

# Persistente fosforen voor in vivo beeldvorming

Inge Nys

Promotoren: prof. dr. Philippe Smet, prof. dr. Dirk Poelman  
Begeleider: Koen Van den Eeckhout

Masterproef ingediend tot het behalen van de academische graad van  
Master in de ingenieurswetenschappen: toegepaste natuurkunde

Logistieke dienst onderwijs faculteit Wetenschappen, Vakgroep  
Vaste-Stofwetenschappen  
Voorzitter: prof. dr. Paul Matthys  
Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur  
Academiejaar 2012-2013



### **Toelating tot bruikleen**

De auteur geeft de toelating deze masterproef voor consultatie beschikbaar te stellen en delen van de masterproef te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting de bron uitdrukkelijk te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit deze masterproef.

Inge Nys  
Gent, 27 mei 2013

## Voorwoord

Bij het begin van deze masterproef wil ik graag een aantal mensen oprecht bedanken voor de hulp en steun de afgelopen maanden en jaren. De tekst in deze masterproef heb ik volledig zelf geschreven, maar dit wil gelukkig niet zeggen dat ik er al die tijd alleen voor stond. Integendeel, het Lumilab team heeft mij hierbij prima ondersteund, begeleid en gemotiveerd. In eerste instantie wil ik dan ook de volledige groep bedanken voor de zeer aangename en toffe samenwerking. Dankzij jullie was dit jaar niet alleen leerrijk maar ook zeer amusant. In het bijzonder wil ik hierbij ook Anthony, Koen, Katrien en Heleen nog bedanken voor de steeds toffe sfeer op het bureau en de interessante discussies.

Speciale dank aan mijn promotoren Philippe Smet en Dirk Poelman, en mijn begeleider Koen Van den Eeckhout kan in dit voorwoord uiteraard niet ontbreken. De begeleiding die ik van jullie gekregen heb, was beter dan ik ooit had durven dromen. Op alle mogelijke en onmogelijke momenten stonden jullie met de glimlach klaar om me te helpen. Dirk, in het bijzonder bedankt om mij en de andere thesisstudenten vanaf de eerste dag thuis te laten voelen bij Lumilab. Koen en Philippe, nogmaals bedankt om me steeds van al mijn prangende vragen te verlossen en me te begeleiden bij alle experimentele metingen. Bedankt ook om me steeds onvoorwaardelijk te steunen, zelfs wanneer onvoorziene omstandigheden even roet in het eten leken te gooien. Tot slot ook bedankt om deze masterproef grondig na te lezen en zo het aantal fouten tot een minimum te beperken.

Hierbij wil ik ook Freya graag nog speciaal bedanken voor de begeleiding bij het toxiciteitsonderzoek. Freya, ik heb jouw inspanningen steeds heel erg geapprecieerd en ik vond het een leerrijke en bovendien zeer leuke ervaring.

Ook Olivier wil ik zeker vermelden in dit dankwoord: bedankt voor het uitvoeren van een hele resem XRD-metingen en bedankt om tijd te maken voor het vastleggen van enkele SEM beelden.

Tot slot wil ik ook mijn familie en vrienden bedanken, om niet enkel van dit jaar maar ook van alle voorgaande jaren een aangename tijd te maken. Mijn ouders wil ik in het bijzonder bedanken om mij en broer een warme thuis te geven en om ons steeds onvoorwaardelijk te steunen. Mijn broer wil ik bovendien bedanken voor de vele grappige momenten, de leuke trainingen samen en de ongeëvenaarde sfeer in huis. Ook Tim wil ik bedanken voor de steun en het amusement de afgelopen 5 jaar. Tot slot wil ik ook mijn trainers, in het bijzonder Filip en Pascal, bedanken voor de aangename sportmomenten die mijn jeugd hebben gekleurd.

Bedankt allemaal, zonder jullie was deze masterproef nooit hetzelfde geweest!

Inge Nys  
Gent, 27 mei 2013

Universiteit Gent  
Faculteit Ingenieurswetenschappen en Architectuur  
Vakgroep Vaste-Stofwetenschappen  
Voorzitter: prof. dr. Paul Matthys  
Academiejaar 2012-2013

## Persistente fosforen voor *in vivo* beeldvorming

Inge Nys

Promotoren: prof. dr. Philippe Smet, prof. dr. Dirk Poelman  
Begeleider: Koen Van den Eeckhout

Masterproef ingediend tot het behalen van de academische graad van  
Master in de ingenieurswetenschappen: toegepaste natuurkunde

### Samenvatting

*In vivo* probes laten in tegenstelling tot andere beeldvormingstechnieken toe om biologische processen op cellulair of moleculair niveau te volgen en de distributie van medicijnen in beeld te brengen. Radioactieve tracers worden reeds geruime tijd als *in vivo* probe aangewend maar hebben het nadeel dat ze een stralingsbelasting van de patiënt met zich meebrengen. Luminescente probes zijn daarom een interessant alternatief. Fluorescente materialen werden al uitvoerig onderzocht maar de detectie van deze probes wordt bemoeilijkt door autofluorescentie van weefsel. Dit probleem kan vermeden worden met persistent luminescente materialen maar desondanks werden dit soort probes nog zelden in detail geanalyseerd.

In deze masterproef wordt de bruikbaarheid van persistente  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  partikels voor *in vivo* beeldvorming onderzocht.  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  wordt verder geoptimaliseerd voor deze toepassing door een intensiteitsverhoging van de persistente luminescentie en een roodverschuiving van het persistente emissiespectrum na te streven. Om de intensiteit van de persistente luminescentie te verhogen, wordt de toevoeging van fluxmaterialen onderzocht. Hierbij wordt aangetoond dat toevoeging van KCl of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux efficiënter is dan toevoeging van KF flux en dat een verviervoudiging van de nalichtingstijd kan bekomen worden. Het effect van de fluxen op andere materiaaleigenschappen wordt tevens uitvoerig onderzocht. Vervolgens wordt vastgesteld dat 1mol% Mn, Bi, Cr of Pb dopering geen roodverschuiving van het emissiespectrum kan teweegbrengen.

Aangezien enkel kleine (submicron) partikels bruikbaar zijn voor *in vivo* beeldvorming, wordt daarna ook de groottereductie van de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  partikels geanalyseerd. De verkregen nanodeeltjes worden gekarakteriseerd en de luminescente eigenschappen worden vergeleken met deze van het bulkmateriaal. Hieruit blijkt onder andere dat het verval van de persistente intensiteit initieel veel sterker is voor het nanomateriaal. Naast de materiaalkundige optimalisatie en karakterisering, staat tot slot ook het onderzoek naar de cytotoxiciteit centraal. Hiervoor worden LDH (lactaatdehydrogenase) en MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) testen uitgevoerd op cellen in cultuur. Beide testen tonen aan dat de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  nanopartikels slechts een beperkte toxiciteit uitlokken.

### Trefwoorden

$\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ , *in vivo* beeldvorming, persistente luminescentie, nanopartikels, toxiciteit

# Inhoudsopgave

<b>1 Inleiding</b>	<b>1</b>
1.1 Situering	1
1.2 Doel	2
1.3 Opbouw	3
<b>2 Theoretische achtergrond</b>	<b>4</b>
2.1 Fotoluminescentie	4
2.2 Persistente luminescentie	5
2.3 Thermoluminescentie	6
2.4 Optisch venster van weefsel	7
2.5 Chemische stabiliteit	8
2.6 Deeltjesgrootte	8
2.7 Vereisten voor persistente <i>in vivo</i> probes en $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ als kandidaat	9
2.8 Literatuur	10
2.8.1 Persistente fosforen voor medische beeldvorming	11
2.8.2 Nanotoxiciteit	13
2.8.3 Andere <i>in vivo</i> probes	13
<b>3 Experimentele methoden</b>	<b>14</b>
3.1 Bereidingsmethode	14
3.1.1 Optimalisatie van $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$	14
3.2 Omvorming tot nanodeeltjes	15
3.2.1 Gepulste laser ablatie in oplossing	15
3.2.2 Malen in oplossing	15
3.3 Meten van emissie- en excitatiespectrum	16
3.4 Meten van de nalichtingstijd	16
3.5 Meten van thermoluminescentiespectra	17
3.6 Meten van diameter en zetapotential met DLS	17
3.7 SEM, SEM-EDX en SEM-CL	18
3.8 Meten van XRD spectra	18
<b>4 Resultaten</b>	<b>19</b>
4.1 Verbeteren van $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ voor <i>in vivo</i> beeldvorming	19
4.1.1 Verbeteren van de persistent luminescente intensiteit	19
Invloed van KF, $\text{NH}_4\text{Cl}$ of KCl flux op de persistente luminescentie	19
Invloed van KF, $\text{NH}_4\text{Cl}$ of KCl flux op emissie- en excitatiespectra	21
Invloed van KF, $\text{NH}_4\text{Cl}$ of KCl flux op TL spectra en vervalconstante	21
Invloed van KF, $\text{NH}_4\text{Cl}$ of KCl flux op de materiaalsamenstelling	24
4.1.2 Verbeteren van het persistente emissiespectrum	28
Invloed van Mn, Bi, Cr of Pb dopering op de emissiespectra	29
Invloed van Mn, Bi, Cr of Pb dopering op de persistente luminescentie	30

	Invloed van Mn, Bi, Cr of Pb dopering op de materiaalsamenstelling . . .	31
4.2	Reduceren van de deeltjesgrootte . . . . .	32
	4.2.1 Gepulste laserablatie (PLAL) . . . . .	32
	Diameter . . . . .	33
	Zetapotentialaai . . . . .	33
	4.2.2 Malen in oplossing . . . . .	34
	Diameter . . . . .	34
	Zetapotentialaai . . . . .	37
4.3	Karakterisering van de nanodeeltjes . . . . .	37
	4.3.1 Persistent verval . . . . .	38
	4.3.2 Emissie- en excitatiespectra . . . . .	39
	4.3.3 SEM-CL en SEM-EDX resultaten . . . . .	40
	4.3.4 Concentratie van de colloïdale oplossing . . . . .	43
4.4	Nanotoxiciteit van $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,Tm}$ nanopartikels . . . . .	44
	4.4.1 Lactaatdehydrogenase (LDH) . . . . .	44
	4.4.2 MTT . . . . .	46
	4.4.3 Vergelijking MTT en LDH en conclusies cytotoxiciteit . . . . .	47
	4.4.4 Confocale microscopie om cellulaire opname te bestuderen . . . . .	49
<b>5</b>	<b>Conclusies</b>	<b>50</b>
	<b>Bibliography</b>	<b>52</b>

## Tabel van afkortingen en symbolen

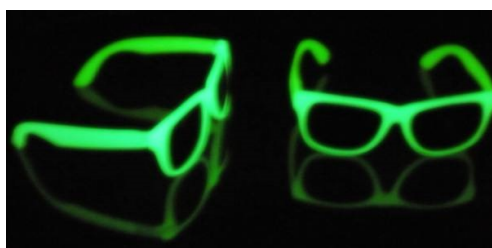
cd	candela
CL	cathodeluminescentie
DLS	<i>dynamic light scattering</i>
EDX	energie dispersieve X-stralen spectroscopie
IR	infrarood
LDH	lactaatdehydrogenase
LED	licht emitterende diode
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NP(s)	nanopartikel(s)
PEG	polyethyleenglycol
PLAL	gepulste laserablatie
QD(s)	kwantumdot(s)
rpm	toeren per minuut
SEM	<i>scanning electron microscopy</i>
TL	thermoluminescentie
UV	ultraviolet
wt%	gewichtspercentage
XRD	X-stralendiffractie
ZA	zeldzame aarde

# Hoofdstuk 1

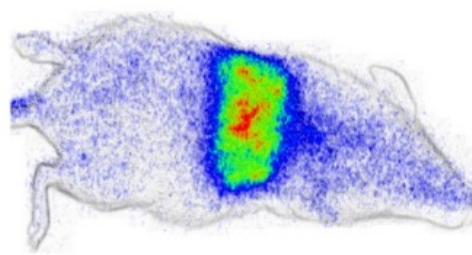
## Inleiding

### 1.1 Situering

De lange nalichtingstijd van persistente fosforen maakt deze materialen zeer geschikt voor een aantal toepassingen. Het bekendste voorbeeld hiervan is vermoedelijk *glow-in-the-dark* speelgoed (figuur 1.1(a)). De persistente fosforen worden echter ook vaak gebruikt voor noodsignalisatie, als druksensor of thermische sensor, als lichtgevende verf of in de wijzerplaten van horloges. Een andere toepassing die de laatste jaren aan aandacht heeft gewonnen, is het gebruik van persistent luminescente materialen voor *in vivo* medische beeldvorming (figuur 1.1(b)). Deze masterproef zal zich in hoofdzaak op de laatste toepassing richten.



