

利用金針花製備螢光碳奈米點應用於生物成像

趙翊廷、胡焯淳、邱泰嘉

摘要

本篇首次使用金針花粉(*Hemerocallis fulva*, 0.2 g)和氫氧化鈉(sodium hydroxide, 0.1 M, 15 mL), 透過水熱法(240°C, 12 hr)合成發螢光的碳奈米點(carbon nanodots, CNDs)。此碳奈米點以 250 nm 波長激發, 最大放射波長為 384 nm; 其 UV 吸收在 255 nm, 螢光量子產率為 2.4%。另外, 所合成的碳奈米點具有良好的光穩定性、時間穩定性、pH 值穩定性和高耐鹽性。在金屬離子與農藥存在, 此碳奈米點的螢光不會有太大的變化。在 FT-IR 鑑定中此碳奈米點具有 O-H 官能基及 C=O 官能基, 讓此碳奈米點具有良好的水溶性, 並成功應用於豐年蝦及洋蔥表皮的生物成像。

關鍵詞：生物成像、螢光碳奈米點、金針花、水熱法

趙翊廷, 國立臺東大學應用科學系學生。E-mail: mayvivi14@gmail.com

胡焯淳, 國立臺東大學應用科學系教授。E-mail: cchu@nttu.edu.tw

邱泰嘉(通訊作者), 國立臺東大學應用科學系教授。E-mail: tcchiu@nttu.edu.tw

Synthesis of fluorescent carbon nanodots using *Hemerocallis fulva* as precursors for bioimaging

Yi-Ting Chao & Cho-Chun Hu & Tai-Chia Chiu

Abstract

The fluorescent carbon nanodots (CNDs) were synthesized from the powder (0.2 g) of *Hemerocallis fulva* with sodium hydroxide (0.1 M, 15 mL) for the first time through hydrothermal treatment (240 °C, 12 hr). The synthesized CNDs emitted blue fluorescence at 384 nm under excitation of 255 nm. The fluorescence quantum yield of the CNDs was 2.4%. The fluorescence intensity of the CNDs was very stable over a wide range of pH values (pH 2.0 ~ 12.0) and different concentrations of NaCl (0 ~ 3 M). The fluorescence intensity also showed almost no obvious variation under continuous UV light (365 nm) illumination for 1 h. With the identification by FTIR, there were hydroxyl and carbonyl groups on the surface of the CNDs. Finally, the CNDs have been applied for the bioimages of onion epidermis cells and brine shrimps.

Keywords: bioimage, fluorescent carbon nanodots, *Hemerocallis fulva*, hydrothermal

Yi-Ting Chao, Student, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: mayvivi14@gmail.com

Cho-Chun Hu, Professor, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: cchu@nttu.edu.tw

Tai-Chia Chiu (Corresponding Author), Professor, Department of Applied Science, National Taitung University. E-mail: tcchiu@nttu.edu.tw

壹、前言

螢光標記是生命科學研究過程中不可缺少的技術。發展高效率且穩定的螢光探針用於標記分析物尤為重要。探針的物理化學性質對於檢測分析物或成像扮演極為關鍵的角色。常用的傳統螢光探針主要是有機染料(Anderson et al., 2011)，並且廣泛應用於生物成像。使用有機染料作為探針的優點是成本低、易於取得和使用。然而，有機染料通常存在耐光性較差、具有生物毒性和生物相容性差等缺點。

近年來，奈米技術的迅速發展提供了一系列新型螢光探針(Walling, Novak & Shepard, 2009)。其中研究最廣泛的是半導體奈米晶體形成的量子點(quantum dots, QDs)，它具有優越的螢光特性，如：光漂白的高抗性，透過組成分子和尺寸大小可調控吸收和放射波長，較寬的吸收譜帶和較窄的發射譜帶等。儘管如此，含有鎘或其他重金屬的量子點，如：硒化鎘/硫化鋅(CdSe/ZnS)量子點，因為材料本身具有毒性的問題，其生物安全性引發不少疑慮，限制了其臨床應用研究(Yang, et al., 2009)。尋求更安全的量子點替代品成為奈米螢光探針研究中的新課題。第 IV 族奈米顆粒，包括：碳、矽和碳化矽等，具有化學惰性和良好的生物相容性，在生物成像領域已引起廣泛關注(Fan & Chu, 2010)。

在過去十年的研究中，由於碳源價格低廉、合成方法簡單、物理性質獨特和毒性極低，碳奈米點(carbon nanodots, CNDs)已成為替代傳統半導體量子點和有機染料的候選者。至今，已有非常多的文獻以不同的碳源和合成方法合成發螢光的碳奈米點，並應用於許多領域，例如：生物成像、感測器、催化、全彩顯示器和光電元件(Ding, Ji, Wei, Gao, Zhou & Xiong, 2017)。

根據文獻，不同方法所製備的碳奈米粒子粒徑皆小於 10 奈米，其螢光特性與半導體量子點相似，因此目前多以光致發光的機制解釋其發光原理(Wu et al., 2013; Cao et al., 2007; Sachdev, Matai, Kumar, Bhushan, Dubey & Gopinath, 2013)。在 2004 年以電弧放電方法合成單壁碳奈米管的實驗中意外發現碳奈米點(Xu et al., 2004)。從那時起

使用不同種類的前驅物合成 CNDs 的方法快速被開發，主要分為自上而下(top-down)和自下而上(bottom-up)的方法。在自上而下的方法中，透過電弧放電、雷射燒蝕和化學或電化學氧化將更大塊的材料分解成所需的奈米結構形成奈米顆粒；自下而上的方法中，CNDs 由不同的前驅物，透過燃燒、水熱和微波法合成。CNDs 的主要成分元素為碳、氫和氧；此外，摻雜雜原子，如：硼、氮和硫成為調控 CNDs 放光強度或是放光波段的方法(Cayuela, Carrillo-Carrión, Soriano, Parak & Valcárcel, 2016)。

