大于 250 nm 的光谱范围内没有明显的吸收(见补充材料图S1)。图3(a)展示了荧光碳点在 350 nm (即吸收峰波长)的紫外光激发下, 发出的荧光光谱曲线, 其荧光发射峰位于波长 450 nm 处。通过设定荧光发射波长为 450 nm , 测定得到的碳点激发光谱在 $200\sim 400\text{ nm}$ 光谱波段范围内, 且呈现出与吸收光谱相似的趋势(见补充材料图S2)。通过测定不同激发光($300\sim 450\text{ nm}$ 波长范围)激发下碳点的荧光光谱, 得到了碳点激发-荧光发射对应关系图[图3(b)和补充材料图S3], 可以看到实验所得荧光碳点的荧光发射波长稳定(发射峰位于 450 nm), 且与激发

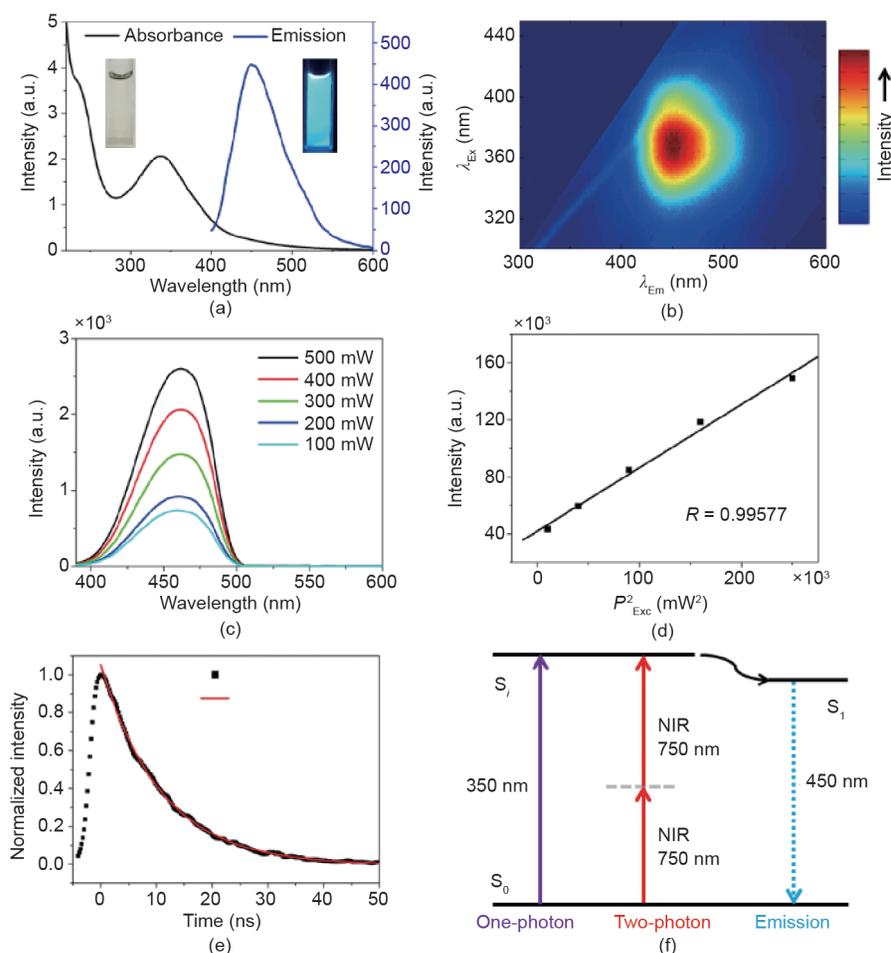


图3. (a) 荧光碳点水相分散体(浓度为 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的紫外-可见吸收(黑色曲线)光谱和紫外激发(350 nm)荧光光谱(蓝色曲线)。插图: 日光照射(左)和紫外灯激发(右)下荧光碳点水相分散体的图像; (b) 荧光碳点的激发-发射关系图; (c) 不同功率密度的飞秒脉冲激光(波长为 750 nm)激发下荧光碳点的荧光光谱; (d) 荧光强度与飞秒脉冲激光功率的平方的关系曲线; (e) 荧光碳点水相分散体在波长为 390 nm 的皮秒脉冲激光激发下荧光寿命曲线及其拟合(荧光检测波长为 450 nm); (f) 单光子和双光子激发荧光过程示意图, S_1 是较高的激发态; S_1 是较低的激发态; S_0 是基态。

