

可乐碳量子点的提取及其抑菌性研究

陈巧玲¹, 陈碧桑², 李飞明³, 游雨婷¹, 吴秀婷¹

(1. 闽南师范大学生物科学与技术学院, 福建漳州 363000)

(2. 闽南师范大学化学与环境学院, 福建漳州 363000) (3. 厦门大学化学与化工学院, 福建厦门 361005)

摘要: 本研究首次采用浓缩、透析的方法直接从可口可乐中获得碳量子点, 并通过透射电镜、紫外分光光度计、红外光谱及荧光分光光度计等方法对其结构进行表征, 通过微生物方法对其抑菌性进行研究。结果表明, 可乐碳量子点粒度分布窄, 单分散性好, 表面富含羟基和羧基, 溶解度高, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌等单细胞生物并无抑制效果。另外发现, 当可乐碳量子点浓度大于等于 100 mg/L 时, 大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的培养基孔洞附近菌落明显增多, 可见碳量子点有利于这两种菌的生长, 而对其余三种菌并没有明显的影响。本研究所得结果对进一步拓宽碳量子点的合成途径以及可乐碳量子点的后期应用具有重要意义。

关键词: 碳量子点; 可口可乐; 浓缩; 透析; 荧光; 抑菌

文章编号: 1673-9078(2018)01-52-56

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.009

Extraction and Antibacterial Activity of Coca-Cola Carbon Quantum Dots

CHEN Qiao-ling¹, CHEN Bi-sang², LI Fei-ming³, YOU Yu-ting¹, WU Xiu-ting¹

(1. College of Biological Science and Biotechnology, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China) (2. College of Chemistry and Environment, Minnan Normal University, Zhangzhou 363000, China) (3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The carbon quantum dots (CDs) were obtained from Coca-Cola directly by concentration and dialysis for the first time in this study. The structure of CDs was characterized by transmission electron microscopy (TEM), ultraviolet spectrophotometer (UV), infrared spectroscopy (IR) and fluorescence spectrophotometer, and the antibacterial activity was investigated by microorganism method. The results showed that CDs had a narrow particle size distribution and a good monodispersity, and the surface was rich in hydroxyl and carboxyl groups, which made it have a high solubility. The CDs have no inhibitory effect on single cell organisms such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. In addition, the colonies of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were significantly increased near the pore of culture medium when the concentration of CDs was greater than or equal to 100 mg/L, suggesting that CDs were beneficial to their growth but had no significant effect on the other three kinds of bacteria. The results obtained in this study were of great significance for further expanding the synthesis pathway of CDs and the later applications.

Key words: carbon quantum dots; coca-cola; concentration; dialysis; fluorescence; antibacterial

碳量子点由碳元素构成, 而碳元素是生命体最重要的组成元素之一, 生命体基本结构物质的主要骨架如氨基酸和核苷酸等都是由碳元素组成的。因此, 由碳元素构成的量子点是一类生物毒性低的半导体纳米颗粒。近年来, 因碳量子点 (CDs) 具有良好的生物相容性, 稳定的荧光特性, 抗光漂白以及激发荧光发射等特性, 大大的吸引了研究学者的兴趣^[1,2]。此外,

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 福建省教育厅 A 类项目 (JAT160289)

作者简介: 陈巧玲 (1986-), 女, 实验师, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 陈碧桑 (1987-), 女, 实验师, 硕士研究生, 研究方向: 分析化学

因 CDs 表面富含多种官能团如: 羧基、羟基和羰基等, 这些基团不仅可以作为 CDs 参与化学反应的位点, 而且也通过这些位点对 CDs 进行修饰, 从而使它具有的化学特性^[3,4]。基于这些特性, CDs 可用于传感器^[5,6]、光催化^[7]、敏化剂^[8]、生物成像^[9-11]、白光发光二极管^[3,12]、药物或者基因载体^[13]等领域。因此, 如何通过简单、绿色、高效的方法制备无毒、粒径、形貌均一的高质量的 CDs, 并研究它的性质依然是个重要的课题。

