

基于碳化聚合物点的荧光量子产率创新实验设计

吴成琳, 陈恺昕, 王馨, 余蓉*, 谢欣*, 范雨*

成都中医药大学, 医学技术学院, 四川 成都

收稿日期: 2023年8月2日; 录用日期: 2023年8月30日; 发布日期: 2023年9月6日

摘要

本研究将碳化聚合物点的最新科研成果转化为实验教学内容, 设计了“基于碳化聚合物点的荧光量子产率创新实验”。具体实验以聚乙烯亚胺为原料, 通过“自下而上”一步水热法合成了一种具有高荧光量子产率的碳化聚合物点(CPDs), 利用透射电子显微镜、荧光分光光度计和紫外分光光度计进行表征。同时考察了“一点法”和“比较法”两种方法对CPDs荧光量子产率的测定, 并得出“比较法”测定更为准确的结论。本实验的开展, 有利于加深学生对荧光产生机制的理解, 深化对仪器组成部件的认知, 提高实验数据处理、分析解决问题的能力, 切实改善荧光分析实验教学质量。

关键词

碳化聚合物点, 实验教学, 荧光量子产率, 仪器分析

Innovative Experimental Design of Fluorescence Quantum Yield Based on Carbonized Polymer Dots

Chenglin Wu, Kaixin Chen, Xin Wang, Rong Yu*, Xin Xie*, Yu Fan*

College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu Sichuan

Received: Aug. 2nd, 2023; accepted: Aug. 30th, 2023; published: Sep. 6th, 2023

Abstract

In this study, the latest scientific research results of carbonized polymer dots were transformed

*通讯作者。

文章引用: 吴成琳, 陈恺昕, 王馨, 余蓉, 谢欣, 范雨. 基于碳化聚合物点的荧光量子产率创新实验设计[J]. 教育进展, 2023, 13(9): 6500-6507. DOI: 10.12677/ae.2023.1391012

into experimental teaching content, and the “Innovative experiment of fluorescence quantum Yield based on carbonized polymer dots” was designed. Carbonized polymer dots (CPDs) with high fluorescence quantum yield were synthesized from polyethyleneimine by bottom-up hydrothermal method. They were characterized by transmission electron microscopy, fluorescence spectrophotometer and ultraviolet spectrophotometer. At the same time, the determination of fluorescence quantum yield of CPDs by “one point method” and “comparison method” is investigated, and the conclusion that “comparison method” is more accurate is obtained. The implementation of this experiment is conducive to deepening students’ understanding of the mechanism of fluorescence generation, deepening their cognition of the components of the instrument, improving the ability of experimental data processing, analysis and problem solving, and effectively improving the quality of fluorescence analysis experiment teaching.

Keywords

CPDs, Experimental Teaching, Fluorescence Quantum Yield, Instrumental Analysis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

实验教学是培养本科生创新能力的重要环节。目前，仪器分析实验教学以经典的验证型项目为主，少量的设计型和综合型项目一方面对学生的理论和技能综合能力的培养支撑不足，另一方面没有与当今分析技术发展的热点相结合，亟需在创新性和实践设计能力上提升教学质量。近年来，学校及学院各种学术科研平台和团队高速发展，各种高水平论文和科研成果层出不穷，但其学术科研价值无法及时在本科生教育中得以充分体现。科研反哺教学是解决上述问题的一个重要方式，可以克服教学、科研分立的情况，让两者能相互促进、支撑。本文依托教师科研项目，借助仪器分析教学中荧光分析法这一部分内容，设计了基于新型纳米材料碳化聚合物点的荧光量子产率创新实验。