波长无关,表明不同荧光碳点颗粒的尺寸和表面特性基本一致[28]。进一步的荧光效率测试表明,实验所得碳点在350 nm紫外光激发下的相对荧光量子产率为42.7%。

为了研究荧光碳点在飞秒脉冲激光激发下的双光子荧光特性,我们采用波长为750 nm、脉冲宽度为150 fs的脉冲激光作为激发光源,激发比色皿中的碳点分散体(浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),并用光纤光谱仪记录荧光发射光谱。通过对比色皿中荧光碳点分散体的线性透射光谱测试,可以看到碳点对600~900 nm近红外光谱范围内的线性吸收基本可忽略(见补充材料图S4)。然而,在波长为750 nm的近红外飞秒脉冲激光激发下,荧光碳点能够发出波长为400~500 nm的荧光,且荧光光谱的峰值位于460 nm[图3(c)],与单光子紫外激发条件下荧光光谱类似[图3(a)中的蓝色曲线]。因此可以认为,在单光子和双光子激发荧光发射过程中,荧光碳点中的激子最终均由相同的激发态发生辐射跃迁至最低的能态[图3(f)]。为了验证图3(c)中所示荧光光谱是由双光子激发产生,我们测量了不同功率飞秒脉冲激光激发下荧光碳点的荧光强度,结果如图3(d)所示。从图中可以看出,荧光碳点在波长为750 nm的近红外飞秒激光激发下,其荧光强度与激发光的功率的平方呈线性相关,表明在该过程中有两个光子被同时吸收[图3(d)]。根据荧光碳点分散体的时间分辨光致发光(TRPL)衰减曲线,可以得到荧光碳点在水相介质中的平均荧光寿命约为7.2 ns,明显大于细胞自发荧光的荧光寿命(通常为1~3 ns)[29]。因此,实验所得荧光碳点有望作为生物医学研究中荧光寿命成像的纳米探针。

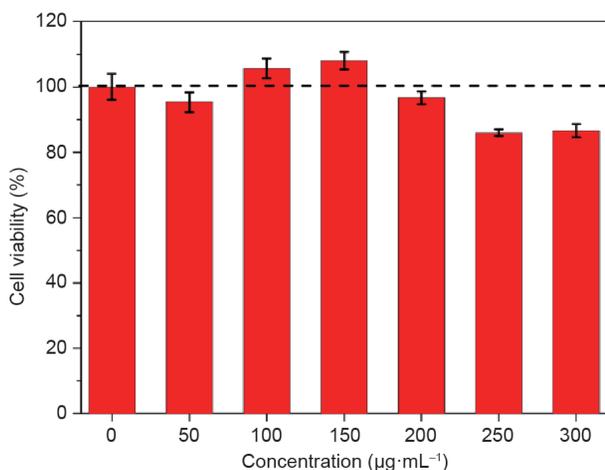


图4. MTT法测定所得HeLa细胞在含有不同浓度碳点的培养基中孵育24 h后的细胞存活率。

3.3. 荧光碳点的体外细胞毒性研究

为了研究荧光碳点的潜在生物医学应用,我们首先采用MTT法测试了碳点对离体HeLa细胞的细胞毒性。图4是HeLa细胞在含有不同浓度碳点的培养基中孵育24 h后的细胞存活率(具体过程参见2.材料和实验方法),可以看出,在荧光碳点浓度增加至 $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的条件下,其对离体细胞的活性仍旧没有明显影响,表明实验所得荧光碳点的细胞毒性低、生物相容性好。