(a) *Glow-in-the-dark* brillen [1]



(b) persistente luminescentie voor *in vivo* medische beeldvorming in muizen [2]

**Figuur 1.1:** Enkele toepassingen van persistente luminescentie.

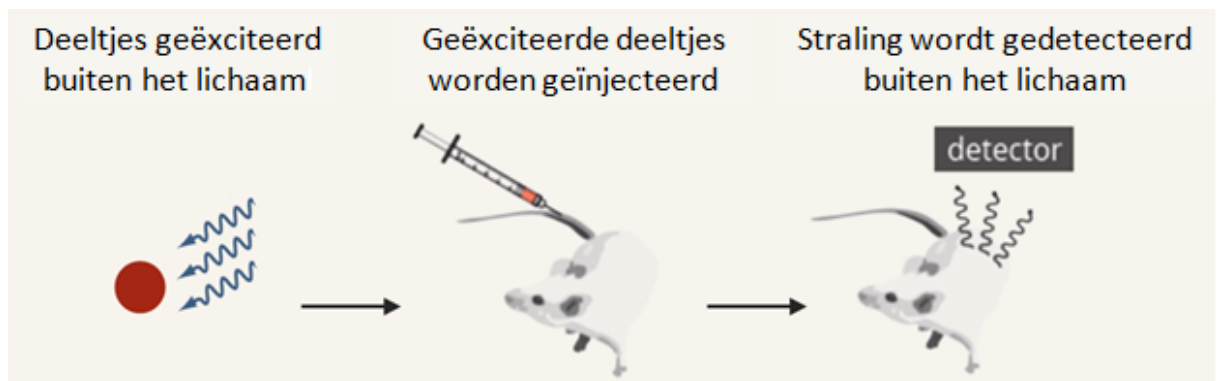
Tot op heden zijn reeds een hele resem medische beeldvormingstechnieken beschikbaar, maar verder onderzoek naar nieuwe technieken en optimalisatie van bestaande technieken blijft noodzakelijk. De verschillende methoden leveren immers vaak complementaire informatie op [3, 4]. Voor sommige beeldvormingstechnieken worden *in vivo* probes gebruikt. Deze probes laten in tegenstelling tot andere beeldvormingstechnieken toe om biologische processen op cellulair of moleculair niveau te onderzoeken [3, 4]. Op die manier kunnen kankers of andere ziektes in een vroegtijdig stadium ontdekt worden. Het ziekteverloop of het effect van een behandeling kan met behulp van deze probes ook nauwgezet in beeld gebracht worden. Bovendien kan de activiteit van biologische processen in een tumor onderzocht worden waardoor inzicht verkregen wordt in het gedrag van tumoren op cellulair niveau. Dit zijn enkele van de unieke mogelijkheden die *in vivo* probes zeer interessant maken voor medische beeldvorming [3, 4]. Radioactieve *tracers* zijn vermoedelijk het meest gekende voorbeeld, maar ook fluorescente materialen worden reeds als *in vivo* probe aangewend.

Aangezien de fluorescente probes een zeer korte nalichtingstijd hebben (typisch orde microse-



conde of korter), moeten ze tijdens het meten continu opnieuw geëxciteerd worden. Dit veroorzaakt een aantal nadelen voor *in vivo* beeldvorming, waarbij het excitatielicht doorheen de weefsellagen moet propageren alvorens excitatie kan plaatsvinden. De absorptie van licht door bepaalde biologische structuren veroorzaakt immers spontane lichtemissie van deze componenten [5]. Dit fenomeen is gekend als autofluorescentie en de spontaan uitgezonden straling kan de detectie van het originele signaal verstoren. Autofluorescentie treedt voornamelijk op onder sterke belichting met golflengten in het blauwe en groene gebied, dewelke typisch zijn voor het gebruikte excitatielicht. Door de sterke absorptie van het excitatielicht in de bovenliggende weefsellagen, is het bovendien moeilijk om een beeld te krijgen van dieper gelegen weefsels. Het uitgezonden emissielicht van de fosfor heeft in het algemeen een langere golflengte dan het excitatielicht (zie hoofdstuk 2). Het emissielicht veroorzaakt daarom minder autofluorescentie en wordt ook minder in weefsels geattenuëerd (zie sectie 2.4).

Zowel de autofluorescentie als de absorptie van het excitatielicht zijn problemen inherent aan het gebruik van fluorescente probes. Er worden veel inspanningen geleverd om de excitatie en de detectie van deze deeltjes te optimaliseren, maar persistent luminescente materialen kunnen mogelijk een efficiëntere oplossing bieden. Bij het gebruik van persistente *in vivo* probes, worden de deeltjes voor de injectie geëxciteerd (figuur 1.2). Latere herexcitatie wordt overbodig indien de persistentie voldoende lang en intens is voor het beoogde experiment. Door de langdurige luminescentie wordt het probleem van autofluorescentie dus grotendeels vermeden.



**Figuur 1.2:** Het gebruik van persistent luminescente deeltjes als *in vivo* probes. Gebaseerd op [6].

## 1.2 Doel

Het doel van deze masterproef is het onderzoeken en ontwikkelen van een persistent luminescent materiaal voor *in vivo* beeldvorming. Naast het ontwikkelen en opmeten van deze fosfor staat ook het onderzoek naar de nanotoxiciteit centraal. De ontwikkeling van *in vivo* probes is immers zinloos indien de partikels een sterke toxiciteit uitlokken. Als startmateriaal wordt uitgegaan van een reeds ontwikkelde fosfor ( $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ ) met langdurige persistentie bij een piekgolflengte van 620nm [7, 8]. De oranje-rode emissie en de goede persistentie maken van deze fosfor een interessante kandidaat voor medische beeldvorming. In eerste instantie zal vooral aandacht besteed worden aan het verbeteren van deze fosfor. Verbeteren kan hierbij essentieel op twee manieren: enerzijds is een verhoging van de persistente lichtemissie een belangrijk aandachtspunt, maar anderzijds is ook het nastreven van een langere emissiegolflengte belangrijk voor het verkrijgen van optimale transmissie door weefsels. Beide aandachtspunten streven een betere detectie van het signaal na gedurende een zo lang mogelijke tijd. Voor het gebruik bij *in vivo* toepassingen moet het materiaal echter op een efficiënte manier kunnen omgevormd worden tot deeltjes op de nanoschaal. Bijgevolg zal ook aandacht besteed worden aan enkele

methoden om dit te verwezenlijken en de verkregen nanopartikels zullen grondig gekarakteriseerd worden. Tot slot wordt de toxiciteit van de deeltjes onderzocht met behulp van een aantal standaard proeven voor acute cytotoxiciteit. Het is de bedoeling om zo de praktische toepasbaarheid van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  partikels voor *in vivo* beeldvorming in kaart te brengen, zowel op materiaalkundig als op toxicologisch vlak.

### 1.3 Opbouw

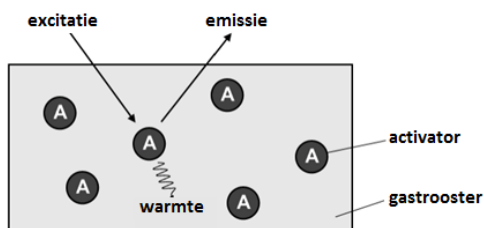
In **hoofdstuk 2** wordt een beknopt overzicht gegeven van een aantal belangrijke achterliggende concepten. Het is hierbij niet de bedoeling om een overzicht van theorieën rond luminescentie te geven, maar veeleer om een aantal topics te bespreken die belangrijk zijn specifiek voor *in vivo* beeldvorming. Daarom wordt het ‘optisch venster’ in biologische weefsels besproken alsook het belang van de deeltjesgrootte en van een goede chemische stabiliteit. Op basis hiervan worden vervolgens een aantal vereisten voor fosforen bij *in vivo* toepassingen besproken, waaruit de geschiktheid van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  als startmateriaal zal blijken. Tot slot wordt in dit hoofdstuk ook een beknopt overzicht gegeven van reeds verschenen literatuur. In **hoofdstuk 3** wordt de bereidingsmethode van de fosfor besproken, alsook een aantal experimentele technieken die gebruikt worden voor de karakterisering van het materiaal. **Hoofdstuk 4** daarentegen vormt het zwaartepunt van deze masterproef, waarin de belangrijkste resultaten gebundeld worden. Om te beginnen, wordt het verbeteren van de fosfor op basis van de persistente intensiteit en het persistente emissiespectrum besproken. Hierbij wordt ook de invloed op andere materiaaleigenschappen in kaart gebracht. Daarna wordt aandacht besteed aan het malen van de fosfor en de verkregen nanodeeltjes worden gekarakteriseerd. Tot slot worden ook de resultaten van de toxiciteitsproeven in dit hoofdstuk besproken. De belangrijkste conclusies worden in **hoofdstuk 5** opgelijst.

## Hoofdstuk 2

# Theoretische achtergrond

### 2.1 Fotoluminescentie

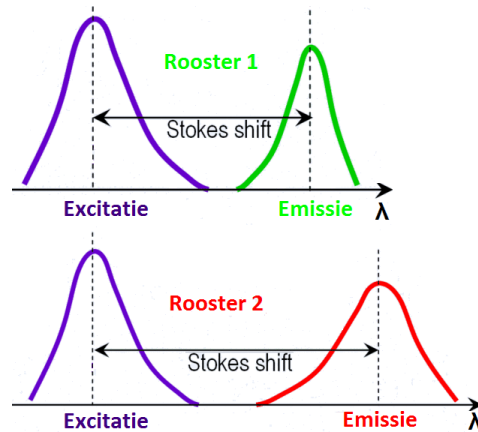
De term fotoluminescentie of fluorescentie wordt gebruikt voor het proces waarbij een materiaal een invallend foton absorbeert en kort daarna een nieuw foton emitteert. Een typische tijdschaal voor dit proces is van de orde nanoseconde tot microseconde. Het materiaal wordt geëxciteerd door fotonabsorptie, waarna het kan relaxeren door zelf een luminescent foton uit te zenden. Dit proces staat vaak in concurrentie met niet-radiatieve relaxatie, wat gepaard gaat met fononemissie en de bijhorende productie van warmte.



**Figuur 2.1:** Schematische voorstelling van een luminescent materiaal bestaande uit een gastrooster met daarin activators [7, 9].

De meeste luminescente materialen bestaan uit een transparant gastrooster en een kleine hoeveelheid intentioneel toegevoegde onzuiverheidsatomen die fungeren als activators (figuur 2.1). De relaxatie in de activators is verantwoordelijk voor luminescente lichtemissie, maar de interactie met het gastrooster bepaalt in belangrijke mate mee de luminescente eigenschappen. Het gastrooster is verantwoordelijk voor de overdracht van excitatie-energie tussen gastatomen en activators, maar heeft ook invloed op het excitatie- en emissiespectrum. Het **excitatiespectrum** geeft voor verschillende excitatiegolflengten weer wat de efficiëntie is waarmee luminescentie wordt geïnduceerd. Het **emissiespectrum** anderzijds geeft de spectrale vorm van het geëmitteerde licht weer.

De absorptie- en emissiewaarschijnlijkheid voor fotonen met een bepaalde golflengte is afhankelijk van de atomaire energieniveaus in de activators. Het excitatie- en emissiespectrum wordt dus in belangrijke mate bepaald door de ligging van deze niveaus. Het gastrooster beïnvloedt deze ligging onder andere door een kristalveld-splitsing van de energieniveaus. Dit tweede orde effect zorgt er dus voor dat de energieniveaus in een activator ook mede door het gastrooster bepaald worden. Bovendien wordt de relatieve sterkte van verschillende absorptie- en emissielijnen door lokale symmetrie in het gastrooster bepaald en ook de kwantum-efficiëntie is afhankelijk van



**Figuur 2.2:** Invloed van het gastrooster op excitatie- en emissiespectrum en op de Stokes-shift [10].

het gebruikte rooster. Verder hebben inhomogeniteiten in de omringing van de activators via inhomogene verbreding ook een invloed op de emissie- en excitatiespectra.

Tot slot dient nog opgemerkt te worden dat de uitgezonden fotonen in het algemeen een lagere energie hebben dan de geabsorbeerde fotonen. Het excitatiespectrum is dan ook gepiekt bij kortere golflengten dan het emissiespectrum. De resterende energie (bij absorptie van een foton en opeenvolgende emissie van een lager energetisch foton) wordt onder de vorm van warmte overgedragen op het rooster. De verschuiving tussen het excitatie- en emissiespectrum is gekend als de *Stokes-shift* en wordt veroorzaakt door het verschil in elektronische toestand van het grondniveau en het geëxciteerde niveau. De grootte van de *Stokes-shift* is afhankelijk van het specifieke gastrooster zoals geïllustreerd wordt in figuur 2.2.

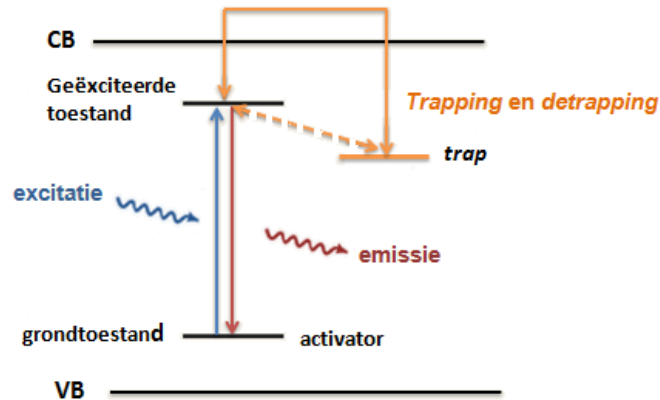
Een meer gedetailleerde studie voor de hier intuïtief behandelde concepten, kan teruggevonden worden in verschillende handboeken over luminescentie [11]. Deze theorie is vaak gebaseerd op een beschrijving met het configurationeel coördinaatmodel, zowel op klassieke als op kwantummechanische wijze.