大部分 CNDs 可被激發螢光波長範圍於 350-550 nm，放射波長範圍則約於 400-600 nm (Fu et al., 2007; Baker & Baker, 2010)。CNDs 的螢光強度相當穩定，即使連續六小時光照(Xe lamp)也不會造成螢光強度下降。另將其置於高鹽類環境或不同 pH 值溶液下螢光強度亦不易受到干擾。相較於金奈米點(Au nanodots, AuNDs)和銀奈米團簇(silver nanoclusters, AgNCs)之螢光奈米材料，皆易受到光照或合成環境改變而造成螢光強度的衰退，導致應用上的侷限(Huang, Yang, Lee & Chang, 2007; Zhao, Zhang, Huang, Peng, Zhang & Pang, 2008; Lan, Chen & Chang, 2011; Liu, Zhang, Tian, Li, Li & Liu, 2011; Wang, Qu, Xu, Ren & Qu, 2011; Yang et al, 2012)。

雖然目前 CNDs 的螢光量子產率仍比不上半導體量子點，但是這些半導體量子點具有高毒性，因此在生物體應用上多需要於表面修飾保護劑。然而，CNDs 為無毒性的奈米材料且擁有螢光穩定的特性，因此於生物顯影應用上極具潛力。另外，CNDs 具有優異的光學性能、良好的生物相容性、極佳的水溶性、低成本和合成簡單等優點，作為新穎的螢光奈米材料，具有巨大的應用潛力，例如：生物成像、光動力療法、催化和感測器。由於 CNDs 的獨特性質，亦可應用於生物細胞成像，如：癌症細胞成像、老鼠體外/體內成像和斑馬魚成像等

貳、文獻回顧

在此回顧了近幾年的文獻，包括：CNDs 應用於生物或細胞成像。螢光碳點因其水溶性佳、生物相容性好、低毒性和易於功能化等優點，使其在各種應用，如：能量轉換和儲存到生物醫學成像中，都具有極大的吸引力。

2015 年作者 Fengling Cui 教授團隊使用蔬菜作為唯一碳源(Niu, Liu, Li, Fu, Xu & Cui, 2015)，以水熱法合成了氮摻雜碳點(N-CD)，開發了一種簡單、綠色和低成本的方法。平均粒徑大小為 1.8 nm，激發波長為 380 nm，放射波長在 473 nm。此 N-CD 顯示出的螢光量子產率高達 37.5%，具有低的細胞毒性和優異的水溶性、生物相容性和穩定性。此碳點在體外和體內都具有很高的生物成像潛力，可應用於細胞成像。

2017 年作者 Wenlong Wei 和 Wen Liu 團隊使用玫瑰心蘿蔔利用水熱法合成高螢光的碳點(Liu, Diao, Chang, Wang, Li & Wei, 2017)，開發了一種簡單，綠色和低成本的方法。平均粒徑大小為 3.6 nm。UV 光譜在 285.1 nm 有吸收峰，激發為 300 nm，放射在 420 nm。此碳點顯示出極高的螢光量子產率(13.6%)，優異的生物相容性，低毒性和穩定性等優點。可作為多色顯像的螢光探針。

2017 年作者 Hui Ding 教授與 Zi-Yuan Zhou 教授團隊使用無果肉檸檬汁加上乙醇溶液水熱法合成了發紅光碳點(R-CD) (Ding, Ji, Wei, Gao, Zhou & Xiong, 2017)。平均粒徑大小為 4.6 nm，激發為 533 nm，放射在 616 nm。此 R-CD 顯示出的螢光量子產率高達 28%，具有低細胞毒性和良好的光穩定性，使得 R-CD 可以用作體外/體內生物成像的螢光探針。

2017 年作者 Mingqian Tan 教授與 Bei-Wei Zhu 教授團隊將鰻魚烘烤(Bi et al., 2017)，進一步製作成碳點，而因烤魚中的蛋白質和脂肪通過熱解及脂質氧化形成大尺寸的聚合物，再經連續碳化分解成奈米大小，所以此碳點尺寸大小不一。碳點平均粒徑大小為 2.75 nm，激發波長為 410 nm，放射波長在 475 nm，螢光生命週期為 6.89 ns。因鰻魚中有豐富的蛋白質，所以此碳點具有高含量的氮摻雜，因此量子產率高達

68.7%。紫外光照射可以激發碳點發射強烈的螢光，XRD 與 HRTEM 圖譜說明這些碳點是無序排列的。合成的碳點具有較高的光穩定性，優異的光學性能、生物相容性和低的細胞毒性。最後將此碳點應用於 MC3T3-E1 細胞成像。

2018 年作者 Yuehe Lin 教授和 Dan Du 教授團隊使用亞麻籽利用水熱法合成高螢光的碳點(Song et al., 2018)，開發了一種簡單，綠色和低成本的方法。UV 光譜在 242 nm 和 324 nm 有吸收峰，激發為 395 nm，放射在 503 nm。此碳點顯示高的螢光量子產率(14.2%)，優異的水溶性，生物相容性，低毒性和光穩定性等優點。可對 MCF-7 細胞進行成像，也可用來檢測 utyrylcholinesterase (BChE)的活性。