迄今为止, CDs 合成主要有两种方法: 自上而下以及自下而上。典型的自上而下方法有电弧放电法^[14]、激光剥蚀法^[15]、电化学法^[7]和水热处理法^[16]等合成方法。自下而上的方法主要将小分子碳通过化学手

段合成碳量子点。主要有化学氧化法^[17]、高温热解法^[18]和微波法^[19]等。碳量子点迄今为止多为合成,且每种方法均各有优缺点,不经化学反应直接获取碳量子点的方法鲜见报道。本文开创了一种以可乐为原材料通过透析直接获得碳量子点的方法,与传统合成方法相比,所得的碳量子点表面富含羟基、羧基等官能团,具有良好的单分散性、溶解度高、容易进行后续改性和应用。本文还重点探索了 CDs 材料对多种菌的抑制作用,以期更直观的观察其细胞毒性。从可乐中提取 CDs 步骤简单,无毒,原料易得无需复杂的仪器设备及实验技巧,可以随时随地制备碳量子点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器

紫外分光光度计(岛津 UV-2550); 荧光分光光度计(Varian Cary Eclipse, Ex slit 5 nm, Em slit 5 nm); 红外光谱仪(Thermo Fisher 6700); 透射电镜(FEI Tecnai-G2-F30 Transmission); HH-6 恒温水浴锅(金坛市鸿科仪器厂); E240 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); pHs-3B 酸度计(梅特勒-托利多仪器有限公司); RE-52AA 旋转蒸发仪(上海亚荣); YXQ-LS-75G 灭菌锅(上海博讯); SW-CJ-1FD 超净工作台(苏净安泰); ZWY-240 旋转摇床(上海智城); ALPHA1-2 LD-PLUS 冻干机(德国 CHRIST)。

1.1.2 培养基与供试菌种

(1) 实验用水为超纯水 18.2 MΩ(MILLIPORE), 去离子水(MILLIPORE), 可口可乐(购买于漳州市新华都超市), 1 ku 透析膜(美国进口, 联合碳化), 75%酒精(西陇化工)。

(2) 培养基(厂家均为北京路桥): 营养琼脂(蛋白胨 10 g、牛肉膏 3 g、氯化钠 5 g、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1000 mL、pH 7.2~7.4, 121 °C 灭菌 15 min)、LB 培养基(胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L、pH 7.0, 121 °C 灭菌 15 min)、普通肉汤(蛋白胨 20 g、牛肉粉 5 g、氯化钠 5 g、pH 7.5±0.1, 121 °C 灭菌 15 min)、10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤(胰蛋白胨 17 g、大豆蛋白胨 3 g、氯化钠 100 g、磷酸氢二钾 2.5 g、葡萄糖 2.5 g、丙酮酸钠 10 g、pH 7.3±0.2, 121 °C 灭菌 15 min)、察氏液体培养基(硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、蒸馏水 1000 mL、pH 6.8±0.2, 121 °C 灭菌 15 min)、察氏固体培养基(硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30

g、琼脂 20 g 蒸馏水 1000 mL、pH 6.8±0.2, 121 °C 灭菌 15 min)、马铃薯培养基(马铃薯粉 6.0 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1000 mL、pH 5.6±0.2, 121 °C 灭菌 15 min)。

(3) 菌种(广东省微生物菌种保藏中心): GIM 1.559 大肠杆菌(*Escherichia coli*)、GIM 1.221 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、GIM 2.194 白色念珠菌(*Candida albicans*)、GIM 1.977 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、GIM 1.843 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

1.2 可乐碳量子点的提取

将 1.25 L 可口可乐通过旋转蒸发仪蒸发浓缩至 100 mL 左右, 采用 1 ku 透析膜透析 24 h, 其中每间隔约 3 h 更换一次蒸馏水, 直至透析结束, 将透析袋内溶液再次浓缩至约 50 mL 经冻干机冻干为碳量子点。