## 2.2 Persistente luminescentie

Naast fotoluminescente materialen, waarvan de nalichtingstijd sterk beperkt is, bestaan er ook persistent luminescente materialen waarvoor de nalichtingstijd meerdere minuten, uren of zelfs dagen kan bedragen. De grens tussen beide is enigszins arbitrair en wordt vaak gekozen bij nalichtingstijden in de buurt van een tiental milliseconden. Het mechanisme van persistente luminescentie is nog steeds niet volledig ontrafeld, maar het staat vast dat dit mechanisme grondig verschillend is van het principe van fotoluminescentie. De nalichtingstijd voor fotoluminescente materialen wordt bepaald door de radiatieve en niet-radiatieve vervalconstanten van de geëxciteerde niveaus. Variaties in de radiatieve vervalconstante worden in eerste instantie verklaard op basis van selectieregels en fundamentele eigenschappen van elektromagnetische multipooltransities. Tot op heden veronderstellen de meeste auteurs dat de langdurige lichtemissie (*afterglow*) in het geval van persistente luminescentie echter veroorzaakt wordt door de aanwezigheid van vallen (*traps*) in het materiaal. Deze vallen veroorzaken energieniveaus in de verboden zone van het materiaal en kunnen bijvoorbeeld voorkomen onder de vorm van defecten of codopanten. In wat volgt, zullen we aannemen dat de vallen zich dicht bij de conductieband bevinden en dus vooral elektronen (en geen gaten) kunnen invangen.

De geëxciteerde elektronen in de activators kunnen gevangen worden in een val (*trapping*) door rechtstreekse transfer naar de val, ofwel door onrechtstreekse transfer via de conductieband, al

dan niet na het nemen van een thermische barrière [12]. Op die manier verliest de activator zijn geëxciteerd elektron zonder radiatief verval naar de grondtoestand en dus zonder emissie van een foton. Na verloop van tijd kunnen de elektronen echter terug vrijgegeven worden uit de vallen, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van voldoende thermische energie, waardoor opnieuw een activator in de aangeslagen toestand kan ontstaan (*detrapping*). Op die manier kan alsnog radiatieve recombinatie optreden in het luminescente centrum. De vertraging die optreedt door de vangst van de elektronen in de vallen en de daaropvolgende vrijgave, zorgt ervoor dat de lichtemissie lange tijd na de excitatie kan plaats vinden en zou het mechanisme van persistente luminescentie kunnen verklaren. Figuur 2.3 geeft een schematische illustratie van deze processen.



**Figuur 2.3:** Schematische voorstelling van de excitatie en emissie in de activator en het *trapping* en *detrapping* mechanisme. CB en VB staan voor conductie- en valentieband.

In tegenstelling tot fotoluminescentie is dus niet alleen de excitatie en desexcitatie in de activator bepalend voor het luminescente verval, maar ook de interactie tussen de vallen en activators. Over het exacte mechanisme van deze interactie bestaat nog veel discussie en verder onderzoek blijft noodzakelijk. Het principe zoals hier geschetst op basis van één activatortype en één val, kan uiteraard uitgebreid worden tot meerdere activators en vallen. Ook *retrapping* kan hierbij in rekening gebracht worden. Dit maakt het vinden van experimentele evidentie voor een bepaalde theorie enkel moeilijker en de uitdaging des te groter.

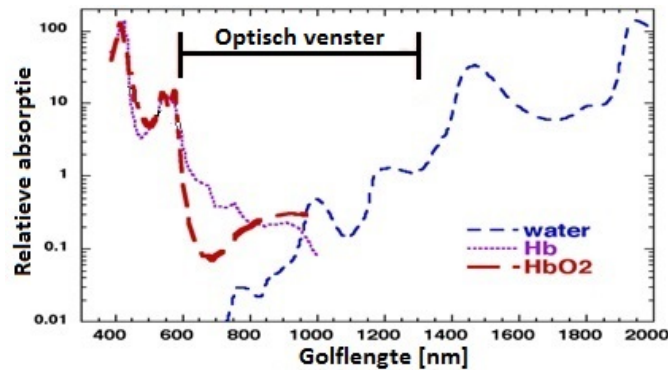
## 2.3 Thermoluminescentie

Thermoluminescentie (TL) is een thermisch gestimuleerd proces waarbij het materiaal eerst optisch geëxciteerd wordt en vervolgens tijdens het opwarmen licht uitzendt. De excitatie gebeurt hierbij meestal op lage temperatuur (tot vloeibarestikstof- of heliumtemperatuur). Tijdens het opwarmen wordt het materiaal niet verder belicht en de excitatie-energie wordt dus een zekere tijd in het materiaal opgeslagen. Dit kan in verband gebracht worden met het hierboven besproken mechanisme van persistente luminescentie, waarbij fosforen opgeladen worden door optische excitatie en de energie tijdelijk opgeslagen wordt in vallen. Het proces van *detrapping* wordt tijdens een TL experiment gestimuleerd door het materiaal op te warmen. De energie die nodig is om de vallen leeg te maken, is afhankelijk van de ligging van de val in de verboden zone. Een diepere val vereist een hogere activeringsenergie en zal bijgevolg pas gelegeerd worden bij hogere temperaturen. Na de *detrapping* kan eventueel een radiatieve recombinatie in het luminescente centrum plaatsvinden. Op die manier kan de lichtintensiteit in functie van de temperatuur dus een beeld geven van de distributie aan vallen in het materiaal.

## 2.4 Optisch venster van weefsel

De bruikbaarheid van lichtgevende materialen voor *in vivo* medische beeldvorming is niet alleen sterk afhankelijk van de intensiteit maar ook van de golflengte van het uitgezonden licht. Om detectie van de luminescente deeltjes mogelijk te maken, moet het licht immers doorheen de wefsellagen propageren zonder al te sterke attenuatie. Een intense *in vivo* probe verhoogt uiteraard de kans op bruikbare detectie, maar de sterk niet-lineaire golflengteafhankelijkheid van weefselattenuatie is zo mogelijk nog belangrijker. Dit zorgt er voor dat in de praktijk enkel licht in een bepaald golflengtegebied bruikbaar is voor *in vivo* beeldvorming. Dit gebied met minimale weefselattenuatie wordt het ‘optisch venster van weefsel’ genoemd. Zowel absorptie- als scatteringeffecten bepalen de ligging van dit spectraal gebied [5].

De absorptie wordt voornamelijk bepaald door de absorptiecoëfficiënt van water en bloed. De kleine concentratie melanine in weefsels is vooral belangrijk voor de scattering van UV licht; de absorptie in het rode gebied is door de kleine concentratie niet dominant. Anderzijds is de absorptie door vet vooral belangrijk bij grote golflengten ( $\geq 1000\text{nm}$ ) en in vetrijke weefsels. Daarom zullen we ons hier beperken tot een vereenvoudigde bespreking met water en bloed als de twee belangrijkste bouwstenen van weefsels. De absorptiecoëfficiënt voor water is laag in het zichtbare gebied, maar neemt toe in het infrarood (IR) gebied. In de praktijk wordt de waterabsorptie in weefsels pas dominant voor golflengten boven  $\pm 1000\text{nm}$ . In het zichtbare gebied en het nabije IR daarentegen is absorptie door hemoglobine in bloed de bepalende factor. Hemoglobine komt voor als oxyhemoglobine ( $\text{HbO}_2$ ) en deoxyhemoglobine ( $\text{Hb}$ ) en beide vertonen zeer sterke absorptie voor golflengten korter dan  $600\text{nm}$ . Nabij deze golflengte bevindt zich een kritisch gebied waarin de absorptiecoëfficiënt daalt over twee grootteordes binnen enkele tientallen nanometer (figuur 2.4). Afhankelijk van de precieze samenstelling van de weefsels, wordt de minimale absorptie typisch rond  $700\text{nm}$  waargenomen.

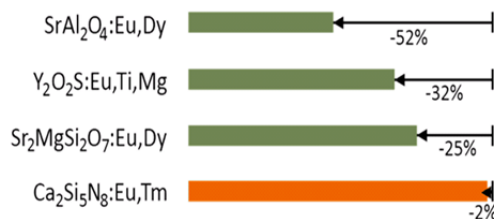


**Figuur 2.4:** Relatieve absorptie van water, oxyhemoglobine en deoxyhemoglobine in functie van de golflengte en indicatie van het optisch venster van weefsel [13].

De effectieve attenuatie in weefsel is niet enkel afhankelijk van de absorptie, maar ook van verstrooiing en een correctiefactor voor de anisotropie in weefsel. Deze correctiefactor voor de anisotropie heeft een vrij beperkte invloed op de effectieve attenuatie en zal hier niet behandeld worden. Scattering vergroot de gemiddelde afgelegde weg doorheen het weefsel en versterkt bijgevolg het effect van absorptie. De verstrooiing neemt systematisch af bij groter wordende golflengten [5]. De daling is echter vrij geleidelijk en de invloed van scattering op de effectieve attenuatie is dan ook weinig golflengteafhankelijk. Op die manier wordt voor de effectieve attenuatie, net zoals voor de absorptie ook een minimale waarde bekomen rond  $700\text{nm}$ . Het omringende spectraal gebied waarin de effectieve attenuatie laag blijft, vormt het weefsel optisch venster. Voor de meeste types weefsel strekt dit venster zich uit in het rode en nabije infrarode gebied tussen  $600\text{nm}$  en  $1300\text{nm}$ .

## 2.5 Chemische stabiliteit

Een groot aantal van de gekende persistente luminescente materialen is niet stabiel in waterig milieu of verliest een deel van zijn persistente intensiteit na een zekere tijd in oplossing. Voor *in vivo* medische toepassingen is de chemische stabiliteit uiteraard van groot belang aangezien de deeltjes stabiel moeten zijn in de bloedbaan en de rest van het lichaam. Voor efficiënte detectie moet een intensiteitsafname in waterige oplossing eveneens vermeden worden.  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  beschikt in dit opzicht over excellente kwaliteiten. Na 2 jaar opslag in water werd een intensiteitsdaling van amper 2% waargenomen, waaruit kan besloten worden dat het over een uitstekende chemische stabiliteit beschikt [2]. Dit is lang niet voor alle fosforen het geval (figuur 2.5).



**Figuur 2.5:** Afname van afterglow intensiteit na 2 jaar opslag in water voor verschillende fosforen [2].

Bij *in vivo* medische beeldvorming ondergaan de nanopartikels (NPs) vaak een voorafgaande oppervlaktebehandeling waardoor de chemische stabiliteit sterk gewijzigd wordt. Door een coating aan te brengen wordt het oppervlak van de partikels gepassiveerd en treedt minder snel degradatie op [14, 15]. Hierbij dient opgemerkt dat een coating de degradatie kan afremmen maar vaak niet kan vermijden. Dit is vooral belangrijk wanneer NPs of QDs gebruikt worden die toxische ionen bevatten. Vaak blijven deze partikels geruime tijd in het lichaam aanwezig en laatijdige degradatie kan alsnog ernstige toxische effecten uitlokken [14, 15]. Een coating heeft niet enkel een stabiliserende werking maar zorgt er ook voor dat de partikels niet als lichaamsvreemd worden ervaren. Hierdoor neemt de circulatietijd in het bloed toe [16]. In de meeste gevallen worden hydrofiële polymeren zoals polyethyleenglycol (PEG) aan het oppervlak van de NPs aangehecht. De polymeren vormen een beschermende corona rond de partikels en zorgen onder andere voor een sterische stabilisatie [6, 15, 16]. De fysicochemische eigenschappen worden voornamelijk bepaald door de lengte van de polymeerketen, de vorm, en de dichtheid van PEG op het oppervlak van de NPs [16].

## 2.6 Deeltjesgrootte

Naast de eerder besproken chemische stabiliteit en optische eigenschappen van de persistente fosforen, is ook de grootte van de luminescente deeltjes belangrijk voor *in vivo* beeldvorming. De gewenste deeltjesgrootte is uiteraard sterk afhankelijk van de beoogde toepassingen, maar partikels met submicron afmetingen zijn sowieso noodzakelijk om een goede distributie in het lichaam te verkrijgen [16]. Om makkelijk in cellen binnen te dringen zijn partikels met een diameter van 25-30nm het meest geschikt [17]. Indien men bovendien in celkernen wil binnendringen, worden diameters van enkele nanometer noodzakelijk en moet men zich beroepen op kwantumdots [14, 15]. Grote deeltjes ( $>100\text{nm}$ ) worden snel in de lever of de milt opgenomen waardoor ze slecht in het lichaam gedistribueerd worden. Zeer kleine NPs ( $\leq 10\text{nm}$ ) anderzijds worden uitgescheiden via de nieren en circuleren ook maar een beperkte tijd in de bloedbaan [16]. Het dient hierbij opgemerkt dat de biodistributie niet alleen door de deeltjesgrootte wordt bepaald, maar in sterke mate ook door de oppervlaktecoating en de oppervlaktelading [14, 16]. Enkele voorbeelden hiervan zullen aan bod komen in sectie 2.8.