2018 年作者 Quan Xu 教授與 Yao Liu 教授團隊使用尿素加苯胺及乙二胺以水熱法合成了氮摻雜碳點(N-CD) (Xu et al., 2018)開發了一種簡單、綠色和低成本的合成方法。N-CD 平均粒徑為 5.32 nm，量子產率為 2.46%，激發為 410 nm，放射為 510 nm。所製備的 N-CD 均勻，發出綠色螢光，可作為探針的 N-CD 可應用於斑馬魚的螢光生物成像，結果證實了 N-CD 在生物成像應用中作為探針的潛力。

參、研究動機

金奈米點和銀奈米團簇之螢光奈米材料，皆易受到光照或合成環境改變而造成螢光強度的衰退，導致應用上的侷限。因此在生物體應用上多需要於表面修飾保護劑。為此開發了一種低成本、製備簡單，低毒性且穩定的碳奈米點，應用在生物顯影上。

本研究利用金針花(*Hemerocallis fulva*)作為碳源，在氫氧化鈉的輔助下，以水熱法合成發藍色螢光的碳奈米點。在 FT-IR 鑑定下，發現碳奈米點表面具有親水官能基；且具有良好的耐鹽性、光穩定性以及 pH 值穩定性，並成功應用於洋蔥表皮細胞及豐年蝦的生物成像。

肆、材料與方法

一、藥品與溶劑

貝芬替(Carbendazim)、大滅松(Dimethoate)、三氯松(Trichlorfon)、二氯松(Dichlorvos)、四氯異丙腈(Chlorothalonil)、普硫松(Prothiofos)、陶斯松(Chlorpyrifos)、可尼丁(Clothianidin)、固殺草(Glufosinate-ammonium)、耐乃得(Methomyl)、除草靈(Propanil)、草甘膦(Glyphosate)、大克蟊(Dicofol)、加保利(Carbaryl)、芬化利(Fenvalerate)、硫敵克(Thiodicarb)、亞滅培(Acetamiprid)、克收欣(Kresoxim-methyl)、加保扶(Carbofuran)、賓克隆(Pencycuron)、鋅錳乃浦(Mancozeb)、三賽唑(Tricyclazole)、佈飛松(Profenofos)、益達胺(Imidacloprid)、畢芬寧(Bifenthrin)、得恩地(Thiram)、磷酸鈉(Na_3PO_4)、磷酸氫二鈉(Na_2HPO_4)、磷酸二氫鈉(NaH_2PO_4)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)、金屬離子購自美國 Sigma-Aldrich 公司。硫酸奎寧(Quinine sulfate)購自美國 J.T. Baker 公司。金針花、洋蔥購自台東當地市場。豐年蝦卵購自台灣小魚水族公司。本實驗使用的超純水由 NANO pure Infinity UV/Ufe 製作，電阻值為 18.2 MΩ/cm。

二、儀器介紹

1. 螢光光譜儀 Fluorescence spectrum (RF-6000)，購自日本 Shimadzu。
2. 紫外光/可見光光譜儀 UV/Vis absorbance spectrum (U-2900)，購自日本 Hitachi。
3. 高速離心機(3K 30)，購自美國 Sigma。
4. 特規程控高溫爐(YS-3P1)，購自台灣詠欣有限公司。
5. 酸鹼指示計(sp-701)，購自台灣 Suntex。
6. 電子天平(Mettler Toledo, B204-S)。
7. 傅立葉轉換紅外線光譜儀(Frontier FTIR)，購自美國 Perkin Elmer。
8. 超純水使用 NANO pure Infinity UV/Ufe，購自美國 Barnstead Thermolyn。
9. 直立式光學顯微鏡 Upright Microscope (BX53)，購自 Olympus。