碳化聚合物点(CPDs)，是一类具有独特聚合物/碳杂化结构和性质的新兴 CDs [1]，由交联单体或线型聚合物通过共轭或非共轭作用组成，通常是指以官能团丰富的有机小分子或聚合物为原料，通过自下而上的合成方法，经聚合、交联、脱水和碳化形成较小粒径、单分散的、具有荧光特性的碳基纳米材料 [2] [3]。CPDs 不仅具有传统碳化 CDs 的优异光学性能，还保留了聚合物的性能[4] [5] [6]。通常，CPDs 具有高氧/氮含量、显著的水溶解度和可调节的光学性能，这归因于它们的聚合物/碳杂化结构和特殊的光致发光机理。由于其具有特殊的有机无机杂化结构[7]，CPDs 被赋予了許多独特的物理和化学性质。此外，由于其具有高荧光量子产率、良好的生物相容性和光稳定性，在传感、生物成像、药物输送等众多领域都显示出巨大的应用潜力。Ding 等[8]提出以 PEI 为唯一前驱体，通过热解法合成 CPDs，将其作为组成荧光传感器的碳基纳米材料，实现对甲硝唑的灵敏和选择性检测；Zhu [9]等以聚乙烯醇、多糖、纤维素和淀粉为原料，利用一步水热法得到具有极高生物相容性、低毒性的聚合物纳米粒子，并成功应用于生物成像；Consoli 等[10]以聚异丙基丙烯酰胺为原料，合成了一种可用于光热控制姜黄素释放的 CPDs-PNM，能够有效减少药物副作用，在药物传递方面较大的应用前景。

本文根据前期科研成果，设计了碳化聚合物点的制备及荧光量子产率的测定综合实验。以聚乙烯亚胺(Polyethyleneimine, PEI)为原料，采用高温高压的反应一锅法合成 CPDs。CPDs 的光致发光主要来源于

表面态, 分子态和交联增强发射(CEE)效应, 特别是分子态和 CEE 效应贡献了主要的光学性质[11]。采用紫外光谱和荧光光谱对合成的 CPDs 材料进行了表征, 选取硫酸奎宁作为标准参比物质采用比较法对合成材料的荧光量子产率进行了测定。

2. 实验原理

荧光量子产率(Φ)是荧光物质受激发后所吸收的光子数与通过荧光发射的光子数的比值。并且它也是体现一个物质荧光特征的重要参数, 其数值越大, 荧光物质的荧光越强, 但数值大小根据定义一般最大不超过 1。因此, 实验测定 Φ 是表征荧光分子和材料的关键步骤。目前, 荧光量子产率的测量方法有两种, 分别为“绝对法”和“相对法”[12]。其中绝对法是直接测量荧光材料的荧光量子产率不需要参比物, 但是需要复杂的仪器, 对技术要求高, 测试成本昂贵, 不利于平常对荧光量子产率的检测。而相对法主要依赖于来自待测物质的荧光信号与来自已知 Φ 标准参比物质的信号之间的比较, 通过紫外吸收光谱和荧光发射光谱, 测定标准品和样品在激发波长处的吸光度和发射光谱的面积, 通过公式计算即可得出样品的量子产率。相对量子产率的测定方法又可分为“一点法”和“比较法”[13]。

“一点法”是通过分别检测标准参比物质与待测物质的积分荧光强度(即校正荧光光谱所包括的面积)以及在相同激发波长下的入射光的吸光度, 带入下列公式即可求出待测样品的量子产率:

$$\Phi_X = \frac{F_X A_{ST}}{F_{ST} A_X} \Phi_{ST} \quad (1)$$

公式(1)中 Φ 是量子产率, F 是积分荧光强度, A 是相同激发波长的入射光的吸光度, ST 代表标准物质, X 代表待测物质。

“比较法”, 又称为“稀溶液荧光比较法”, 是通过配制一系列已知荧光量子产率的标准物质和待测物质的稀溶液, 使得它们在某一波长处的紫外可见吸光度呈梯度。测试在相同波长下的激发光所产生的荧光发射峰并对峰面积积分, 以积分面积对吸光度做线性拟合, 量子产率为:

$$\Phi_X = \Phi_{ST} \left(\frac{k_X}{k_{ST}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{ST}^2} \right)$$

上式中 ST 、 X 分别代表标准物质和待测物, Φ 、 k 、 η 分别是荧光量子产率、待测物和标准物质线性拟合直线的斜率、折光率。在配制稀溶液的过程中, 若采用 10 mm 光程的比色皿, 则需要确保所配溶液吸光度在 0.01~0.10 之间, 在此区间荧光化合物的发射光强度与溶液浓度成正比关系, 所测量得出的荧光量子产率更为准确, 另外也可尽量避免因浓度过大而出现自吸收效应影响其量子产率的测定。