3.4. 荧光碳点用于离体细胞的双光子激发荧光寿命成像

由于具有良好的荧光特性和较低的细胞毒性,目前已有碳点用作细胞荧光成像探针的诸多文献报道[30~32]。然而,已有的碳点用于细胞成像的研究,主要是基于碳点的荧光强度信号,以增强细胞成像对比度。由于碳点的荧光光谱通常在蓝色至绿色光谱波段[400~500 nm,参见图3(a)],而细胞的自发荧光在短波长波段也非常显著,因此,在实际荧光成像过程中,难以区分碳点的荧光信号与细胞的自发荧光,特别是在碳点浓度较低的情况下[30]。上述关于碳点荧光寿命的结果已经表明,碳点的荧光寿命大于细胞自发荧光的荧光寿命,可望作为探针获得高分辨率细胞荧光寿命成像结果。荧光寿命成像系统可以通过双光子激发荧光探针,通过探针样品和背景在荧光寿命的差异来获得图像[33],可以区分不同荧光衰减速率的样品(即使它们具有相同的荧光光谱)[34]。此外,与短波紫外光相比,近红外光在生物组织中具有更大的穿透深度,因此使用双光子激发(波长为750 nm的近红外飞秒脉冲激光)有利于潜在的深层组织成像应用。图5是未经处理的对照组细胞(左)及与本实验所得荧光碳点(中,荧光寿命约为7.2 ns)共同孵育2 h的实验组细胞,以及与已有文献报道中石墨烯量子点[31](右,荧光寿命为1 ns)共同孵育2 h的细胞的荧光寿命成像结果。从图中可以看到,利用荧光寿命成像技术可以很好地区分荧光碳点的荧光信号和细胞自发荧光信号,表明实验所得长荧光寿命的碳点在作为细胞内标记探针及细胞荧光寿命成像方面具有应用前景。

3.5. 荧光碳点图案化应用

基于荧光碳点的荧光特性,也可制备图案化应用的荧光墨水。我们将实验制备的荧光碳点与商用墨水(Hero, 2104S)均匀混合,得到稳定分散的荧光墨水分散

体, 放置7 d后没有在墨水中观察到明显的沉淀和聚集, 表面荧光碳点在墨水中具有高的分散稳定性。利用所得荧光墨水在亲水的纸张上绘制图案[图6(a)], 墨水与纸张浸润性良好。在波长为365 nm的紫外光激发下, 可以看到所绘图案呈现出明亮的荧光[图6(b)], 其荧光光谱有别于相应纸张的自发荧光背景[图6(c)]。同时我们还

注意到, 基于荧光碳点的墨水可以在一些其他基材(如柔性塑料薄膜、纺织品、衣服)中浸润固化, 其固态荧光发射的光谱与溶液中类似, 发光峰位于450 nm[图6(c)和图3(a)]。基于荧光碳点的荧光图案经紫外灯(365 nm)连续照射1 h后, 仍然显示出明亮的荧光信号(见补充材料图S5), 表明荧光碳点图案的光稳定性良好。上述初