10. 紫外燈(Compact UV Lamps)，購自美國UVP。

三、 碳奈米點之合成步驟

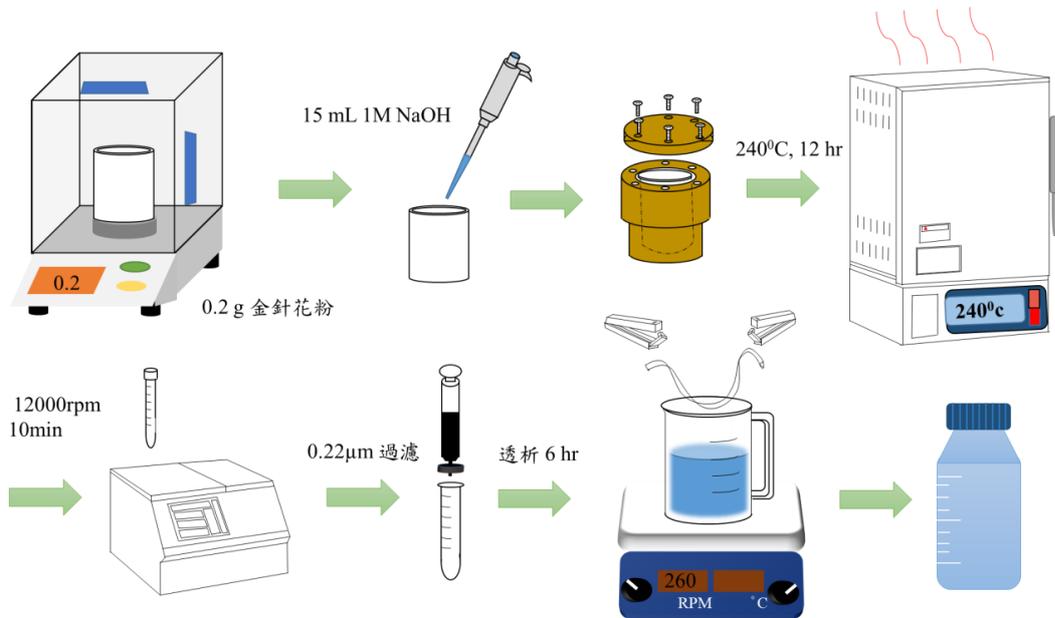


圖 1 螢光碳奈米點合成示意圖。

碳奈米點的合成步驟如下：

1. 將 0.2 g 金針花粉置入鐵氟龍杯中，加入 15 mL 1 M NaOH。
2. 將鐵氟龍杯蓋上蓋子並置於高壓釜內。
3. 將高壓釜的蓋子蓋上，對稱鎖上螺絲。
4. 將高壓釜放入預先設定好溫度與時間的烘箱中(240°C, 12 hr)。
5. 待高壓釜溫度冷卻至室溫後，取出鐵氟龍杯並將內部溶液取出置於離心管中，以 12000 rpm 轉速離心 10 分鐘。
6. 離心後小心取出上層液體，透過 0.22 μm 的硝化纖維膜去除大顆粒物質。
7. 再將過膜後的液體，加入透析膜 (MWCO: 3,500) 中透析 6 小時。
8. 透析後可得到發藍色螢光的碳奈米點。

四、 碳奈米點實驗方法探討

1. 最佳激發波長

將2 mL碳奈米點溶液置於石英比色槽中，讓螢光儀以10 nm為間格掃描200 nm ~ 800 nm的激發波長，選擇得到最強螢光強度作為最佳激發波長。

2. 酸鹼值的影響

分別配製磷酸二氫鈉、磷酸氫二鈉、磷酸三鈉水溶液(0.1 M, 150 mL)，以不同比例混合成多個pH值(pH 2.0~12.0)的磷酸緩衝溶液。在離心管中加入二次水 (1600 μ L)、碳奈米點溶液(200 μ L)與不同pH值的磷酸緩衝液(0.1 M, 200 μ L)，反應10 min後，用250 nm為激發波長偵測384 nm的螢光強度。

3. 耐鹽性

取碳奈米點溶液(200 μ L)與氯化鈉(4 M)溶液加二次水稀釋至2 mL，最終將氯化鈉濃度控制為0、0.2、0.5、0.8、1.0、1.2、1.5、1.8、2.0、2.2、2.5、2.8 和3.0 M，反應10分鐘後，用250 nm為激發波長偵測384 nm的螢光強度。

4. 耐光性

將總體積 20 mL (碳點 2 mL + 二次水 18 mL)的溶液，放置攪拌台上攪拌，一邊攪拌一邊照光，持續照光 60 分鐘，每 10 分鐘取 2 mL 選定稀釋倍率之碳點溶液置於石英槽中，用 250 nm 為激發波長偵測 384 nm 的螢光強度。。

5. 量子產率

配置 2 mL 硫酸奎寧 (0.1 M) 並以UV/Vis吸收光譜儀和螢光光譜儀(激發 360 nm)測得其吸收圖譜與螢光圖最為參考值，在稀釋本實驗之碳奈米點(2 mL)重複上述步驟測量，並觀察吸收在波長360 nm時的吸收值(需小於0.1，大於0.01)，帶入公式算出此碳奈米點之相對螢光量子產率。

$$\phi = \phi_R \times \frac{I}{I_R} \times \frac{A_R}{A} \times \frac{\eta^2}{\eta_R^2}$$

ϕ_R ：螢光化合物之 ϕ 值

I_R ：參考螢光化合物之螢光強度值

I ：樣品之螢光強度值

A_R ：參考螢光化合物之吸收值

A ：樣品之吸收值(應與參考螢光化合物選擇相同波長下作比較)

η_R ：參考螢光化合物 refractive index

η ：樣品之 refractive index (溶劑為超純水，refractive index = 1.33)

6. 金屬離子選擇性

在離心管中依序加入二次水(1400 μL)、磷酸緩衝液(0.1 M, 200 μL)、碳點溶液(200 μL)和 16 種金屬離子溶液(10^{-4} M, 200 μL)，於搖晃機上(130 rpm)反應 30 分鐘後上機偵測。

7. 農藥選擇性

在 2 mL 離心管中依序加入磷酸緩衝液(0.1 M, 200 μL)、不同農藥的溶液(1 mg/L, 200 μL)，再加入二次水(1400 μL)及碳點溶液(200 μL)，繼續反應 30 分鐘後即可上機偵測。

8. 洋蔥表皮生物成像

將洋蔥下表皮撕下，放進培養皿中，在將碳點與生理食鹽水以 1:1 的比例注入培養皿中浸泡，在顯微鏡下觀察 0 分鐘、30 分鐘及 60 分鐘的影像。

9. 豐年蝦生物成像

取 35 克的海水素加入 1000 mL 的二次水攪拌至溶解，在加入 5 克的豐年蝦卵，孵化一天，將孵化好的豐年蝦取出放入培養皿中，加入 1000 μL 的碳點培育，在顯微鏡下觀察 0 分鐘及 48 小時的影像。

伍、結果與討論

一、 生物成像反應機制

機制圖(圖 2)的左側為本實驗合成的碳點的方法，將 0.2 g 的金針花加入 15 mL 0.1 M NaOH 溶液中，在 240°C 的溫度下水熱法 12 hr。再經由離心、過濾和透析後，可以得到碳奈米點。以 250 nm 激發時，會產生 384 nm 的螢光放射，發出藍色螢光，有優異的生物相容性，應用於洋蔥表皮細胞與豐年蝦的成像。