本实验合成的 CPDs 所使用的原料为聚乙烯亚胺, 它是一种含有大量氨基的阳离子水溶性聚合物, 具有较高的正电荷、良好的水溶性和生物相容性。通过实验发现利用 PEI 所制备的 CPDs 激发波长在 340 nm, 发射波长范围为 380~600 nm。而常用的荧光量子产率标准物质硫酸奎宁在 0.1 mol/L H_2SO_4 中的量子产率为 54% [14], 激发波长为 350 nm, 发射波长范围为 400~600 nm, 与本实验所合成的 CPDs 的激发波长与发射波长范围大致相同, 并且由于 CPDs 溶剂为超纯水, 与 0.1 mol/L H_2SO_4 折光率基本一致, 因此选择硫酸奎宁作为标准荧光物质。本实验将通过“一点法”和“比较法”对 CPDs 的荧光量子产率进行测定, 并比较两种不同方法所得出的结果。

3. 实验

3.1. 主要试剂与仪器

1) 试剂

聚乙烯亚胺购于(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司), 硫酸奎宁购买自阿拉丁实业公司(中国, 上海), 所有试剂均为分析纯, 实验过程中均使用超纯水。

2) 仪器

采用 F97Pro 荧光分光光度计(四川省科学器材公司)对荧光光谱进行采集; 采用紫外可见分光光度计(A580, 中国上海翱艺仪器有限公司)测试样品的紫外可见吸收光谱。

3.2. 碳化聚合物点的制备

采用水热法一步合成 CPDs: 将 PEI 加入超纯水中, 搅拌 10 min 混合均匀后, 将溶液转移到聚四氟乙烯内衬的高压反应釜中, 160°C 下加热反应, 待高压反应釜自然冷却至室温。将得到的黄色液体用 3500 Da 透析袋透析一天。将透析后的液体放入 4°C 冰箱冷冻保存备用。

3.3. 荧光量子产率的测定

配制 CPDs 溶液与硫酸奎宁(0.1 mol/L H_2SO_4)标准溶液, 使其在荧光激发光 340 nm 处对应吸光度值分别为 0.007、0.015、0.03、0.045、0.06, 扫描 CPDs 溶液与硫酸奎宁溶液的荧光光谱, 并记录下积分的荧光强度(即荧光光谱的面积)。绘制积分荧光强度与吸光度的关系图, 获得斜率 k 。将数据带入“比较法”的公式中, 计算 CPDs 相对量子产率。

4. 结果与讨论

4.1. 碳化聚合物点的微观结构

利用透射电子显微镜(TEM)对 CPDs 的微观结构进行了分析, 其结果如图 1 所示, 从图中可以直观地看到, 合成的 CPDs 具有良好的分散性和近于球形的形状, 颗粒直径约为 50 nm。

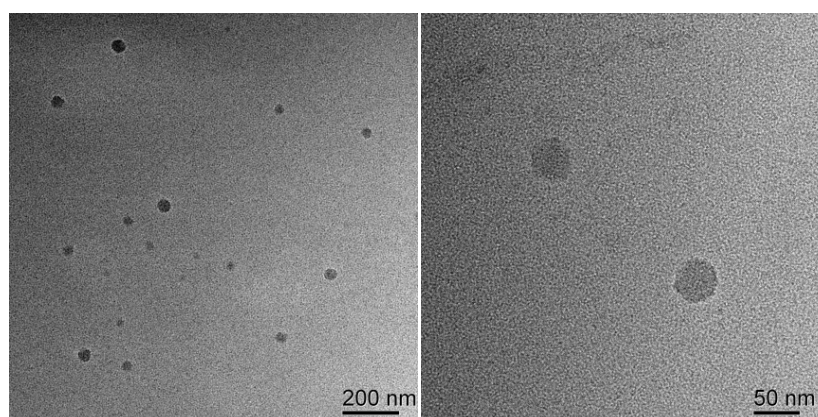


Figure 1. Transmission electron microscopy of CPDs at different scales

图 1. CPDs 在不同比例尺下的透射电子显微镜图

4.2. 碳化聚合物点的光学性能

用紫外照射仪 365 nm 的紫外光照射 CPDs, 观察材料荧光强度、颜色。使用紫外可见分光光度计扫描吸收光谱, 找到最大吸收波长 $\lambda = 369$ nm (如图 2)。然后将最大吸收波长设为 CPDs 的激发波长, 使用荧光分光光度计扫描得到 CPDs 的发射光谱, 确定最大发射波长 $E_m = 465$ nm。最后扫描得到 CPDs 的激发光谱, 确定最大激发波长 $E_x = 340$ nm。由此, 便得到了 CPDs 的最大发射波长与最大激发波长。根据最大发射波长和最大激发波长(如图 3), 计算得到 CPDs 的斯托克斯位移为 125 nm。