In deze masterproef werd gestreefd naar deeltjes met een diameter rond de 100nm. Deze partikels kunnen een behoorlijk lange tijd in de bloedbaan gehouden worden en laten dus een goede biodistributie in het lichaam toe [16]. Anderzijds zenden 100nm deeltjes meer licht uit dan kleinere partikels en wordt ook verwacht dat ze minder toxisch zijn dan hun kleinere variant [15]. Daarom lijkt 100nm een goed compromis tussen biodistributie enerzijds en toxiciteit en lichtemissie anderzijds.

## 2.7 Vereisten voor persistente *in vivo* probes en $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ als kandidaat

Op basis van eerder besproken onderwerpen in dit hoofdstuk, kunnen een aantal vereisten vooropgesteld worden waaraan persistente fosforen moeten voldoen voor *in vivo* beeldvorming:

- Lange en intense persistente luminescentie
- Emissie in het (infra)rode gebied voor lage weefselattenuatie
- Goede chemische stabiliteit in waterig milieu
- Omvormbaar tot nanopartikels
- De nanopartikels mogen geen (of zeer weinig) toxiciteit uitlokken

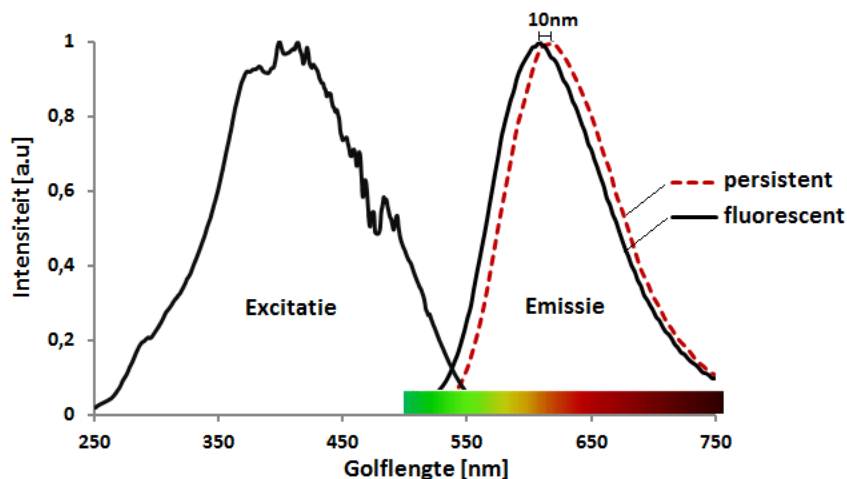
Indien men de mogelijkheid voor herexcitatie tijdens het experiment wil behouden, komt hier een zesde vereiste bij. Een excitatiespectrum dat zich uitstrekt in het zichtbare gebied is dan immers sterk aangewezen. Het belang van elk van deze vereisten spreekt voor zich: een langdurige en intense persistentie alsook emissie in een spectraal gebied met weinig weefselattenuatie, verbeteren de detectie van het luminescente signaal. Een goede chemische stabiliteit in waterig milieu is noodzakelijk aangezien de deeltjes in de bloedbaan geïnjecteerd worden en ook de noodzaak aan niet-toxische nanopartikels voor *in vivo* toepassingen is vanzelfsprekend. Het belang van eventuele herexcitatie met zichtbaar licht in plaats van UV licht, is eveneens voor de hand liggend.

De vraag die zich stelt, is of er fosforen beschikbaar zijn die aan bovenstaande vereisten voldoen. Het antwoord op deze vraag is natuurlijk afhankelijk van hoe streng men deze eisen handhaaft, maar algemeen kan gesteld worden dat het aantal geschikte fosforen zeer beperkt is. In de volgende sectie (sectie 2.8) zullen enkele rood emitterende persistente fosforen vermeld worden alsook de geschiktheid ervan voor *in vivo* beeldvorming.

Een materiaal dat goed geschikt lijkt voor de beoogde toepassingen, is  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ . De persistente eigenschappen van dit materiaal werden voor het eerst gerapporteerd in 2009 [8, 18]. De uitstekende chemische stabiliteit van deze fosfor werd in sectie 2.5 reeds besproken. In figuur 2.6 kan bovendien waargenomen worden dat het persistente emissiespectrum in het oranje-rode gebied gelegen is en zich dus grotendeels in het optisch venster met minimale weefselattenuatie bevindt. Het fluorescente emissiespectrum en excitatiespectrum is eveneens weergegeven voor de volledigheid. Vergelijking van de persistente intensiteit van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  [7, 8, 19] met deze van de meest efficiënte fosforen zoals  $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu,Dy}$  [20] en  $\text{Sr}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7:\text{Eu,Dy}$  [21] in het groene en blauwe gebied, laat vermoeden dat de eigenschappen op dit vlak ondermaats zijn. Fosforen met een dergelijke persistente intensiteit die emitteren in het oranje of rode gebied, zijn echter onbekend. Ten opzichte van andere rode emitters lijkt  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  een goede persistentie te vertonen.

Er kan dus besloten worden dat  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  vrij goed aan de eerste drie vereisten voldoet. Verder in deze masterproef zal blijken dat ook aan de vierde voorwaarde voldaan is en dat





**Figuur 2.6:** Fluorescente excitatie- en emissiespectrum en persistente emissiespectrum van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$ . Het fluorescente emissiespectrum piekt bij 610nm en het persistente emissiespectrum bij 620m. Het fluorescente excitatiespectrum piekt rond 400nm.

de acute toxiciteit van de nanopartikels beperkt is. Uit eerder onderzoek blijkt bovendien dat het excitatiespectrum voor persistente emissie deels in het zichtbare gebied gelegen is [12]. De mogelijkheid voor herexcitatie blijft voor deze fosfor dus behouden.

## 2.8 Literatuur

De laatste decennia zijn er ontzettend veel artikels verschenen over een grote variëteit aan luminescente materialen. Allerhande gastmaterialen en luminescente centra werden met elkaar gecombineerd en hun eigenschappen werden getabelleerd en bediscussieerd [22]. Van de grote variëteit aan gastmaterialen, is momenteel maar van een vrij beperkt aantal geweten dat ze aanleiding geven tot persistente eigenschappen. De aluminaten en de silicaten vormen hierbij de grootste groep, maar ook voor een klein aantal andere componenten werd persistente luminescentie waargenomen. Dit heeft uiteindelijk geleid tot enkele tientallen gekende persistente fosforen, waarvan de overgrote meerderheid emitteert in het blauwe of groene spectraal gebied. Het aantal rood of nabij infrarood emitterende fosforen is echter beperkt. In veel gevallen is de rode of infrarode persistentie gebaseerd op  $\text{Eu}^{2+}$  of  $\text{Cr}^{3+}$  emissie. Enkele gekende materialen met een rode of infrarode emissie zijn  $\text{CaS}:\text{Eu},\text{Tm}$  (650nm) [23],  $\text{Ca}_2\text{SiS}_4:\text{Eu},\text{Nd}$  (660nm) [24],  $\text{MgSiO}_3:\text{Eu},\text{Dy},\text{Mn}$  (660nm) [25],  $\text{Ca}_{0,2}\text{Zn}_{0,9}\text{Mg}_{0,9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu},\text{Dy},\text{Mn}$  (690nm) [6] en  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  (610nm) [8, 18]. Voorbeelden van chroom gedopeerde materialen zijn  $\text{LiGa}_5\text{O}_8:\text{Cr}$  (716nm) [26] en  $\text{ZnGa}_2\text{O}_4:\text{Cr}$  (696nm) [27]. Met enig kunst- en vliegwerk kunnen ook intense groene of blauwe persistente fosforen aangewend worden om persistent rode emissie te verkrijgen. Zo werd de intens groene fosfor  $\text{SrAl}_2\text{O}_4:\text{Eu},\text{Dy}$  gecombineerd met een kleurconversie proces om rode emissie te verkrijgen [28], en de blauw-groene fosfor  $\text{Sr}_4\text{Al}_{14}\text{O}_{25}:\text{Eu},\text{Dy}$  werd hiertoe met  $\text{Cr}^{3+}$  gedopeerd [29]. Deze opsomming geeft een idee van de bestaande rode persistente fosforen maar is zeker niet volledig. Enkele van de hierboven vermelde materialen werden reeds getest voor *in vivo* toepassingen en zullen verder in deze literatuurstudie aan bod komen. Uiteraard zijn niet alle opgesomde fosforen bruikbaar voor *in vivo* toepassingen. De toxiciteit van zwavel en de chemische instabiliteit van de meeste sulfides, maakt bijvoorbeeld het gebruik van  $\text{CaS}:\text{Eu},\text{Tm}$  en  $\text{Ca}_2\text{SiS}_4:\text{Eu},\text{Nd}$  onmogelijk.

In wat volgt wordt een beknopt overzicht gegeven van enkele persistente fosfors die reeds getest werden specifiek voor *in vivo* beeldvorming. Daarna wordt ook de huidige stand van zaken geschetst wat betreft nanotoxicologisch onderzoek en tot slot wordt een korte beschouwing gegeven

over andere *in vivo* probes.

### 2.8.1 Persistente fosforen voor medische beeldvorming

De afwezigheid van een rode persistente fosfor heeft applicaties in medische beeldvorming lange tijd ontoegankelijk gehouden. Pas recentelijk zijn de eerste publicaties over dit thema verschenen. In 2007 werden persistente luminescente  $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu,Dy,Mn}$  nanodeeltjes geïnjecteerd in ongeschoren Zwitserse muizen [6]. Zoals eerder reeds vermeld werd, emitteert deze fosfor bij 690nm. De nanodeeltjes hadden een grootte van 50 tot 100nm en werden bekomen door vermalen van een kristallijn poeder met behulp van een mortier. De kleinste deeltjes werden samengebracht door middel van selectieve sedimentatie. De haalbaarheid van beeldvorming van diep gelegen weefsels werd bevestigd en de invloed van chemische oppervlakmodificatie werd getest. De oppervlaktefunctionalisatie bleek een verwaarloosbaar effect te hebben op de persistente eigenschappen, maar de biodistributie werd er sterk door beïnvloed. Het aanhechten van amino-functionele groepen aan de NPs gaf aanleiding tot accumulatie van NPs in de longen terwijl carboxylgroepen een opname in de lever veroorzaakten. Polyethyleenglycol (PEG) gecoate nanodeeltjes vertoonden een langere circulatietijd in het bloed maar na verloop van tijd werd opnieuw leveraccumulatie vastgesteld. De toxiciteit van de geïnjecteerde deeltjes werd in dit artikel echter niet onderzocht en de luminescente intensiteit was te laag voor praktische toepasbaarheid.

In de jaren na deze eerste publicatie werden nog een aantal verdere onderzoeken uitgevoerd op hetzelfde materiaal. Het effect van de diameter van de nanodeeltjes alsook de lengte van de PEG groep op de biodistributie werd onderzocht [30]. De lengte van de PEG groep bleek weinig invloed te hebben op de NP accumulatie terwijl de diameter van de nanodeeltjes hierbij wel cruciaal bleek. De verhouding tussen de hoeveelheid NPs in de bloedsomloop t.o.v. deze in de organen was verhoogd met een factor 33 voor 80nm in vergelijking met 180nm deeltjes. De distributie van 180nm deeltjes bleek bovendien heel sterk tijdsafhankelijk, met steeds groter wordende accumulatie in de lever en de milt. Een van de belangrijkste algemene conclusies was echter de ontoereikende *afterglow* van het onderzochte materiaal. De slechte persistente eigenschappen verhinderden een langdurige en nauwkeurige meting. Het detecteren van de kleinste nanodeeltjes, met betere biodistributie, werd daardoor bijna onmogelijk.

Om de langdurige detectie te verbeteren, werd door dezelfde Franse onderzoeksgroep begin 2012 een nieuw gastmateriaal onderzocht [31]. Het onderzochte silicaat gastmateriaal is diopsiet ( $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$ ) en de invloed van verschillende trivalente lanthanide dopanten werd getest. Praseodymium bleek aanleiding te geven tot de beste persistente eigenschappen en uiteindelijk werd  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6:\text{Eu,Mn,Pr}$  voorgesteld als nieuw materiaal voor *in vivo* beeldvorming. Deze fosfor emitteert bij 685nm en vertoont een langdurige persistentie.  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6:\text{Eu,Mn,Pr}$  nanopartikels werden tot slot ook geïnjecteerd in muizen. Hieruit bleek dat deze NPs ongeveer 5 keer meer signaal opleveren dan de eerder gerapporteerde  $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu,Dy,Mn}$  partikels [6, 30].