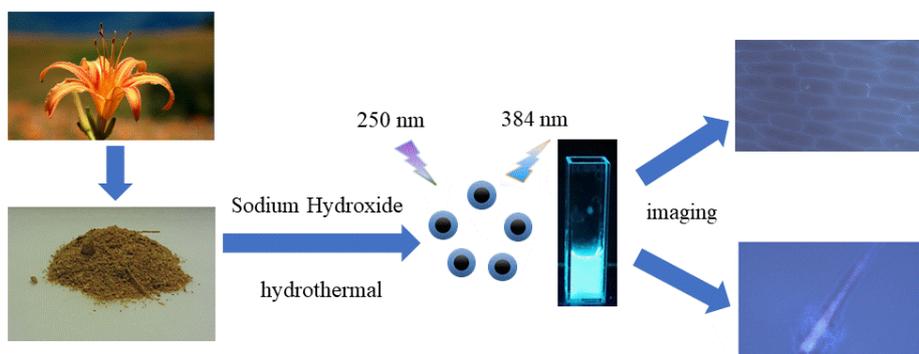


圖 2 合成碳奈米點與應用於生物成像示意圖。

二、 碳奈米點的鑑定

1. UV-Vis 吸收圖譜與螢光圖譜

經由吸收光譜圖(圖 3a)發現此 CNDs 在 255 nm 處具有吸收帶，為 $\pi \rightarrow \pi^*$ 的躍遷。另外，螢光光譜(圖 3b)偵測結果，當激發波長為 $\lambda_{ex} = 250 \text{ nm}$ 時，會在波長 $\lambda_{em} = 384 \text{ nm}$ 放射出最強的螢光。說明此 CNDs 不需用太高能量紫外光即可激發，且放射光在可見光範圍內。

(a)

(b)

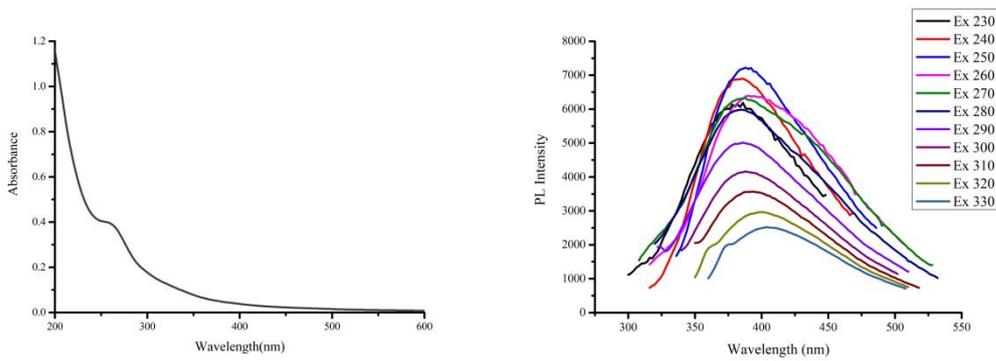


圖 3 碳奈米點的(a) UV-Vis 吸收光譜圖與(b)螢光光圖譜。

2. FT-IR 圖譜

圖 4 為使用 FT-IR 進行官能基的鑑定，發現金針花粉與 CNDs 的圖譜相似，表示此原料經過高溫高壓後，官能基並沒有產生明顯產生變化，在 3400 cm^{-1} 有 O-H 的官能基，在 1600 cm^{-1} 有 C=O 的官能基。且因為富含 O-H 官能基所以讓此 CNDs 具親水性。

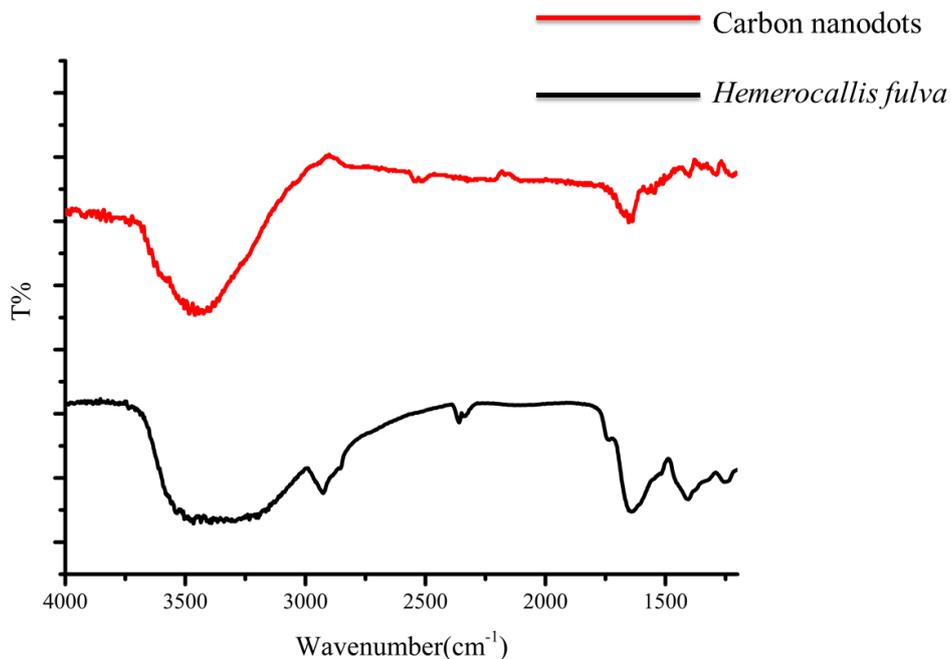


圖 4 碳奈米點與金針花粉的 FT-IR 光譜圖。

三、 碳奈米點的穩定性

為了觀察此 CNDs 是否可以不受生物體高鹽度環境影響，所以做了耐鹽性測試，結果如圖 5(a)，從圖中可觀察到不同濃度的氯化鈉溶液，(濃度範圍 0.0 ~ 3.0 M)，對 CNDs 之螢光強度沒有明顯影響，即使在高達 3.0 M 的離子強度環境下，仍然有良好穩定性。結果證明，此 CNDs 據有良好耐鹽性，在高離子強度溶液中，其螢光特性沒有受到影響。圖 5(b)的部分為 CNDs 以波長 360 nm 的 UV 燈下持續照射 1 小時的螢光強度變化圖，可以看到螢光強度沒有明顯改變，表示所合成的碳奈米點是相當穩定的螢光奈米材料。圖 5(c)為 CNDs 在不同 pH 值下依舊呈現很良好的螢光強度，就算在極酸或極鹼的環境下，仍然不會影響放光強度。在上述條件下可以證明此碳奈米點具有良好的耐鹽性、光穩定性與 pH 值穩定性。