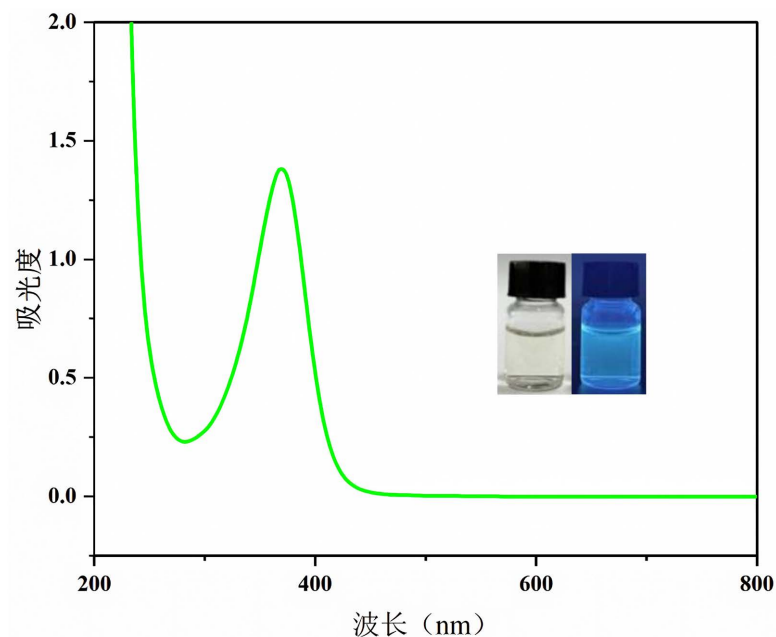


Figure 2. UV-vis absorption spectrum of CPDs; Inset: the photograph of the CPDs under the visible light (left) and UV light of 365 nm (right)

图 2. CPDs 吸收光谱; 插图: CPDs 在自然光下(左)和 365 nm 紫外光下(右)

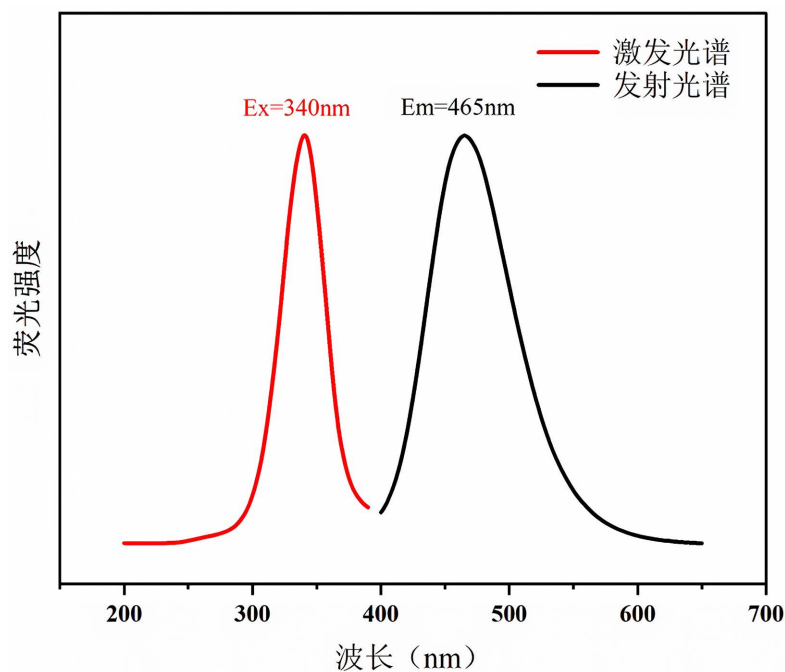


Figure 3. Fluorescence excitation and emission spectra of CPDs

图 3. CPDs 激发光谱与发射光谱

4.3. 标准参比硫酸奎宁稀溶液和待测物 CPDs 稀溶液的积分面积

分别扫描不同浓度标准参比硫酸奎宁稀溶液和待测物 CPDs 稀溶液的荧光光谱, 利用荧光仪自带的软件 FL Solutions 2.0 读出发射光谱积分面积并进行记录, 结果如表 1 所示。

Table 1. The standard reference is the integral area of the dilute solution of quinine sulfate and the dilute solution of CPDs
表 1. 标准参比硫酸奎宁稀溶液和待测物 CPDs 稀溶液的面积