Verder is er begin 2012 nog een nieuw artikel verschenen over *in vivo* medische beeldvorming, deze keer gebruik makend van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  nanodeeltjes [2]. De persistente emissiegolflengte van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  (620nm) is wegens de licht verhoogde weefselattenuatie t.o.v.  $\text{Ca}_{0.2}\text{Zn}_{0.9}\text{Mg}_{0.9}\text{Si}_2\text{O}_6:\text{Eu,Dy,Mn}$  (690nm) iets minder geschikt voor *in vivo* toepassingen. De verbeterde persistente intensiteit echter maakt dit materiaal alsnog superieur [8]. De nanodeeltjes werden in dit geval niet alleen verkregen door selectieve sedimentatie maar eveneens door gepulste laserablatie (PLAL). De deeltjesgrootte bekomen met PLAL was van de orde 3-5nm en de duur van de persistente luminescentie was sterk afgenomen ten opzichte van het bulkpoeder. De persistente luminescente eigenschappen van de PLAL nanopartikels bleken dan ook ont-

reikend voor beeldvormingsexperimenten. Op basis van selectieve sedimentatie na het vermalen van het bulk poeder, werden 200nm deeltjes verkregen die wel bruikbaar waren voor *in vivo* beeldvorming. Deze werden gefunctionaliseerd met een PEG- of hydroxyl-groep en na excitatie geïnjecteerd in levende muizen. Het signaal komende van de nanoprobees was detecteerbaar door levende weefsels, ondanks de emissiegolflengte aan de rand van het optisch venster. Een onderzoek naar de toxiciteit werd ook in dit geval niet uitgevoerd.

Het loont de moeite om hier nog even verder in te gaan op de mogelijkheid tot persistente eigenschappen bij 3-5nm  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  deeltjes. Enkele eenvoudige berekeningen tonen immers aan dat dergelijke partikels quasi onmogelijk persistente lichtemissie kunnen vertonen. Het aantal atomen in een 3nm  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  deeltje kan berekend worden op basis van de eerder gerapporteerde roosterparameters voor dit materiaal [32]:

$$a = 1.4352\text{nm}$$

$$b = 0.5610\text{nm}$$

$$c = 0.9689\text{nm}$$

$$\beta = 112.06^\circ$$

In de eenheidscel (met volume  $abc\sin(\beta)$ ) bevinden zich 4 formule-eenheden  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  ( $Z=4$ , [32]) en dus 60 atomen. Bijgevolg bevat een deeltje met een diameter van 3nm ongeveer 1173 atomen, waarvan 156 Ca atomen. Voor een  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  partikel met 1mol% Eu en Tm dopanten (m.a.w. 1% substitutie van de Ca ionen), impliceert dit dat er zich 1 à 2 Eu en Tm dopanten in het 3nm deeltje bevinden. Statistisch gezien zullen een groot aantal 3nm deeltjes niet tegelijkertijd Eu en Tm ionen bevatten. Het wordt snel duidelijk dat dit tot problemen kan leiden voor persistent luminescente materialen. Het principe van persistente luminescentie is immers gebaseerd op de overdracht van een geëxciteerd elektron in de activator naar een val (sectie 2.2). In  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  is Eu de activator die zorgt voor lichtemissie en de vallen zijn mogelijk Tm gerelateerd [12]. De Eu ionen moeten zich voldoende dicht bij een val bevinden om persistente lichtemissie te kunnen veroorzaken. Tegelijkertijd moeten ze ook ver genoeg verwijderd zijn van andere defecten die niet-radiatief verval veroorzaken. Dit is meteen de reden waarom persistente luminescentie in zeer kleine partikels quasi onmogelijk wordt. Voor de 3nm deeltjes kan berekend worden dat ongeveer 445 van de 1173 atomen, of dus ongeveer 38%, zich nabij het oppervlak bevinden (deeltje sferisch ondersteld). Voor Eu dopanten aan het oppervlak wordt de kans op een naburige val gereduceerd en bovendien zijn deze atomen meer onderhevig aan niet-radiatieve recombinatie en *quenching* effecten [2]. Indien men persistente luminescentie voor *in vivo* beeldvorming wil gebruiken, zijn grotere partikels met een kleinere oppervlak tot volume verhouding dus noodzakelijk [2].

Zeer recentelijk (maart 2013) werd tot slot een artikel gepubliceerd over de optisch stimuleerbare persistente emissie van  $\text{LiGa}_5\text{O}_8:\text{Cr}$  in het nabije infrarood (716nm) [26]. Na excitatie met UV licht, vertoont het materiaal een zeer langdurige (>1000 uur) persistente emissie bij 716nm. Bovendien kan de persistente emissie achteraf, tot meer dan 1000 uur na de UV excitatie, opnieuw optisch gestimuleerd worden met zichtbaar of nabij infrarood licht. Dit zorgt voor een tijdelijke aanwakkering van de persistente intensiteit en staat in contrast met optisch stimuleerbare fluorescente emissie zoals waargenomen wordt in de meeste andere fotostimuleerbare materialen. Het potentieel van  $\text{LiGa}_5\text{O}_8:\text{Cr}$  nanopartikels voor *in vivo* beeldvorming werd getest door deeltjes met een diameter van 50-150nm te injecteren in muizen. De zeer langdurige persistentie bij 716nm maakte nauwkeurige detectie mogelijk in de eerste uren na de injectie. Fotostimulatie zorgde er bovendien voor dat ook meerdere dagen na de injectie nog een goede detectie van de nanopartikels verkregen kon worden. De optische stimulatie gebeurde met een witte LED en het signaal van de nanopartikels kon op die manier zelfs tot tien dagen na de excitatie nog gedetecteerd worden. De optische eigenschappen van dit materiaal zijn dus duidelijk superieur ten opzichte van de eerder besproken fosforen. Men kan zich echter de vraag stellen of

$\text{LiGa}_5\text{O}_8:\text{Cr}$  wel geschikt is voor *in vivo* toepassingen. Zowel lithium, gallium als chroom doen ons vermoeden dat dit materiaal mogelijk een sterke toxiciteit uitlokt.

## 2.8.2 Nanotoxiciteit

De toxiciteit van nanopartikels wordt niet alleen bepaald door de chemische samenstelling van het materiaal, maar in belangrijke mate ook door de afmetingen en de vorm van de NPs. Aangezien de grootte van NPs van dezelfde orde is als deze van natuurlijke proteïnen, kunnen deze deeltjes plaatsen bereiken die voor grotere deeltjes ontoegankelijk zijn. Zo kunnen NPs bijvoorbeeld doordringen in de cellen of door de placentabarrière van zwangere proefdieren. Over de mogelijke toxiciteit van persistent luminescente  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  nanopartikels werd tot op heden niets gerapporteerd en er zijn geen gegevens beschikbaar over chemisch gelijkaardige materialen.

Men zou kunnen beargumenteren dat het effect van de deeltjesgrootte voorspeld kan worden op basis van onderzoek naar andere nanodeeltjes. De gerapporteerde resultaten hierover zijn echter verre van consistent en eenduidig. Bovendien kan er lang niet altijd een duidelijk verband gevonden worden tussen de toxiciteit en de deeltjesgrootte. Vaak spelen andere parameters zoals de oppervlakte-eigenschappen tevens een belangrijke rol. Partikels met dezelfde grootte kunnen dus een sterk verschillende toxiciteit vertonen. Nanotoxicologisch onderzoek wordt vaak uitgevoerd door het effect van NPs op cellen in cultuur te analyseren (*in vitro* experimenten). Een grondige kennis van de interactie tussen cellen en NPs ontbreekt echter nog steeds. Het onderzoek naar nanotoxiciteit wordt o.a. gecompliceerd door de grote variëteit aan soorten NPs, stabiliserende coatings, fysicochemische eigenschappen van de NPs (zoals oppervlaktelading en diameter), types van gebruikte cellen, types onderzoeken en proeven, incubatiecondities,...[14]. Deze grote variëteit aan mogelijke onderzoekstechnieken en soorten nanopartikels maakt het vergelijken van resultaten uit verschillende onderzoeken moeilijk en zorgt ervoor dat veel onduidelijkheid blijft bestaan over de veiligheid van NPs voor medische toepassingen. Voor de toxiciteitsproeven in deze masterproef zal dus vanuit een beperkte voorkennis vertrokken worden.

## 2.8.3 Andere *in vivo* probes

Zoals in het inleidende hoofdstuk reeds vermeld werd, vormen de persistent luminescente partikels in deze masterproef een mogelijk alternatief voor de momenteel vaak gebruikte radioactieve tracers of fluorescente deeltjes bij *in vivo* beeldvorming. Het nadeel van radioactieve tracers is uiteraard de schadelijke straling waaraan de patiënt wordt blootgesteld en de bijhorende stralingsbelasting. De nadelen van fluorescente probes zijn de noodzaak voor continue herexcitatie en de bijhorende problemen met autofluorescentie (zie inleidend hoofdstuk).

Naast persistente materialen worden vaak ook kwantumdots (QDs) vermeld als mogelijke *in vivo* probes. De excellente optische eigenschappen van QDs zoals de hoge fluorescente intensiteit, het smalbandige emissiespectrum en breedbandig excitatiespectrum, maken van deze materialen eveneens aantrekkelijke kandidaten [14]. De praktische bruikbaarheid ervan is echter sterk afhankelijk van toxicologische resultaten, dewelke op zich nog sterk afhangen van het type QD en een eventuele oppervlaktelaag of *core-shell* structuur [14, 15]. De hierover gepubliceerde resultaten laten nog ruimte voor heel wat discussie. De QDs zijn door de grote oppervlakte tot volume verhouding zeer reactief en kunnen dankzij hun afmetingen (orde nm) dieper in cellen en andere structuren binnendringen. Algemeen wordt dan ook verwacht dat persistente luminescente partikels, met een diameter rond de 100nm, vanuit toxicologisch standpunt beter zullen scoren dan de kleinere QDs [14, 15].

## Hoofdstuk 3

# Experimentele methoden

### 3.1 Bereidingsmethode

De poeders in deze masterproef werden bereid met een vastestofreactie op  $1300^{\circ}\text{C}$  gedurende 3 uur onder een reducerende atmosfeer (90%  $\text{N}_2$ , 10%  $\text{H}_2$ ). Het vormingsgas wordt aangewend om oxidatie te vermijden en kan ook eventuele stikstoftekorten tijdens de reactie opvangen. Het bakken gebeurt in een kwartsbuis van de oven en de poeders bevinden zich in alumina bootjes. Het gastmateriaal  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  wordt bekomen door stoichiometrisch hoeveelheden  $\text{Ca}_3\text{N}_2$  (99%, Alfa Aesar) en  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  (99,85%, Alfa Aesar) te mengen. Het wegen, malen en mengen van deze materialen gebeurt onder een beschermende  $\text{N}_2$  atmosfeer om oxidatie ook in deze processtap zoveel mogelijk te vermijden. De Eu en Tm dopanten worden steeds toegevoegd onder de vorm van fluorides ( $\text{EuF}_3$ , 99,5%, Alfa Aesar en  $\text{TmF}_3$ , 99,9%, Alfa Aesar) en tenzij anders vermeld, wordt 1mol% Eu en Tm gebruikt (m.a.w. 1% substitutie van de Ca ionen).

#### 3.1.1 Optimalisatie van $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,Tm}$

In het volgende hoofdstuk zal besproken worden welke aanpak in deze masterproef gebruikt werd om de persistente intensiteit van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,Tm}$  te verbeteren. Dit materiaal werd in het verleden echter reeds uitvoerig onderzocht en is bijgevolg al sterk geoptimaliseerd [7, 8, 19]:

- Verschillende codopanten R in  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,R}$  (R=Dy, Nd, Sm, Ho and Tm) werden onderzocht, waaruit Tm als beste kandidaat naar voor kwam
- De concentratie van Eu en Tm werd geoptimaliseerd (afhankelijk van het bakproces)
- De invloed van baktijd en -temperatuur werd onderzocht
- Eu en Tm werden onder de vorm van oxides ( $\text{ZA}_2\text{O}_3$  met ZA= Eu, Tm) en/of fluorides ( $\text{ZAF}_3$  met ZA= Eu, Tm) toegevoegd
- De verhouding van de startproducten  $\text{Ca}_3\text{N}_2$  en  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  werd gevarieerd

De hieruit volgende conclusies worden dan ook toegepast bij het maken van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,Tm}$  in deze masterproef. Om deze reden wordt gekozen voor Eu en Tm dopering in fluoridevorm, een ondermaat aan  $\text{Ca}_3\text{N}_2$  van 5% en een Eu en Tm concentratie van 1mol% (1% substitutie van de Ca ionen). De optimale concentratie van Eu en Tm lijkt iets minder dan 1mol% te zijn [19], maar er wordt voor 1mol% geopteerd om betere reproduceerbaarheid van de resultaten na te sterven.

## 3.2 Omvorming tot nanodeeltjes

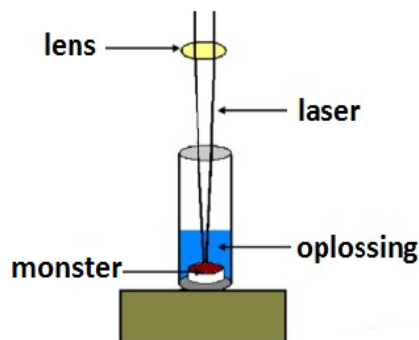
Uit de vastestofreactie besproken in sectie 3.1 wordt het materiaal in poedervorm verkregen. De korrels in dit poeder hebben een typische grootte van enkele micrometer en het poeder is dus niet rechtstreeks bruikbaar voor *in vivo* toepassingen. Om de korrels te reduceren tot deeltjes met een diameter rond de 100nm, werden in essentie twee technieken gebruikt: gepulste laser ablatie (PLAL) en malen in oplossing (*wet grinding*). De deeltjes werden daarna gekarakteriseerd met DLS en SEM (zie sectie 3.6 en sectie 3.7).