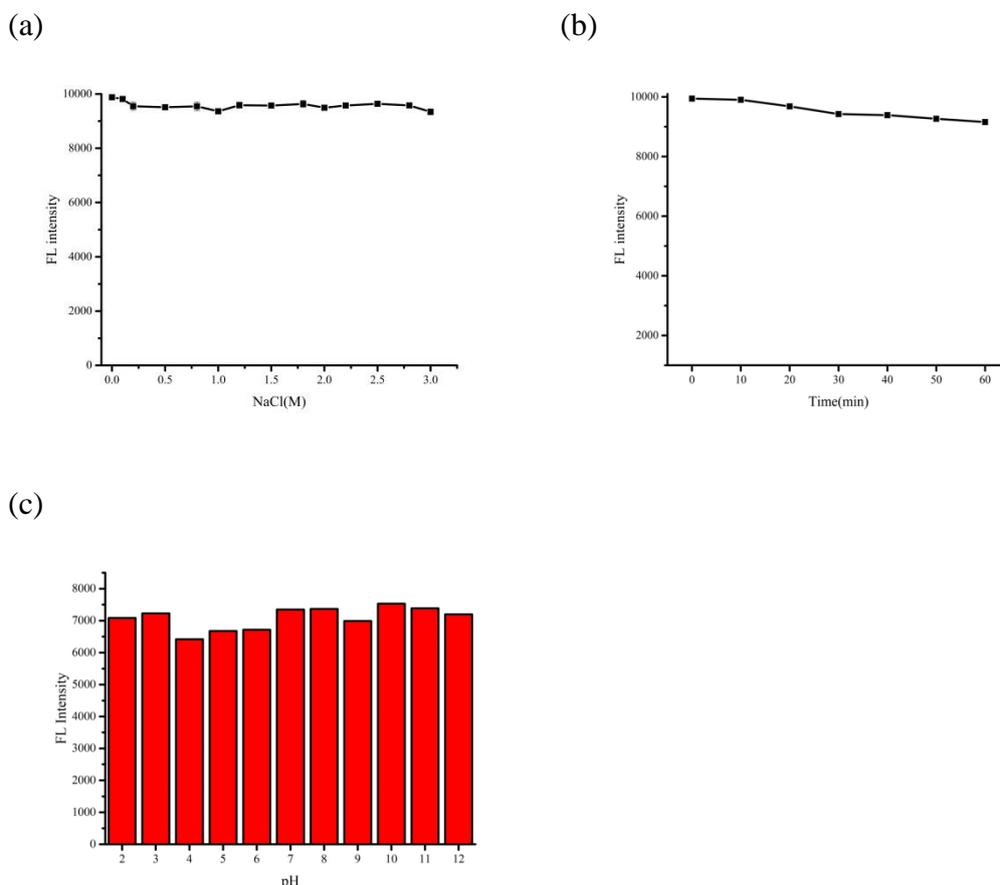


圖 5 (a) CNDs 於不同離子強度的螢光變化。(b) CNDs 於波長為 365 nm UV 燈下照

射 60 分鐘的螢光變化。(c) CNDs 於不同 pH 值環境下的螢光圖。

四、 碳奈米點的選擇性

圖 6(a)在 CNDs 中加入 30 種的不同農藥，發現其螢光強度無太大的變化，表示 CNDs 不會與農藥發生反應，是相當穩定的螢光奈米材料。圖 6(b)將 CNDs 加入不同的金屬離子，結果也是相當穩定。