硫酸奎宁稀溶液		CPDs 稀溶液	
吸光度	积分面积	吸光度	积分面积
0.007	106786.98	0.007	15640.40
0.015	203673.56	0.015	22951.62
0.030	364502.97	0.030	35879.31
0.045	536518.10	0.045	44139.76
0.060	734155.40	0.060	54685.05

4.4. 待测物 CPDs 量子产率的计算

根据表 1 所记录的实验数据, 即可得到积分荧光强度与吸光度的关系图(如图 4)。由于 CPDs 溶剂为超纯水, 与 0.1 mol/L H₂SO₄ 折光率基本一致约为 1.33, 因此可将两种溶剂的折光率, 图 4 中两条直线的斜率以及硫酸奎宁的量子产率 54% 代入“比较法”中计算得到 CPDs 相对量子产率为 3.31%。

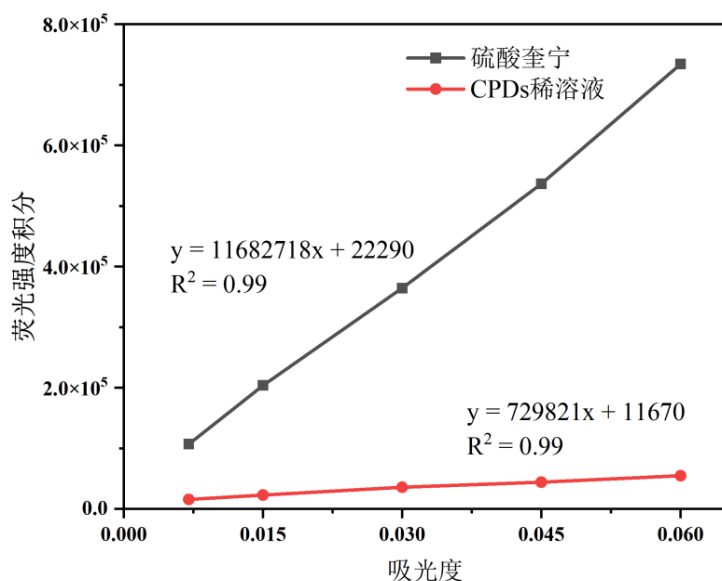


Figure 4. Quinine sulfate and CPDs fluorescence intensity integral versus absorbance curve

图 4. 硫酸奎宁和 CPDs 荧光强度积分对吸光度曲线图

4.5. “一点法”计算待测物 CPDs 的量子产率

将数据带入“一点法”计算得到 CPDs 相对量子产率分别为 7.91%、6.15%、5.32%、4.44%、4.02%, 可以看出在不同吸光度下, 采用“一点法”计算得出的量子产率差距甚大。所以, “一点法”测试虽然更简单, 但准确性远远不如“比较法”。

5. 结论

本实验在前期科研成果的基础上, 以聚乙烯亚胺为原料, 通过一步水热法, 成功合成了一种碳聚合化合物点。利用 TEM 对 CPDs 的微观结构进行了表征以及研究其光谱性质之后, 以硫酸奎宁为标准物质,

采用“比较法”测试待测样品的荧光量子产率，并与“一点法”进行比较。通过对比两种不同方法计算得到的实验结果显示，相较于实验操作更为简便的“一点法”，“比较法”的准确性更高，利于后续实验相关荧光量子产率的测定。

实验过程中，同学们学会了掌握荧光分光光度计、紫外分光光度计、真空干燥箱、电热恒温干燥箱等仪器的使用方法，提高了实验操作技能；数据处理软件 origin 的学习，提高了数据处理能力；除此之外，通过本次实验探索了荧光激发光谱与发射光谱的关系、发射强度与溶液浓度、性质等的关系，深入理解了荧光产生机制、荧光量子产率、斯托克斯位移等晦涩难懂的概念，掌握了荧光量子产率的不同计算方法。与此同时，同学们进行自主学习、合作学习、研究性学习，有利于培养其创新意识、科研基础、实际工作能力。该综合创新性实验完全由学生自主查阅相关文献、设计实验方案、整理实验结果、总结实验结论完成，极大地拓宽了本科生的专业知识和专业素养。将教师科研项目与本科生实验教学相结合，在创新型实验项目完成过程中，改变了传统的以验证性为主的本科实验课的旧模式，构建起以学生为主体、体现自主性和设计性的实验教学方法。