### 3.2.1 Gepulste laser ablatie in oplossing

Het gebruik van gepulste laser ablatie werd reeds gerapporteerd voor de productie van metalen of halfgeleidende NPs en zelfs voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  partikels [2]. Het principe op zich is zeer eenvoudig: een gepulste laserbundel wordt met een lens gefocust op het proefstuk dat zich in een oplossing bevindt (figuur 3.1(b)). Het proefstuk wordt gebruikt onder de vorm van een pellet, wat het verwijderen van het macroscopische materiaal na het experiment eenvoudig maakt. De energie van de laserpuls wordt aangewend om NPs van de pellet te verwijderen en de losgemaakte deeltjes blijven achter in het oplosmiddel. Na het beëindigen van het experiment wordt de pellet verwijderd en kan de resterende colloïdale oplossing onderzocht worden. De gebruikte laser is een stikstof laser met emissiegolflengte 337nm, puls frequentie 1Hz, maximale pulsenergie 2,5mJ en pulsduur 800ps.



(a) planetaire ballenmolen



(b) principe van PLAL

**Figuur 3.1:** Planetaire ballenmolen (links) en het werkingsprincipe van PLAL (rechts)

### 3.2.2 Malen in oplossing

De PLAL experimenten nemen meerdere uren in beslag en de hoeveelheid nanomateriaal dat verkregen wordt is heel beperkt (typisch minder dan 1mg op meerdere uren). Een eenvoudigere en snellere methode voor het vernalen van de poeders, maakt gebruik van malen in oplossing. Hiervoor werd gebruik gemaakt van een planetaire ballenmolen (Pulverisette 5, Fritsch, figuur 3.1(a)). Bij het malen in oplossing, wordt het poeder samen met een oplosmiddel en de maalkogels in een container geplaatst. Zowel de maalkogels als de container zijn gemaakt uit boorcarbide, een van de hardst bestaande materialen. Wanneer het toestel in werking treedt, roteert de grondtafel in de ene richting terwijl de containers in de andere richting roteren. Beide rotatiesnelheden kunnen ingesteld worden en bedragen typisch enkele honderden toeren per minuut (rpm). In deze masterproef werd voor beide rotatiesnelheden 400rpm gekozen.

### 3.3 Meten van emissie- en excitatiespectrum

De emissie- en excitatiespectra (zoals gedefinieerd in hoofdstuk 2) kunnen bepaald worden door gebruik te maken van een nauwkeurige spectrometer voorzien van de nodige monochromators. Lumilab heeft hiervoor de Edinburgh FS920 fluorescentiespectrometer beschikbaar.

Het emissiespectrum wordt standaard opgemeten onder continue belichting van het monster. De golflengte van het excitatielicht kan gekozen worden tussen  $\pm 250\text{nm}$  en  $\pm 800\text{nm}$ . Dit golflengtebereik is afkomstig van het bruikbare emissiespectrum van de exciterende Xe booglamp. De excitatiegolflengte wordt vast gekozen en de detector meet sequentieel de emissie bij verschillende golflengten. Als de meting onder continue belichting van het proefstuk plaatsvindt, wordt het fluorescente en niet het persistente emissiespectrum opgemeten. Beide zijn vaak erg gelijkaardig, doch niet steeds samenvallend. De detectie van het persistente spectrum is minder makkelijk aangezien dit in het ideale geval een (quasi) gelijktijdige meting bij alle golflengten zou vereisen, terwijl de Edinburgh FS920 sequentieel de verschillende golflengten detecteert. Lang genoeg na het afschakelen van de excitatie, komt men echter in een regime terecht waarin de uitgezonden intensiteit zeer traag afneemt in functie van de tijd. Door in dit regime een aantal snelle metingen uit te voeren, kan alsnog een goed resultaat voor het persistente emissiespectrum verkregen worden.

Het excitatiespectrum wordt opgemeten door de golflengte van het excitatielicht over een bepaald gebied te variëren en de detector tegelijkertijd bij een vaste emissiegolflengte te laten detecteren. Deze meting geeft aanleiding tot het excitatiespectrum met betrekking tot fluorescente emissie. Het excitatiespectrum voor persistente emissie kan hiervan echter afwijken, maar dit spectrum werd tijdens deze masterproef niet opgemeten [12].

### 3.4 Meten van de nalichtingstijd

Naast het eerder besproken emissie- en excitatiespectrum, is de nalichtingstijd van de fosfor uiteraard van cruciaal belang voor de kwaliteit en bruikbaarheid ervan. De nalichtingstijd wordt bepaald als zijnde de tijd na het afleggen van de excitatie vooraleer de grens van  $0.32\text{mcd}/\text{m}^2$  bereikt wordt. Hierbij is  $0.32\text{mcd}/\text{m}^2$  een vaak gebruikte drempel die ongeveer overeenkomt met 100x de gevoeligheid van het menselijke oog.

Met behulp van de Edinburgh FS920 spectrometer kan de vervalcurve opgemeten en gevisualiseerd worden bij een vast gekozen emissiegolflengte. Het nadeel is echter dat deze methode een intensiteit in arbitraire eenheden oplevert en dat geen waarde voor de nalichtingstijd kan gedefinieerd worden. De mogelijkheid om quasi ogenblikkelijk het verval te detecteren na het afschakelen van de excitatie, is dan weer een voordeel van deze spectrometer.

De meetopstelling die in deze masterproef hoofdzakelijk gebruikt werd, maakt gebruik van een gekalibreerde fotometer (ILT 1700, International Light Technologies lichtmeter). Het voordeel van deze opstelling is de mogelijkheid om absolute waarden voor de intensiteit op te meten, bijvoorbeeld uitgedrukt in candela per vierkante meter. Hiervoor is een conversie nodig van de spectraal opgemeten intensiteit naar een absolute meetwaarde die karakteristiek is voor het volledige spectrum. Deze conversie wordt standaard uitgevoerd met behulp van een fotopische filter, die rekening houdt met de ooggevoeligheidscurve in fotopisch zicht. Tijdens de experimenten wordt gebruikt gemaakt van een twee minuten durende excitatie met een ongefilterde Xe booglamp bij 1000 lux. De proefstukken worden aangewend onder de vorm van pellets. Na de excitatie moet de pellet goed gepositioneerd worden voor de detector, waarvoor het proefstuk of de detector dient verplaatst te worden. Dit zorgt ervoor dat de eerste seconden van het nalichten niet kunnen opgemeten worden.

Naast de nalichtingstijd, hier gedefinieerd op basis van de drempelwaarde  $0.32\text{mcd}/\text{m}^2$ , kunnen ook andere methoden gebruikt worden om het persistente verval (de *afterglow*) te karakteriseren. Zo probeert men de *afterglow* vaak te fitten aan een exponentiële functie, een combinatie van exponentiëlen, of een machtswet. Het persistente verval kan echter zelden goed beschreven worden door een enkele exponentiële en het eindeloos combineren van exponentiëlen levert weinig fysisch relevante informatie. In deze masterproef is ervoor geopteerd om de *afterglow* te modelleren door middel van onderstaande formule, die vaak een goede beschrijving van de vervalcurve geeft [33, 34, 35]:

$$I(t) = \frac{I_0}{(1 + \frac{t}{\tau})^b}. \quad (3.1)$$

De vervalcurven worden gefit aan deze formule door een minimalisatie van de kwadratische fout. We zijn hierbij voornamelijk geïnteresseerd in de vervalconstante  $b$ , dewelke ook geschat kan worden met behulp van een rechte trendlijn in een log-log plot. Indien we in het vervolg spreken over een vervalconstante, wordt dus steeds deze parameter bedoeld. Deze methoden om de vervalconstante te bepalen zijn uiteraard enkel zinvol indien de opgemeten vervalcurve goed aan bovenstaande formule kan gefit worden en indien men dus voldoende lang na het afschakelen van de excitatie ook effectief een rechte bekomt in een log-log plot. Voor de onderzochte materialen blijkt de vervalcurve goed benaderd te kunnen worden op deze manier en beide methoden leveren steeds zeer gelijkaardige resultaten op voor de vervalconstante (zie hoofdstuk 4).

### 3.5 Meten van thermoluminescentiespectra

Voor de TL metingen werd gebruik gemaakt van een opstelling die aanwezig is binnen Lumi-lab. De optische excitatie gebeurt met een LED die door middel van een optische fiber op het proefstuk wordt gericht. Het proefstuk wordt aangebracht op een *heating/cooling stage* en de temperatuur wordt geregeld met behulp van een TCU 100 thermocontroller (Anton Paar) en een vloeibare stikstof pomp LNC (Anton Paar). Dit maakt het mogelijk om zowel bij lage als hoge temperaturen te exciteren en te meten. Het licht uitgezonden door het proefstuk wordt gedetecteerd door middel van een ProEM1600 EMCCD camera gekoppeld aan een Acton SP2300 monochromator (beide van Princeton Instruments). Alle apparatuur wordt aangestuurd en uitgelezen via NI LabVIEW software.

### 3.6 Meten van diameter en zetapotiaal met DLS

In deze masterproef werden twee methoden gebruikt om de diameter van de nanodeeltjes te bepalen. Enerzijds kan een SEM-beeld de vorm en grootte van individuele deeltjes blootleggen en anderzijds is *dynamic light scattering* (DLS) geschikt voor meting van de gemiddelde hydrodynamische diameter van de deeltjes in suspensie. De diameters bekomen met beide methoden verschillen echter enigszins van elkaar en de DLS-metingen geven aanleiding tot grotere diameters. De partikels worden in oplossing immers steeds omgeven door een aantal ionen van het oplosmiddel, dewelke een solvatatieschil vormen die vrij vast gebonden is aan het nanodeeltje. Het geheel van deeltje en solvatatieschil zal zich gedragen als één entiteit en de hydrodynamische diameter zal ook door dit geheel bepaald worden.

DLS-metingen maken gebruik van de Brownse beweging van kleine ( $\leq 1\mu\text{m}$ ) gesolvateerde deeltjes om de hydrodynamische diameter te bepalen. Vaak worden de deeltjes hierbij sferisch ondersteld. Grotere deeltjes diffunderen trager en de Brownse beweging van de colloïdale deeltjes is dus in belangrijke mate afhankelijk van de diameter. Een laserbundel wordt op het proefstuk gericht en de nanopartikels zorgen voor scattering van het licht. Uit de snelheid waarmee de



opgemeten intensiteit varieert, wordt een correlatiefunctie gegenereerd. Mits kennis van voldoende materiaalparameters (zowel van solvent als van opgeloste stof) kan hieruit een schatting van de hydrodynamische diameter bekomen worden (Stokes-Einstein vergelijking). De metingen worden uitgevoerd met een Zetasizer nano ZS (Malvern).

Naast het bepalen van de diameter, laat de DLS opstelling ook meting van de zetapotential toe. De zetapotential is een courant gebruikte maatstaf bij stabiliteitsbepaling van colloïdale oplossingen. Colloïdale oplossing zijn niet steeds stabiel aangezien nanopartikels vaak de neiging hebben om te aggregeren en zo hun oppervlakte-energie te verlagen. Eenvoudig gezegd stelt de zetapotential het potentiaalverschil tussen de oplossing en de rand van de solvatatieschil voor. Hierbij wordt de solvatatieschil bepaald als de stationaire laag van solventmoleculen die gehecht zijn aan het opgeloste nanodeeltje. Hoe hoger de absolute waarde van de zetapotential, hoe meer lading aan de deeltjes vastgehecht is en hoe sterker de repulsie tussen de NPs onderling. De elektrostatische repulsie werkt de attractieve Van der Waals krachten tegen en een sterk positieve of sterk negatieve zetapotential geeft dus aanleiding tot een grote stabiliteit. Parameters zoals de deeltjesgrootte, de densiteit of de pH kunnen de stabiliteit echter ook enigszins mee bepalen.

De zetapotential is niet rechtstreeks meetbaar, maar kan theoretisch berekend worden op basis van een experimenteel bepaalde elektroforetische mobiliteit. Deze mobiliteit beschrijft de beweging van geladen deeltjes in een elektrisch veld. Bij metingen van de zetapotential wordt een elektrisch veld aangelegd tussen twee elektrodes waardoor de deeltjes met een positieve (negatieve) zetapotential bewegen naar de negatieve (positieve) elektrode. De snelheid waarmee deze verplaatsing gebeurt, is onder andere evenredig met de grootte van de zetapotential. Toestellen zoals de Zetasizer nano ZS maken gebruik van een faseverschuiving tussen twee laserbundels om deze snelheid te bepalen. Mits kennis van voldoende materiaalparameters kan hieruit een waarde voor de zetapotential berekend worden (Smoluchowski theorie).