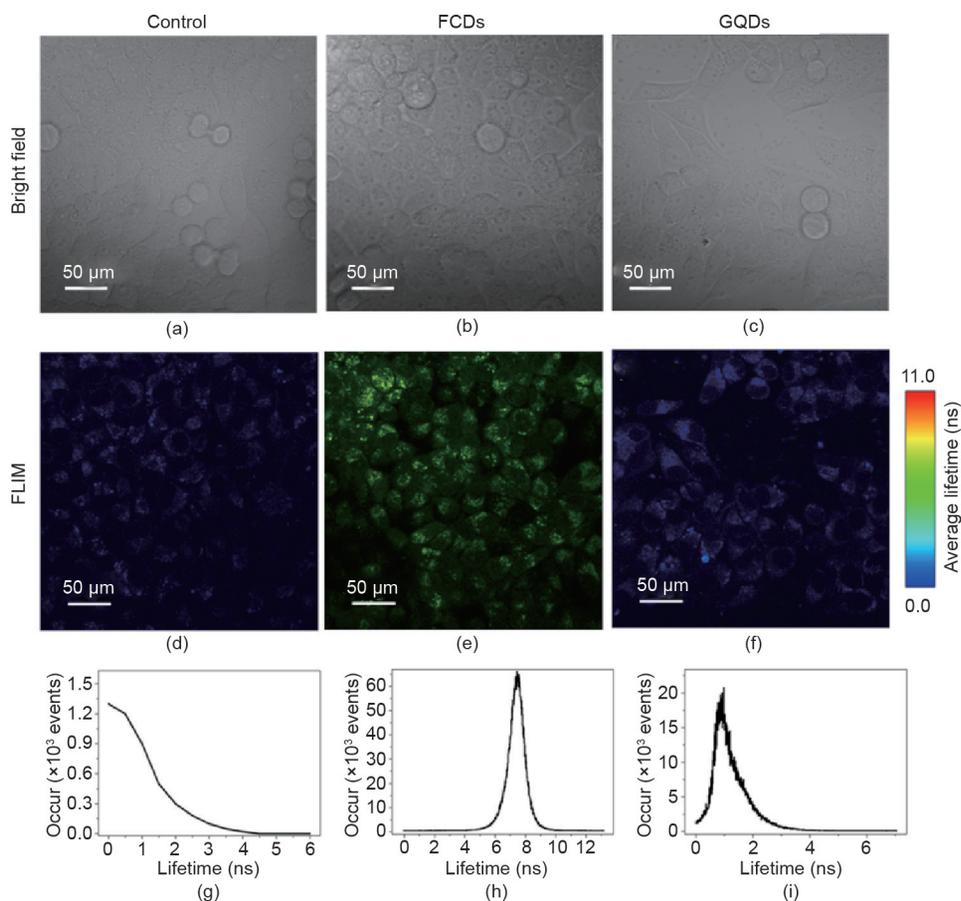


图5. 未经处理的对照组细胞(左)、与本实验所得荧光碳点共同孵育的细胞(中), 以及与之前文献中石墨烯量子点共同孵育的细胞(右)的明场光学成像(a-c)、双光子激发荧光寿命成像(d-f)结果及相应的荧光寿命分布(g-i)。

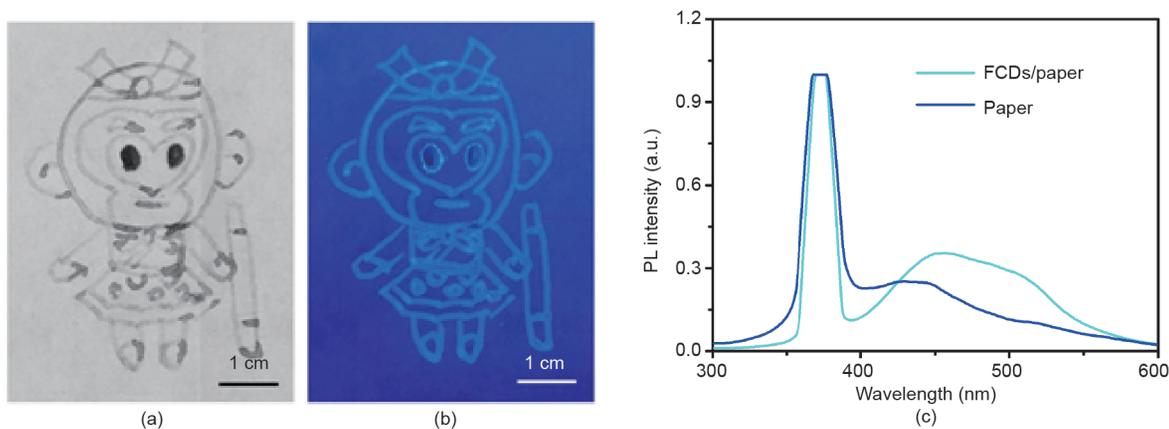


图6. 采用含有荧光碳点的墨水所绘制的图案在日光灯(a)和波长365 nm的紫外灯(b)照射下的图像; (c)为固态荧光碳点和背景纸在波长365 nm紫外光激发下的荧光光谱。

步结果表明, 实验所得荧光碳点在固态荧光传感和荧光防伪标记领域具有应用前景。

4. 总结

本文采用柠檬酸与乙二胺为原料在常压条件下, 通过“一锅法”制备了氮掺杂荧光碳点, 制备快速且规模放大简单。所得碳点的生物相容性好, 在单光子或双光子激发下呈现出明亮的蓝色荧光, 且荧光发射波长稳定 ($\lambda = 450 \text{ nm}$), 具有较长的荧光寿命 (7.2 ns), 显著大于细胞自发荧光的寿命, 可作为细胞标记探针用于双光子荧光寿命成像以获得高对比度的成像结果。所得荧光碳点还能够与普通墨水均匀混合, 制备具有高分散稳定性的荧光墨水, 用于普通纸张和其他基材(如柔性塑料薄膜、纺织品、衣服)的荧光图案化应用研究, 为固态荧光传感、荧光防伪和可穿戴光电子设备应用研究提供基础材料。我们相信本文所开发的荧光碳点新方法以及碳点墨水分散体在多功能应用方面有巨大的发展前景。