1.3 结构表征

将提取所得碳量子点采用透射电镜扫描、荧光分光光度计、紫外分光光度计和红外光谱仪进行结构表征。

1.4 抑菌实验

1.4.1 菌种活化及菌液制备

将冷冻保存的菌种与 100 mL 各菌种所需的液体培养基进行混合, 37 °C、200 r/min 摇床培养 24 h, 血球计数板计数各菌液浓度。

其中, 大肠杆菌液体培养基使用普通肉汤培养基, 固体培养基使用 LB 培养基; 金黄色葡萄球菌液体培养基使用 10%氯化钠胰酪胨大豆肉汤, 固体培养基使用营养琼脂; 白色念珠菌液体培养基使用改良马丁液体培养基, 固体培养基使用改良马丁固体培养基; 枯草芽孢杆菌液体培养基使用普通肉汤培养基, 固体培养基使用营养琼脂; 铜绿假单胞菌液体培养基使用 LB 培养基, 固体培养基使用营养琼脂。

1.4.2 预加菌液法倒平板

分别将 1 mL 供试指示菌液注入已冷却至 50 °C 左右的培养基中, 混匀, 倒约 20 mL/平板, 水平静置凝固后备用。制得 1×10⁶ CFU/mL 备用。

1.4.3 抑菌材料试验浓度

将碳量子点配制成 2 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、40 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、500 mg/L 和 1000 mg/L 等浓度进行试验。

1.4.4 打孔法抑菌圈试验

打孔法: 用已灭菌的打孔器在试验平板上打孔,

小心挑去培养基小块以做成 6 mm 左右圆孔, 往孔中注入 80 μL 各种浓度的碳量子点溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预扩散 2 h, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 24 h, 测定抑菌圈大小。