### 3.7 SEM, SEM-EDX en SEM-CL

Voor de *scanning electron microscopy* (SEM) beelden wordt gebruik gemaakt van een S-3400N (Hitachi) of Quanta 200F (FEI) elektronenmicroscop. Energie dispersieve X-stralen spectroscopie (EDX) gebeurt met behulp van een Noran 7 droog EDX systeem (Thermo Scientific). Bij de SEM-CL (cathodeluminescentie) metingen wordt een luminescentiedetector aangesloten op de elektronenmicroscop. De luminescentiedetector is een ProEM1600 EMCCD camera gekoppeld aan een Acton SP2300 monochromator (beide Princeton Instruments). De detector is golflengtegevoelig en het cathodeluminescentiespectrum wordt opgeslagen voor elke gescande pixel. Bij SEM-CL-EDX metingen worden de EDX en CL spectra gelijktijdig verzameld en de data worden opgeslagen in een grid met 128 op 92 pixels.

### 3.8 Meten van XRD spectra

Het gebruik van X-stralendiffractie (XRD) is een goed gekende en vaak gebruikte techniek voor het onderzoeken van kristalstructuren. De XRD opstelling maakt gebruik van een  $\theta - 2\theta$  diffractometer en structurele informatie over het monster wordt bekomen door het XRD spectrum te relateren aan de Bragg voorwaarde. De samenstelling van het materiaal wordt geanalyseerd door de opgemeten XRD spectra te vergelijken met de experimentele en/of theoretische data aanwezig in de *Powder Diffraction File*. De gebruikte opstelling is een D5000 diffractometer (Siemens).

# Hoofdstuk 4

## Resultaten

### 4.1 Verbeteren van $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$ voor *in vivo* beeldvorming

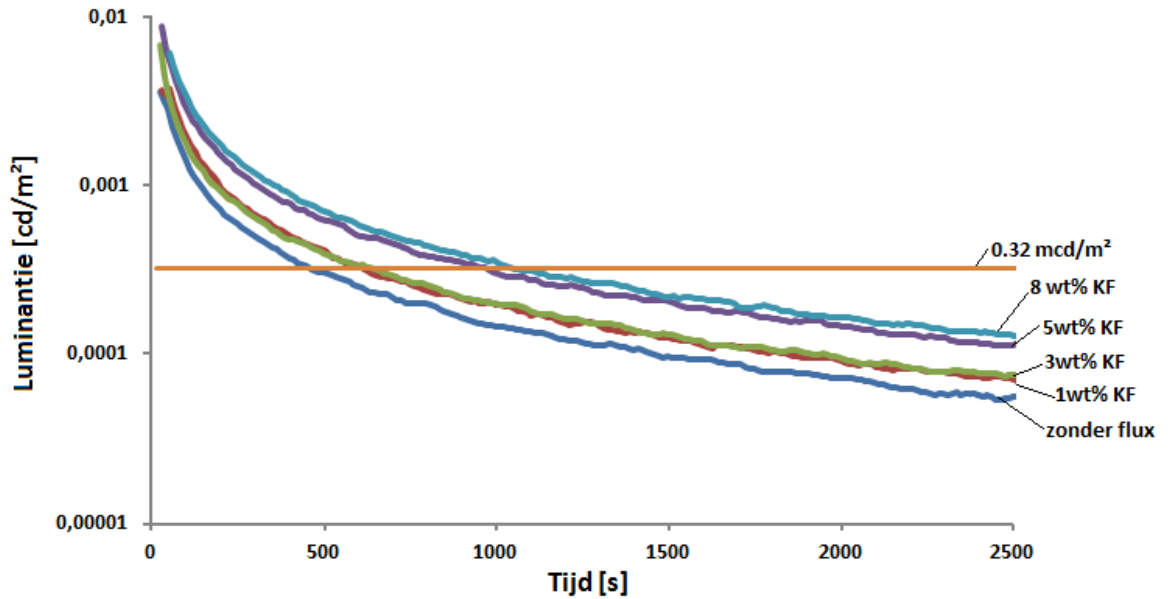
Op basis van de concepten besproken in hoofdstuk 2, is het duidelijk dat  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  essentieel op twee manieren verbeterd kan worden voor *in vivo* beeldvorming. Enerzijds is een verhoging van de persistente lichtemissie van primordiaal belang, aangezien dit de detectie verbetert en de noodzakelijk hoeveelheid geïnjecteerd materiaal doet afnemen. Anderzijds is ook het nastreven van een langere emissiegolflengte belangrijk voor het verkrijgen van optimale transmissie door weefsels. Beide aandachtspunten worden hierna besproken en de invloed op andere materiaaleigenschappen wordt hierbij ook in kaart gebracht.

#### 4.1.1 Verbeteren van de persistent luminescente intensiteit

De pogingen die in deze masterproef ondernomen worden om de persistente intensiteit te verhogen, zijn in hoofdzaak terug te brengen tot het toevoegen van fluxmaterialen. Deze fluxen worden toegevoegd om de reactie tussen de startproducten tijdens het bakken van de fosfor te verbeteren en zo het productieproces te optimaliseren. De fluxen zelf verlaten het mengsel grotendeels tijdens het bakproces door decompositie of evaporatie en zijn dus niet of nauwelijks in het eindproduct aanwezig. De materialen die aangewend werden als flux zijn KF,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en KCl. De keuze voor deze materialen was voornamelijk gebaseerd op eerder gerapporteerd gebruik van dergelijke materialen als flux in fosforen en hield ook rekening met de reducerende omstandigheden van de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  productie (zie sectie 3.1) [11]. De gebruikte gewichtspercentages (wt%) varieerden tussen 1 en 8 wt%.

#### Invloed van KF, $\text{NH}_4\text{Cl}$ of KCl flux op de persistente luminescentie

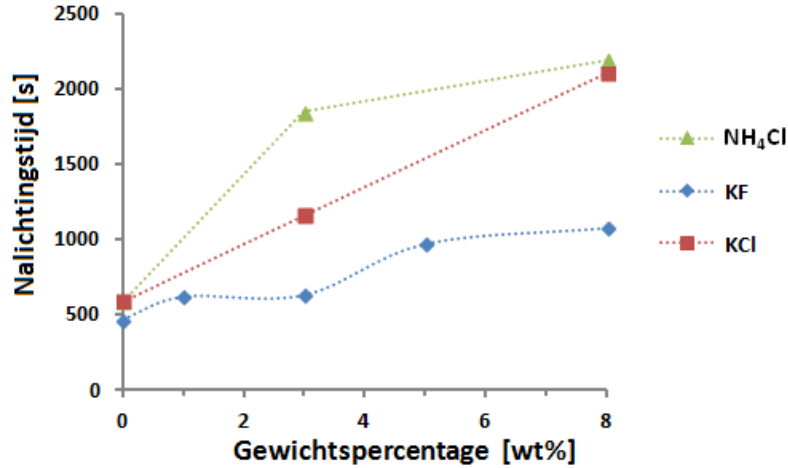
De invloed van KF flux wordt geïllustreerd in figuur 4.1 waarin de vervalcurven voor 5 verschillende materialen zijn weergegeven. De waarden op de x-as geven de tijd aan die verstreken is sinds het afschakelen van de excitatiebron. De opgemeten materialen zijn alle  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  maar 4 ervan werden geproduceerd met toevoeging van respectievelijk 1, 3, 5 en 8wt% KF als flux. De invloed van de flux is duidelijk zichtbaar in de vervalcurven: de materialen vertonen een gelijkaardig verval wat betreft vervalconstante (zie hoofdstuk 3), maar de luminescente intensiteit wordt sterk beïnvloed door het percentage flux. De intensiteit neemt vrij systematisch toe met de concentratie aan flux en het materiaal met 8wt% KF levert dus de sterkste luminescentie.



**Figuur 4.1:** Verval van de luminescente intensiteit na het uitschakelen van de excitatie voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met variabele KF flux (0, 1, 3, 5 en 8wt% KF).  $0,32\text{mcd}/\text{m}^2$  is de grens voor het bepalen van de nalichtingstijd.

Ook na toevoeging van  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of  $\text{KCl}$  flux werd het persistent luminescente verval opgemeten in functie van de tijd. Bij deze fluxen werd ervoor geopteerd om enkel materialen met 3 en 8wt% flux verder te onderzoeken. Een overzicht van de verkregen waarden voor de nalichtingstijden wordt gegeven in figuur 4.2. Ook bij het toevoegen van  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of  $\text{KCl}$  is de algemene tendens opnieuw een verhoogde nalichtingstijd door toevoeging van extra flux. Voor  $\text{NH}_4\text{Cl}$  is het verschil tussen het 3 en 8wt% sample echter vrij beperkt en de hoeveelheid flux lijkt hierbij dus minder cruciaal. Het is vooral belangrijk om op te merken dat de monsters met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of  $\text{KCl}$  flux superieur zijn ten opzichte van de eerder besproken monsters met KF flux. Voor de beste materialen (met 8wt% aan  $\text{KCl}$  of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux) is de nalichtingstijd zelfs meer dan verviervoudigd ten opzichte van het materiaal zonder flux. We merken in dit verband wel op dat de opgemeten nalichtingstijden voor het materiaal zonder flux kleiner zijn dan de eerder gerapporteerde nalichtingstijd van ongeveer 2500s [19]. De reden hiervoor is niet duidelijk aangezien de materialen quasi op dezelfde manier geproduceerd werden. De Eu en Tm dopanten werden eveneens toegevoegd onder de vorm van fluorides en er werd rekening gehouden met de 5% ondermaat aan  $\text{Ca}_3\text{N}_2$ . De baktemperatuur was in deze masterproef iets lager ( $1300^\circ\text{C}$  t.o.v.  $1400^\circ\text{C}$ ) maar eerdere optimalisatie in de onderzoeksgroep suggereerde geen belangrijke invloed van de baktemperatuur. Dit alles illustreert dat het niet steeds eenvoudig is om reproduceerbare resultaten te verkrijgen en dat niet of nauwelijks controleerbare parameters een sterke invloed kunnen hebben op het uiteindelijke resultaat.

Aangezien de materialen met het hoogste percentage flux aanleiding geven tot de beste resultaten, kan men zich de vraag stellen waarom geen hogere concentraties flux getest werden. Enerzijds was vooral de angst voor het etsen van de oven hierbij een beperkende factor. Anderzijds is het onduidelijk of een overblijvende concentratie chloor of fluor in het materiaal wel aanvaardbaar is voor *in vivo* toepassingen. Na SEM-EDX analyse bleken de materialen met veel flux immers nog een bepaalde hoeveelheid fluor of chloor te bevatten (zie sectie 4.1.1), terwijl deze elementen de nanotoxiciteit negatief zouden kunnen beïnvloeden.



**Figuur 4.2:** Overzicht van de nalichtingstijden voor materialen met verschillende gewichtspercentages van de fluxen  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KCl}$  of  $\text{KF}$ .

### Invloed van $\text{KF}$ , $\text{NH}_4\text{Cl}$ of $\text{KCl}$ flux op emissie- en excitatiespectra

De toevoeging van fluxen blijkt de persistente lichtemissie te bevorderen, maar het is uiteraard ook belangrijk om na te gaan of er een invloed is op andere materiaaleigenschappen. Zowel de fluorescente als persistente emissiespectra werden vergeleken met deze van de fluxloze materialen. Hieruit bleek dat de toevoeging van flux voor geen enkele van de onderzochte concentraties een noemenswaardig effect had op de emissiespectra. Ook het excitatiespectrum bleek er niet of nauwelijks door beïnvloed te worden. Deze resultaten stemmen overeen met de verwachtingen aangezien de flux enkel wordt aangewend om de vormingsreactie van het materiaal te verbeteren.