致谢

感谢国家自然科学基金(51641201, 21620102007, 61675071和61405062)、国家重点研发计划(2016YFA0201701/2016YFA0201700)、中央高校基本科研业务费专项资金项目(BUCTRC201601), 以及高等学校学科创新引智计划(B14004)的支持。

Compliance with ethics guidelines

Dan Wang, Zhiyong Wang, Qiuqiang Zhan, Yuan Pu, Jie-Xin Wang, Neil R. Foster, and Liming Dai declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Supplementary Information

<http://engineering.org.cn/EN/10.1016/J.ENG.2017.03.014>
Figs. S1–S5

References

- [1] Yao J, Yang M, Duan Y. Chemistry, biology, and medicine of fluorescent nanomaterials and related systems: New insights into biosensing, bioimaging, genomics, diagnostics, and therapy. *Chem Rev* 2014;114(12):6130–78.
- [2] Bruchez Jr M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998;281(5385):2013–6.
- [3] Wang D, Qian J, Cai F, He S, Han S, Mu Y. ‘Green’-synthesized near-infrared PbS quantum dots with silica-PEG dual-layer coating: Ultrastable and biocompatible optical probes for *in vivo* animal imaging. *Nanotechnology* 2012;23(24):245701.
- [4] Chen JF, Ding HM, Wang JX, Shao L. Preparation and characterization of porous hollow silica nanoparticles for drug delivery application. *Biomaterials* 2004; 25(4):723–7.
- [5] Wang D, Qian J, He S, Park JS, Lee KS, Han S, et al. Aggregation-enhanced fluorescence in PEGylated phospholipid nanomicelles for *in vivo* imaging. *Biomaterials* 2011;32(25):5880–8.
- [6] Wang D, Qian J, Qin W, Qin A, Tang BZ, He S. Biocompatible and photostable AIE dots with red emission for *in vivo* two-photon bioimaging. *Sci Rep* 2014;4(3): 4279.
- [7] Bharali DJ, Klejbor I, Stachowiak EK, Dutta P, Roy I, Kaur N, et al. Organically modified silica nanoparticles: A nonviral vector for *in vivo* gene delivery and expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci* 2005;102(32):11539–44.
- [8] Chen G, Qiu H, Prasad PN, Chen X. Upconversion nanoparticles: Design, nanotechnology, and applications in theranostics. *Chem Rev* 2014;114(10):5161–214.
- [9] Wang D, Zhu L, Chen JF, Dai L. Liquid marbles based on magnetic upconversion nanoparticles as magnetically and optically responsive miniature reactors for photocatalysis and photodynamic therapy. *Angew Chem Int Ed* 2016;55(36):10795–9.
- [10] Xing Y, Dai L. Nanodiamonds for nanomedicine. *Nanomedicine* 2009;4(2):207–18.
- [11] Wang D, Chen JF, Dai L. Recent advances in graphene quantum dots for fluorescence bioimaging from cells through tissues to animals. *Part Part Syst Charact* 2015;32(5):515–23.
- [12] Baker SN, Baker GA. Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. *Angew Chem Int Ed* 2010;49(38):6726–44.
- [13] Zhu S, Song Y, Zhao X, Shao J, Zhang J, Yang B. The photoluminescence mechanism in carbon dots (graphene quantum dots, carbon nanodots, and polymer dots): Current state and future perspective. *Nano Res* 2015;8(2):355–81.
- [14] Zhang H, Huang Y, Hu S, Huang Q, Wei C, Zhang W, et al. Fluorescent probes for “off-on” sensitive and selective detection of mercury ions and L-cysteine based on graphitic carbon nitride nanosheets. *J Mater Chem C* 2015;3(9):2093–100.
- [15] Yang ST, Cao L, Luo PG, Lu F, Wang X, Wang H, et al. Carbon dots for optical imaging *in vivo*. *J Am Chem Soc* 2009;131(32):11308–9.
- [16] Liu J, Zhu W, Yu S, Yan X. Three dimensional carbogenic dots/TiO₂ nanoheterojunctions with enhanced visible light-driven photocatalytic activity. *Carbon* 2014;79(1):369–79.