1.4.5 抑菌圈大小测量

用游标卡尺十字交叉法测量抑菌圈直径, 以表示抑菌圈的大小。

2 结果与讨论

2.1 电镜扫描、紫外、红外及荧光光谱

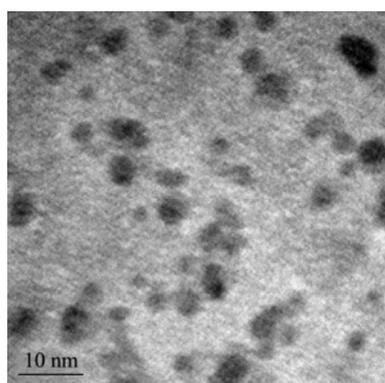


图1 电镜下碳量子点形态
Fig.1 TEM image of CDs

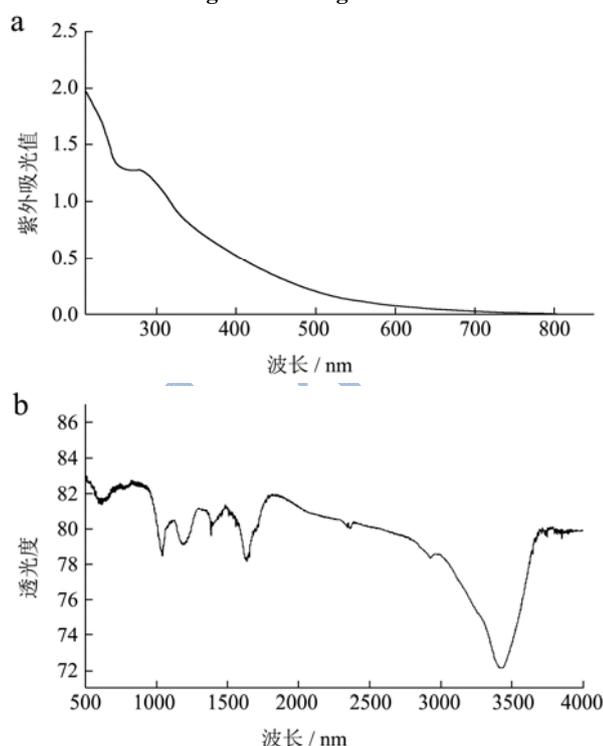


图2 可乐碳量子点的紫外光谱 a 及红外光谱图 b

Fig.2 UV-Vis (a) and infrared spectrogram (b) of CDs

由图1可知, 可乐碳量子点粒度分布窄, 单分散性好(平均直径 3 nm), 为非结晶性物质。从图 2a 紫外吸收光谱可知, 可乐碳量子点的吸收范围较宽, 从

700 nm 开始有吸收, 在 280 nm 处有最大吸收峰。这主要是 CDs sp^2 区域的 $\pi-\pi^*$ 跃迁。图 2b 红外光谱对 3428.69 nm、3244.78 nm 分别为游离及缔合- NH_2 的特征吸收峰, 2923.91 nm 为亚甲基反对称伸缩振动的特征吸收峰; 在 1382 cm^{-1} 、1190 cm^{-1} 及 1040 cm^{-1} 对应的分别为不对称和对称伸缩振动的 C-O-C 峰, 1632.60 cm^{-1} 处为伸缩振动。说明表面有大量羟基及羧基的存在。因此, 这些基团对可乐碳量子点的改性与应用起到重要的作用。同时, 羟基以及羧基的大量存在使得碳量子点具有极强的溶解性, 冻干后极易吸潮。

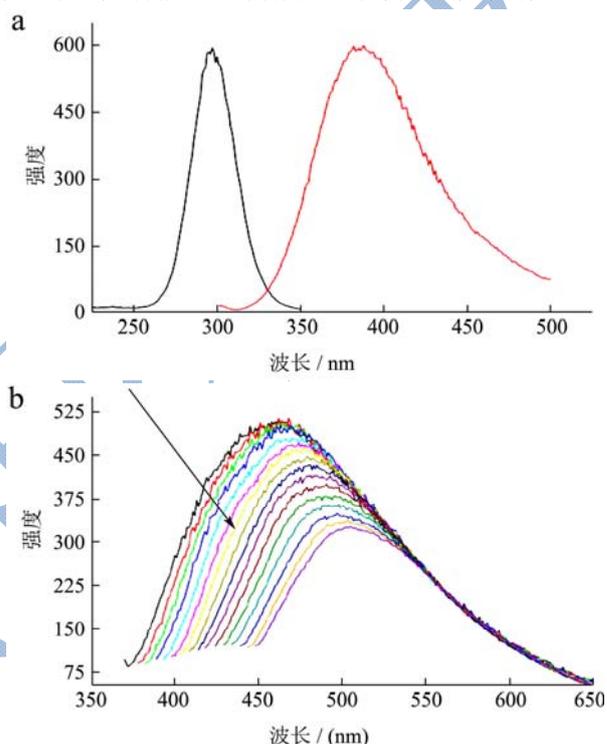


图3 可乐碳量子点的激发/发射光谱 a 及其波长依赖性发射 b

Fig.3 Excitation/emission spectra of CDs (a), wavelength-dependent emission of CDs (b)

从图 3a 可知, 可乐碳量子点的最大激发/发射波长分别为 295 nm/390 nm, 在 295 nm 光激发下可发射出 390 nm 的荧光。如图 3b 所示, 其发射具有明显的波长依赖性, CDs 随着激发波长的增大, 其荧光发射峰从 450 nm 红移至 520 nm。与此同时, 发射峰强度也逐渐减弱。产生这种现象的原因可能有以下两种: (1)不同尺寸的碳量子点纳米粒子对光的选择性存在差异; (2)由可乐碳量子点表面缺陷引起的, 也就是表面的发射空穴不同引起的。利用这些性质可以控制荧光发射。

2.2 不同浓度的碳量子点溶液对于多种常见菌的抑制效果

探讨浓度分别为 2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20

mg/L、40 mg/L、80 mg/L、100 mg/L、500 mg/L 和 1000 mg/L 的碳量子点溶液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌等 5 种常见菌的抑菌效果,发现碳量子点对这 5 种菌均无抑制效果,结果见表 1。CDs 溶液浓度高达 1000 mg/L 时仍对这五种菌无抑制效果,从侧面说明可乐碳量子点并没有细胞毒性,或者说生物毒性较低。