基金项目

四川省自然科学基金项目(2022NSFSC1475)；成都中医药大学 2021 年度校级教学质量工程建设重点项目(ZLGC202136)；成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划(MPRC2022027)；国家级“大学生创新创业计划”(202210633029)；成都中医药大学 2022-2023 年大学生科研实践创新课题(ky-2023101)。

参考文献

- [1] 上官炬, 郭汉贤. 氧化铝基催化剂上二硫化碳水解反应性的研究[J]. 燃料化学学报, 1997, 25(3): 277-283.
- [2] 管仁田. 基于碳化聚合物点构建新型荧光传感分析法[D]: [硕士学位论文]. 聊城: 聊城大学, 2022. <https://doi.org/10.27214/d.cnki.glcsu.2022.000243>
- [3] Lu, S., Sui, L., Liu, J., et al. (2017) Near-Infrared Photoluminescent Polymer-Carbon Nanodots with Two-Photon Fluorescence. *Advanced Materials*, **29**, Article ID: 1603443. <https://doi.org/10.1002/adma.201603443>
- [4] Chen, Z.H., Han, X.Y., Lin, Z.Y., et al. (2019) Facile Reflux Synthesis of Polyethyleneimine-Capped Fluorescent Carbon Dots for Sequential Bioassays toward Cu²⁺/H₂S and Its Application for a Logic System. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, **66**, 426-433. <https://doi.org/10.1002/bab.1739>
- [5] Lu, S., Xiao, G., Sui, L., et al. (2017) Piezochromic Carbon Dots with Two-Photon Fluorescence. *Angewandte Chemie*, **129**, 6283-6287. <https://doi.org/10.1002/ange.201700757>
- [6] Xia, C., Zhu, S., Feng, T., et al. (2019) Evolution and Synthesis of Carbon Dots: From Carbon Dots to Carbonized Polymer Dots. *Advanced Science*, **6**, Article ID: 1901316. <https://doi.org/10.1002/advs.201901316>
- [7] Chen, Z.H., Han, X.Y., Deng, L.X., et al. (2019) A Self-Calibrating Logic System and Oxidase-Based Biosensor Using Tb³⁺-Doped Carbon Dots/DNA Conjugates. *Talanta*, **191**, 235-240. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.035>
- [8] Yang, S., Wang, L., Zuo, L., et al. (2019) Non-Conjugated Polymer Carbon Dots for Fluorometric Determination of Metronidazole. *Microchimica Acta*, **186**, Article No. 652. <https://doi.org/10.1007/s00604-019-3746-5>
- [9] Zhu, S., Zhang, J., Wang, L., et al. (2012) A General Route to Make Non-Conjugated Linear Polymers Luminescent. *Chemical Communications*, **48**, 10889-10891. <https://doi.org/10.1039/c2cc36080b>
- [10] Consoli, G.M.L., Giuffrida, M.L., Satriano, C., et al. (2022) A Novel Facile One-Pot Synthesis of Photothermally Responsive Carbon Polymer Dots as Promising Drug Nanocarriers. *Chemical Communications*, **58**, 3126-3129. <https://doi.org/10.1039/D1CC06530K>
- [11] Liu, J., Li, R. and Yang, B. (2020) Carbon Dots: A New Type of Carbon-Based Nanomaterial with Wide Applications. *ACS Central Science*, **6**, 2179-2195. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01306>
- [12] 赛默飞世尔科技. 赛默飞世尔荧光分光光度计应用指南——使用 Lumina 测定罗丹明 B 荧光量子产率测量 [EB/OL]. <https://www.thermofisher.com/search/results?query=Lumina&persona=DocSupport&navId=0&resultPage=1&resultsP>

[erPage=15&refinementAction=true&focusarea=%E6%90%9C%E7%B4%A2%E5%85%A8%E9%83%A8&sort=](#),
2019-03-02.

- [13] 王娜, 杨洪, 王良臣, 等. 荧光量子效率测定的综合实验设计[J]. 实验科学与技术, 2020, 18(3): 109-113+139.
- [14] Melhuish, W.H. (1961) Quantum Efficiencies of Fluorescence of Organic Substances: Effect of Solvent and Concentration of the Fluorescent Solute. *The Journal of Physical Chemistry*, **65**, 229-235. <https://doi.org/10.1021/j100820a009>