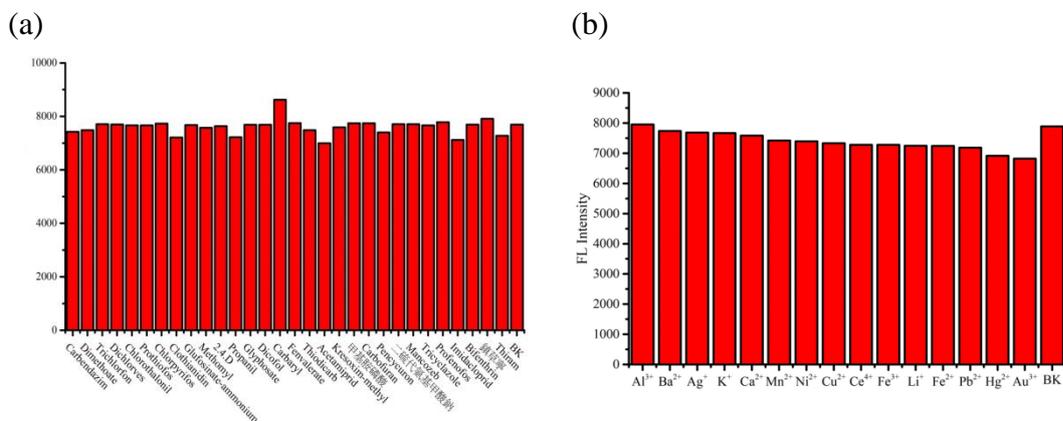


圖 6 碳奈米點的選擇性：(a) CNDs 於不同農藥環境下的螢光圖。(b) CNDs 於不同金屬離子環境下的螢光變化圖。

五、 碳奈米點應用於生物成像

1. 洋蔥表皮細胞

從圖 7(a)與(b)的比較下發現，和碳奈米點反應 60 分鐘的比反應 30 分中的細胞壁看起來還要明顯許多，證明此 CNDs 有成功進入洋蔥的表皮細胞

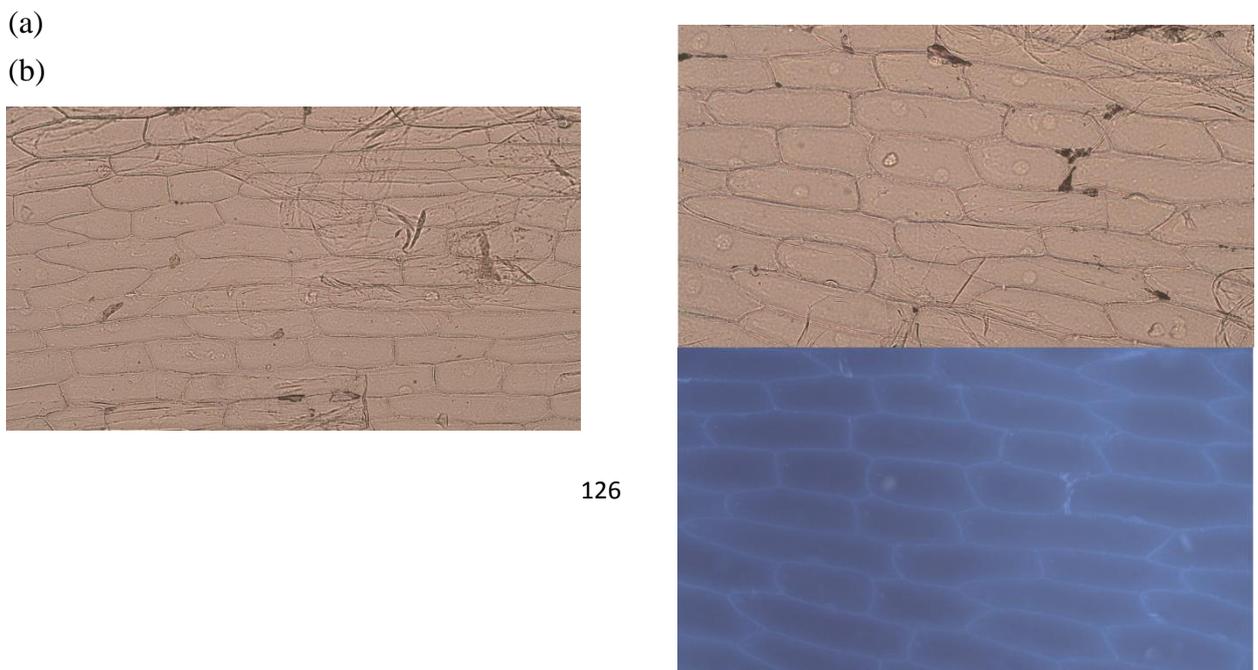




圖 7 CNDs 放入洋蔥表皮細胞孵育：(a) 30 分鐘和(b) 60 分鐘。

2. 豐年蝦

從圖 8(a)與(b)的比較下發現，未加 CNDs 的豐年蝦是沒有螢光的，而孵育 2 天之後可以明顯看出此 CNDs 有成功進入豐年蝦體內，還發現即使孵育 2 天，豐年蝦還是呈現很活躍的狀態，可以間接證明此 CNDs 為低毒性的。未來可望應用於其他生物體的成像。

(a)



(b)



圖 8 CNDs 放入豐年蝦孵育：(a)未加 CNDs 和(b)孵育 2 天。

陸、結論

本研究首次採用金針花與氫氧化鈉，透過水熱法(240°C, 12 hr)成功開發低成本、快速、簡便的碳奈米點。UV 光譜在 255 nm 處有一個吸收峰，最佳激發波長為 250 nm，放射波長為 384 nm，具有藍色螢光。所合成之 CNDs 於 1 小時長時間光照、高離子強度(~ 3.0 M NaCl)、不同 pH 值(pH 2.0 ~ 12.0)、不同農藥與金屬離子下仍可維持其性質之穩定性。在上述的這些穩定性的探討下，將碳奈米點應用於洋蔥表皮細胞與豐年蝦的螢光生物成像，結果證實了此 CNDs 在生物成像應用中有作為探針的潛力。未來可樣結合生醫工程或其他技術，應用於人體中癌細胞顯影。