在细胞水平上,碳量子点的毒性已经得到多方面的研究。Liu 等^[20]采用甲硝唑为原料制备的碳量子点对牙龈卟啉单胞菌具有抑菌效果,推测所得的碳量子

点是否具有抑菌效果仅与合成或者提取 CDs 的原料有关。另外,通过表面修饰官能化的 CDs 大部分仍具有较低毒性,如 Ray 等人发现, HepG2 细胞在接触高达 100 $\mu\text{g/mL}$ 碳量子点后,细胞活力仍保持在 80% 左右^[21]。

如果用于碳量子点表面钝化的基团具有一定的毒性,合成后的碳量子点可能对细胞会带有一定的细胞毒性。如,用 PPEI-EI 钝化后的碳量子点具有较高的细胞毒性。

表 1 不同浓度碳量子点溶液的抑菌试验结果

Table 1 Results of antibacteria test with different concentrations of CDs

微生物	碳量子点溶液浓度/(mg/L)								
	2	5	10	20	40	80	100	500	1000
大肠杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
金黄色葡萄球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
铜绿假单胞菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+
白色念珠菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注:“+”菌落多,“-”无菌落。

2.3 不同浓度碳量子点溶液下供试菌的生长状况

起来。而其余三种菌并未出现相同情况。这是否因为大肠杆菌、金黄色葡萄球菌对于碳源敏感度高,所需的碳源比例较大,有待进一步探索。

3 结论

本文采用随处可见的可口可乐饮料为原料,通过简单的浓缩、透析直接获得可乐碳量子点,经电镜、紫外分光光度计、红外光谱及荧光分光光度计等手段表征了碳量子点的形态结构,通过微生物抑菌实验,探索了该碳量子点材料对常见革兰氏阴性、阳性细菌以及真菌的抑制效果。结果表明,提取的碳量子点并无抑制大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的功效。因此,从侧面说明可乐碳量子点具有较高的生物安全性。通过浓缩和透析方法获得的碳量子点荧光量子产率较低,会影响 CDs 在生物成像等方面的应用,这是后续研究中急需改善的地方,本研究不仅拓宽了碳量子点的获取手段,而且为可乐碳量子点后续的提取制备以及生物应用奠定了基础。

参考文献

- [1] Miao P, Han K, Tang Y, et al. Recent advances in carbon nanodots: synthesis, properties and biomedical applications [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(5): 1586-95
- [2] 李春风,王成彬,刘星元,等.发光碳量子点的合成与应用研

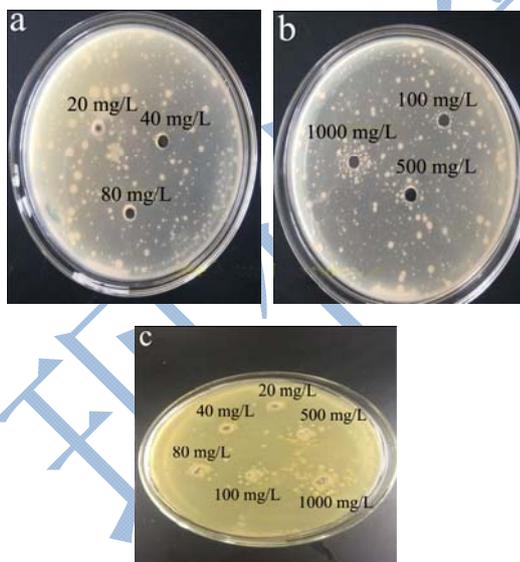


图 4 不同浓度碳量子点溶液对供试菌生长的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of CDs on the growth of bacterium

注: a,b 为金黄色葡萄球菌, c 为大肠杆菌

如图 4 所示,发现五种微生物中的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌,在 6 mm 孔洞附近,随着所加碳量子点溶液浓度达到 100 mg/L 后,孔周围的菌落明显密集