- [17] Zhang YQ, Ma DK, Zhang YG, Chen W, Huang SM. N-doped carbon quantum dots for TiO₂-based photocatalysts and dye-sensitized solar cells. *Nano Energy* 2013;2(5):545–52.
- [18] Jiang K, Sun S, Zhang L, Lu Y, Wu A, Cai C, et al. Red, green, and blue luminescence by carbon dots: Full-color emission tuning and multicolor cellular imaging. *Angew Chem Int Ed* 2015;54(18):5360–3.
- [19] Liu J, Liu Y, Liu N, Han Y, Zhang X, Huang H, et al. Metal-free efficient photocatalyst for stable visible water splitting via a two-electron pathway. *Science* 2015;347(6225):970–4.
- [20] Mirtchev P, Henderson EJ, Soheilnia N, Yip CM, Ozin GA. Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO₂ solar cells. *J Mater Chem* 2012;22(4):1265–9.
- [21] Wu ZL, Zhang P, Gao MX, Liu CF, Wang W, Leng F, et al. One-pot hydrothermal synthesis of highly luminescent nitrogen-doped amphoteric carbon dots for bioimaging from *Bombyx mori* silk-natural proteins. *J Mater Chem B* 2013;1(22):2868–73.
- [22] Qu D, Zheng M, Zhang L, Zhao H, Xie Z, Jing X, et al. Formation mechanism and optimization of highly luminescent N-doped graphene quantum dots. *Sci Rep* 2014;4(9):5294.
- [23] Devaraju MK, Honma I. Hydrothermal and solvothermal process towards development of LiMPO₄ (M = Fe, Mn) nanomaterials for lithium-ion batteries. *Adv Energy Mater* 2012;2(3):284–97.
- [24] Anastas PT, Warner JC. Principles of green chemistry. In: Green chemistry: Theory and practice. New York: Oxford University Press; 1998. p. 30.
- [25] Wang D, Zhu L, McCleese C, Bruda C, Chen JF, Dai L. Fluorescent carbon dots from milk by microwave cooking. *RSC Advances* 2016;6(47):41516–21.
- [26] Zhou J, Booker C, Li R, Zhou X, Sham TK, Sun X, et al. An electrochemical avenue to blue luminescent nanocrystals from multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs). *J Am Chem Soc* 2007;129(4):744–5.
- [27] Li Y, Zhao Y, Cheng H, Hu Y, Shi G, Dai L, et al. Nitrogen-doped graphene quantum dots with oxygen-rich functional groups. *J Am Chem Soc* 2012;134(1):15–8.
- [28] Dong Y, Shao J, Chen C, Li H, Wang R, Chi Y, et al. Blue luminescent graphene quantum dots and graphene oxide prepared by tuning the carbonization degree of citric acid. *Carbon* 2012;50(12):4738–43.
- [29] Resch-Genger U, Grabolle M, Cavaliere-Jaricot S, Nitschke R, Nann T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat Methods* 2008;5(9):763–75.
- [30] Wang D, Zhu L, Chen JF, Dai L. Can graphene quantum dots cause DNA damage in cells? *Nanoscale* 2015;7(21):9894–901.
- [31] Qian J, Wang D, Cai FH, Xi W, Peng L, Zhu ZF, et al. Observation of multipho-

- ton-induced fluorescence from graphene oxide nanoparticles and applications in *in vivo* functional bioimaging. *Angew Chem Int Ed* 2012;51(42):10570–5.
- [32] Shi L, Li Y, Li X, Wen X, Zhang G, Yang J, et al. Facile and eco-friendly synthesis of green fluorescent carbon nanodots for applications in bioimaging, patterning and staining. *Nanoscale* 2015;7(16):7394–401.
- [33] Sun H, Zhang J, Zhang KY, Liu S, Liang H, Lv W, et al. Development of two-channel phosphorescent core-shell nanoprobe for ratiometric and time-resolved luminescence imaging of intracellular oxygen levels. *Part Part Syst Charact* 2015;32(1):48–53.
- [34] Orte A, Alvarez-Pez JM, Ruedas-Rama MJ. Fluorescence lifetime imaging microscopy for the detection of intracellular pH with quantum dot nanosensors. *ACS Nano* 2013;7(7):6387–95.