誌謝

本研究承蒙科技部研究計畫補助(計畫編號: MOST 107-2113-M-143-002)，僅此誌謝。

參考文獻

- Anderson, C. R., Hu, X., Zhang, H., Tlaxca, J., Declèves, A.-E., Houghtaling, R., Sharma, K., Lawrence, M., Ferrara, K.W., Rychak, J. J., (2011). Ultrasound molecular imaging of tumor angiogenesis with an integrin targeted microbubble contrast agent. *Investigative Radiology*, 46(4), 215–224 .
- Baker, S. N., Baker, G. A., (2010) Luminescent carbon nanodots: emergent nanolights. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(38), 6726–6744.
- Bi, J., Li, Y., Wang, H., Song, Y., Cong, S., Li, D., Zhou, D., Zhu, B.-W., Tan, M., (2017) Physicochemical properties and cytotoxicity of carbon dots in grilled fish. *New Journal of Chemistry*, 41(16), 8490–8496.
- Cayuela, A., Carrillo-Carrión, C., Soriano, M. L., Parak, W. J., Valcárcel, M., (2016) One-step synthesis and characterization of N-doped carbon nanodots for sensing in organic media. *Analytical Chemistry*, 88(6), 3178–3185.
- Cao, L., Wang, X., Meziani, M. J., Lu, F., Wang, H., Luo, P. G., Lin, Y., Harruff, B. A., Veca, L. M., Murray, D., Xie, S.-Y., Sun, Y.-P., (2007) Carbon dots for multiphoton bioimaging. *Journal of the American Chemical Society*, 129(37), 11318–11319.
- Ding, H., Ji, Y., Wei, J.-S., Gao, Q.-Y., Zhou, Z.-Y., Xiong, H.-M., (2017) Facile synthesis of red-emitting carbon dots from pulp-free lemon juice for bioimaging. *Journal of*

- Materials Chemistry B*, 5(26), 5272–5277.
- Fan, J., Chu, P. K., (2010) Group IV nanoparticles: synthesis, properties, and biological applications. *Small*, 6(19), 2080–2098.
- Fu, C.-C., Lee, H.-Y., Chen, K., Lim, T.-S., Wu, H.-Y., Lin, P.-K., Wei, P.-K., Tsao, P.-H., Chang, H.-C., Fann, W., (2007) Characterization and application of single fluorescent nanodiamonds as cellular biomarkers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(3), 727–732.
- Huang, C.-C., Yang, Z.; Lee, K.-H., Chang, H.-T., (2007) Synthesis of highly fluorescent gold nanoparticles for sensing mercury (II). *Angewandte Chemie International Edition*, 46(36), 6824–6828.
- Lan, G.-Y., Chen, W.-Y., Chang, H.-T., (2011) One-pot synthesis of fluorescent oligonucleotide Ag nanoclusters for specific and sensitive detection of DNA. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2431–2435.
- Liu, C., Zhang, P., Tian, F., Li, W., Li, F., Liu, W., (2011) One-step synthesis of surface passivated carbon nanodots by microwave assisted pyrolysis for enhanced multicolor photoluminescence and bioimaging. *Journal of Materials Chemistry*, 21(35), 13163–13167.
- Liu, W., Diao, H., Chang, H., Wang, H., Li, T., Wei, W., (2017) Green synthesis of carbon dots from rose-heart radish and application for Fe³⁺ detection and cell imaging. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 241, 190–198.
- Niu, X., Liu, G., Li, L., Fu, Z., Xu, H., Cui, F., (2015) Green and economical synthesis of nitrogen-doped carbon dots from vegetables for sensing and imaging applications. *RSC Advances*, 5(115), 95223–95229.
- Sachdev, A., Matai, I., Kumar, S. U., Bhushan, B., Dubey, P., Gopinath, P., (2013) A novel one-step synthesis of PEG passivated multicolour fluorescent carbon dots for potential biolabeling application. *RSC Advances*, 3(38), 16958–16961.
- Song, Y., Yan, X., Li, Z., Qu, L., Zhu, C., Ye, R., Li, S., Du, D., Lin, Y., (2018) Highly photoluminescent carbon dots derived from linseed and their applications in cellular imaging and sensing. *Journal of Materials Chemistry B*, 6(19), 3181–3187.
- Walling, M. A., Novak, J. A., Shepard, J. R. E., (2009) Quantum dots for live cell and in vivo imaging. *International Journal of Molecular Sciences*, 10(2), 441–491.
- Wang, X., Qu, K., Xu, B., Ren, J., Qu, X., (2011) Microwave assisted one-step green synthesis of cell-permeable multicolor photoluminescent carbon dots without surface passivation reagents. *Journal of Materials Chemistry*, 21(8), 2445–2450.
- Wu, Z. L., Zhang, P., Gao, M. X., Liu, C. F., Wang, W., Leng, F., Huang, C. Z., (2013) One-pot hydrothermal synthesis of highly luminescent nitrogen-doped amphoteric carbon dots for bioimaging from Bombyx mori silk–natural proteins. *Journal of*

Materials Chemistry B, 1(22), 2868–2873.

- Xu, Q., Zhang, M., Liu, Y., Cai, W., Yang, W., He, Z., Sun, X., Luo, Y., Liu, F., (2018) Synthesis of multi-functional green fluorescence carbon dots and their applications as a fluorescent probe for Hg²⁺ detection and zebrafish imaging. *New Journal of Chemistry*, 42(12), 10400–10405.
- Xu, X., Ray, R., Gu, Y., Ploehn, H. J., Gearheart, L., Raker, K., Scrivens, W. A., (2004) Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12736–12737.
- Yang, S.-T., Wang, X., Wang, H., Lu, F., Luo, P.-G., Cao, L., Meziani, M.-J., Liu, J.-H., Liu, Y., Chen, M., Huang, Y., Sun, Y.-P. , (2009) Carbon dots as nontoxic and high-performance fluorescence imaging agents. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113(42), 18110-18114.
- Yang, Y., Cui, J., Zheng, M., Hu, C., Tan, S., Xiao, Y., Yang, Q., Liu, Y., (2012) One-step synthesis of amino-functionalized fluorescent carbon nanoparticles by hydrothermal carbonization of chitosan. *Chemical Communications*, 48(3), 380–382.
- Zhao, Q.-L., Zhang, Z.-L., Huang, B.-H., Peng, J., Zhang, M., Pang, D.-W., (2008) Facile preparation of low cytotoxicity fluorescent carbon nanocrystals by electrooxidation of graphite. *Chemical Communications*, 41, 5116–5118.