- 究进展[J].材料导报,2015,29(26):306-310
- LI Chun-feng, WANG Cheng-bin, LIU Xing-yuan, et al. Review on the progress of application and synthesis of carbon quantum dots [J]. *Materials Review*, 2015, 29(26): 306-310
- [3] Hu S, Trinchi A, Atkin P, et al. Tunable photoluminescence across the entire visible spectrum from carbon dots excited by white light [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54(10): 2970-4
- [4] Lin L P, Wang X X, Lin S Q, et al. Research on the spectral properties of luminescent carbon dots [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2012, 95(5): 555-61
- [5] Liu Y, Zhao Y, Zhang Y. One-step green synthesized fluorescent carbon nanodots from bamboo leaves for copper(II) ion detection [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, 196(2): 647-652
- [6] Cayuela A, Carrillo-Carrion C, Soriano M L, et al. One-step synthesis and characterization of N-Doped carbon nanodots for Sensing in organic media [J]. *Anal. Chem.*, 2016, 88(6): 3178-85
- [7] Li H, He X, Kang Z, et al. Water-soluble fluorescent carbon quantum dots and photocatalyst design [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49(26): 4430
- [8] Margraf J T, Lodermeier F, Strauss V, et al. Using carbon nanodots as inexpensive and environmentally friendly sensitizers in mesoscopic solar cells [J]. *Nanoscale Horiz.*, 2016, 1(3): 220-226
- [9] Shi L, Li Y, Li X, et al. Facile and eco-friendly synthesis of green fluorescent carbon nanodots for applications in bioimaging, patterning and staining [J]. *Nanoscale*, 2015, 7(16): 394-401
- [10] Chen B, Li F, Li S, et al. Large scale synthesis of photoluminescent carbon nanodots and their application for bioimaging [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(5): 1967-71
- [11] Goh E J, Kim K S, Kim Y R, et al. Bioimaging of hyaluronic acid derivatives using nanosized carbon dots [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(8): 2554-61
- [12] Li X, Liu Y, Song X, et al. Intercrossed carbon nanorings with pure surface states as low-cost and environment-friendly phosphors for white-light-emitting diodes [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2015, 54(6): 1759-64
- [13] Zheng M, Liu S, Li J, et al. Integrating oxaliplatin with highly luminescent carbon dots: an unprecedented theranostic agent for personalized medicine [J]. *Adv. Mater.*, 2014, 26(21): 3554-60
- [14] Xu X, Ray R, Gu Y, et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2004, 126(40): 12736-12737
- [15] Hu s, Nik, Sun J, et al. One-step synthesis of fluorescent carbonnanoparticles by laser irradiation [J]. *Mater. Chem.*, 2009, 19(4): 484-488
- [16] Peng H, Travassejdic J. Simple aqueous solution route to luminescent carbogenic dots from carbohydrates [J]. *Chemistry of Materials*, 2015, 21(23): 5563-5565
- [17] Liu H, Ye T, Mao C. Fluorescent carbon nanoparticles derived from candle soot [J]. *Angewandte Chemie*, 2007, 46(34): 6473-6475
- [18] Pan D, Zhang J, Li Z, et al. Observation of pH-, solvent-, spin-, and excitation-dependent blue photoluminescence from carbon nanoparticles [J]. *Chemical Communications*, 2010, 46(21): 3681-3
- [19] Zhu H, Yang X. Microwave synthesis of fluorescent carbon nanoparticles with electrochemiluminescence properties[C], 2009:5118
- [20] Liu J J, Lu S Y, Tang Q L, et al. One step hydrothermal synthesis of photoluminescent carbon nanodots with selectively antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(21): 7135
- [21] Ray S C, Saha A, Jana N R, et al. Fluorescent carbon nanoparticles: Synthesis, characterization, and bioimaging application [J]. *J Phys. Chem. C*, 2009, 113(43): 18546-18551.