### Invloed van $\text{KF}$ , $\text{NH}_4\text{Cl}$ of $\text{KCl}$ flux op TL spectra en vervalconstante

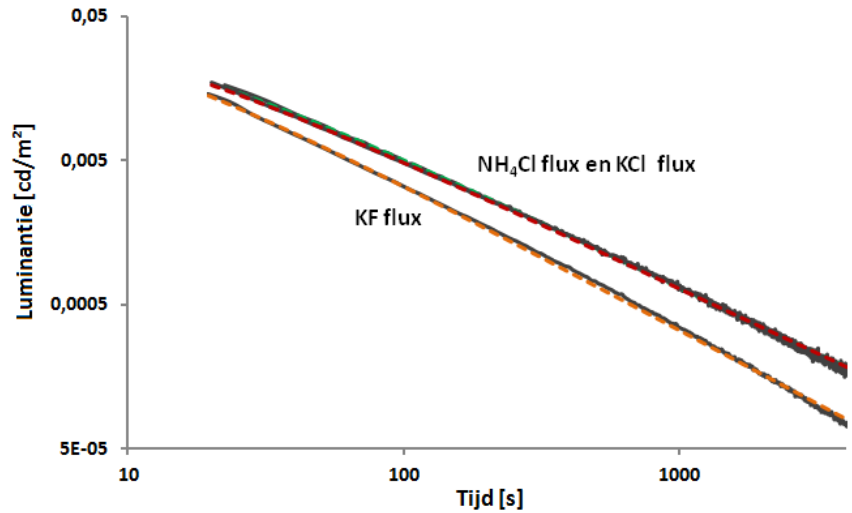
In tegenstelling tot de emissie- of excitatiespectra, heeft de toevoeging van flux wel degelijk invloed op de vervalconstante en het TL spectrum. De vervalconstante werd gedefinieerd in hoofdstuk 3 als de factor  $b$  in onderstaande formule:

$$I(t) = \frac{I_0}{\left(1 + \frac{t}{\tau}\right)^b}. \quad (4.1)$$

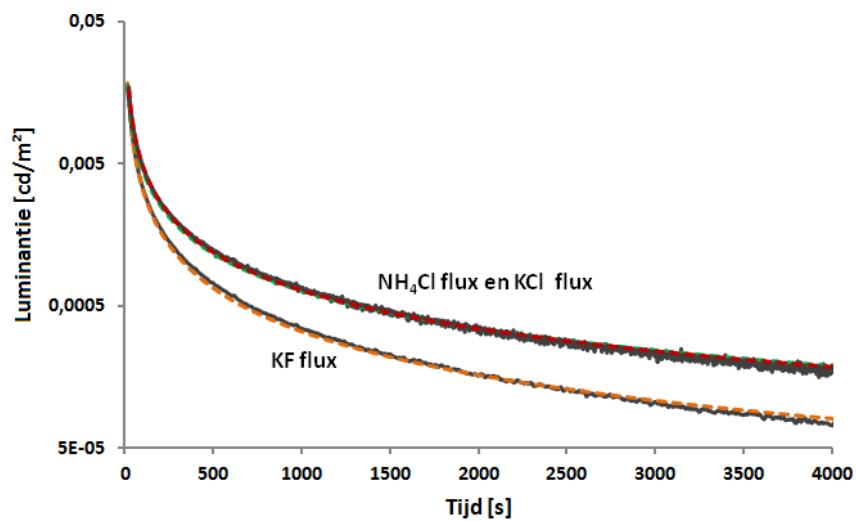
De vervalcurven werden gefit aan deze formule door een minimalisatie van de kwadratische fout en de vervalconstante  $b$  werd vervolgens ook geschat met behulp van een rechte trendlijn in een log-log plot. In figuur 4.3 wordt een voorbeeld gegeven van dergelijke fits aan formule 4.1. De bekomen vervalconstanten zijn opgenomen in tabel 4.1. De trendlijn en de fit leverden steeds zeer gelijkaardige resultaten op voor de vervalconstante, waardoor per materiaal slechts één waarde wordt opgenomen in de tabel.

<b>Monster</b>	zonder flux	1wt% $\text{KF}$	3wt% $\text{KF}$	5wt% $\text{KF}$	8wt% $\text{KF}$
<b>Vervalconstante <math>b</math></b>	0.99	1.01	0.98	0.98	1.00
<b>Monster</b>	3wt% $\text{KCl}$	8wt% $\text{KCl}$	3wt% $\text{NH}_4\text{Cl}$	8wt% $\text{NH}_4\text{Cl}$	nano
<b>Vervalconstante <math>b</math></b>	0.88	0.89	0.88	0.88	0.89

**Tabel 4.1:** Tabel met gefitte vervalconstanten voor de verschillende materialen. Nano wijst op een gemalen monster op basis van 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux. Gecentrifugeerde en niet-gecentrifugeerde oplossingen met NPs leverden dezelfde vervalconstante (sectie 4.3.1).



(a) Fits en metingen van het persistente verval op log-log plot

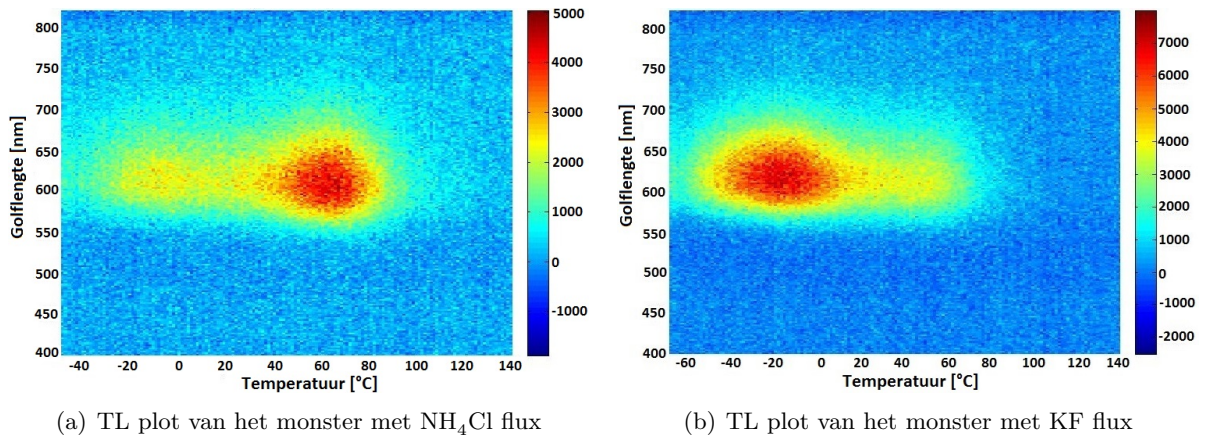


(b) Fits en metingen van het persistente verval op lin-log plot

**Figuur 4.3:** Verval voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  monsters met 8wt% KF, KCl of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux. De fits aan formule 3.1 worden in stippellijnen weergegeven en de metingen in volle lijnen. De resultaten voor de KCl en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux vallen quasi samen en zijn daarom moeilijk onderscheidbaar.

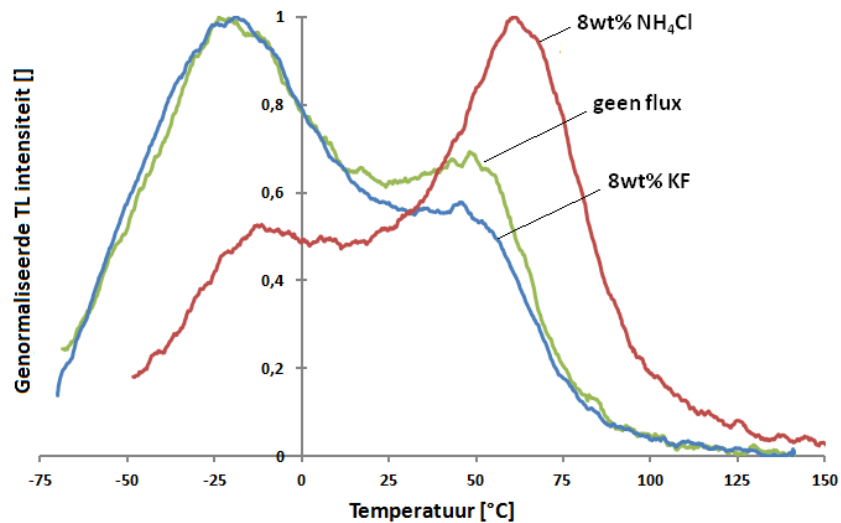
Het opgemeten verschil in vervalconstante voor de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en KCl monsters enerzijds en de monsters met KF of zonder flux anderzijds, was een van de redenen voor het uitvoeren van TL metingen. Er zijn immers verschillende theorieën die de distributie aan vallen proberen linken aan het verval van de persistente intensiteit van de fosfor.

Er werd geopteerd om drie verschillende  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  materialen op te meten, waarvan één zonder flux bereid werd, één met 8wt% KF en één met 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (figuur 4.4). De genormaliseerde TL curven in figuur 4.5 laten vermoeden dat het niet gaat om een enkel valniveau op welbepaalde diepte, maar eerder om een distributie van vallen. Twee pieken kunnen opgemerkt worden in de TL spectra, met een eerste piek rond  $-20^\circ\text{C}$  en een tweede piek nabij  $60^\circ\text{C}$ . Het voornaamste verschil tussen de drie TL spectra is terug te vinden in de relatieve grootte van beide pieken. Voor het materiaal zonder flux en dat met KF flux is de piek bij negatieve temperaturen dominant, wat wijst op een grote populatie aan ondiepe energieniveaus die niet rechtstreeks bijdragen tot de persistentie bij kamertemperatuur. Deze vallen zijn immers niet gevuld na excitatie bij kamertemperatuur aangezien ze quasi onmiddellijk terug geleegd worden door de aanwezige thermische energie. Voor het monster met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux is de situatie echter



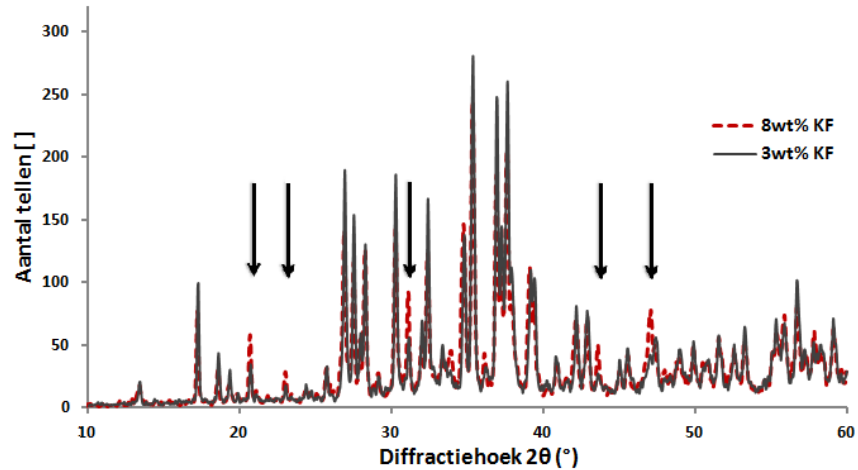
**Figuur 4.4:** TL oppervlakte plots voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  monsters met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (links) en KF (rechts) flux. De excitatie gebeurt met een LED (370nm), bij  $-50^\circ\text{C}$  voor het monster met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux en  $-70^\circ\text{C}$  voor het monster met KF flux. De opwarmingsnelheid is  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ .

omgekeerd en het grootste aantal vallen wordt gelegd rond  $65^\circ\text{C}$ . Dit wijst op diepe vallen die wel kunnen bijdragen aan de persistentie rond kamertemperatuur. De  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux lijkt de distributie van gevulde vallen dus te wijzigen en de dieper gelegen vallen de voorkeur te geven ten opzichte van de ondiepe.



**Figuur 4.5:** TL curven voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met 8wt% KF, 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en zonder flux. De excitatie gebeurt met een LED (370nm), bij  $-50^\circ\text{C}$  voor het monster met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux en  $-70^\circ\text{C}$  voor de monsters met KF flux of zonder flux. De opwarmingsnelheid is  $20^\circ\text{C}/\text{min}$ .

Deze TL metingen kunnen geen uitsluitsel geven over het totaal aantal aanwezige vallen, dus er kan ook niet met zekerheid gezegd worden hoe dit aantal eventueel wijzigt. Het totaal aantal gelegde vallen is evenredig met de oppervlakte onder de gloeicurve, maar een vergelijking van verschillende monsters is moeilijk en sterk afhankelijk van de experimentele parameters. Vergelijking van het TL resultaat enerzijds en de nalichtingstijd anderzijds voor het materiaal zonder flux en dat met 8wt% KF, laat wel vermoeden dat de flux ook aanleiding geeft tot een verhoogde densiteit aan vallen of tot meer vallen die gevuld worden en bijdragen tot de persistentie. De nalichtingstijd voor het materiaal met flux is veel groter terwijl de relatieve concentratie aan vallen rond kamertemperatuur eerder iets kleiner is. Vermoedelijk zijn er dus in absoluut aantal meer vallen die aan de persistente luminescentie deelnemen.



**Figuur 4.6:** XRD spectra voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met 3 en 8wt% KF. De pijlen duiden  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  pieken aan.

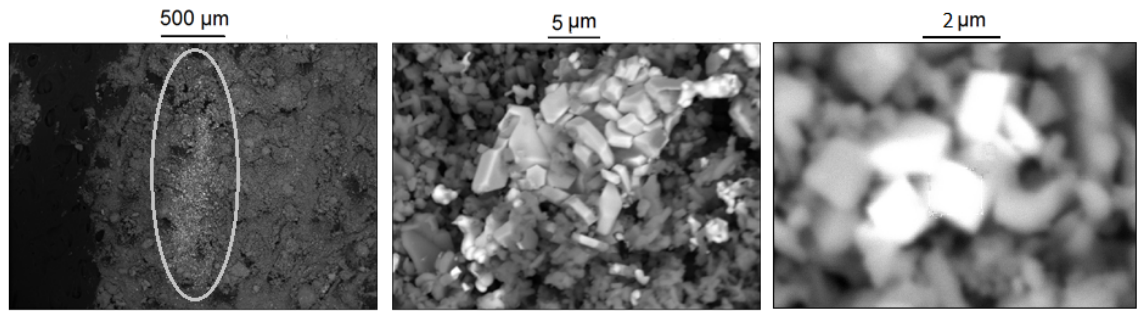
We kunnen ons nu de vraag stellen of er een verband tussen de vervalconstante en de TL spectra kan waargenomen worden. Het fluxloos materiaal vertoont een TL spectrum dat zeer gelijkaardig is aan dat van het materiaal met KF en uit tabel 4.1 blijkt ook dat de gefitte vervalconstanten zeer gelijkaardig zijn. Ondanks het intensiteitsverschil en het bijhorende verschil in nalichtingstijd, lijkt de overeenkomst in vervalconstante dus terug te komen in het TL spectrum. Het materiaal met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux daarentegen heeft een afwijkend TL spectrum en een afwijkende vervalconstante, wat een vermoedelijk verband tussen beide niet kan ontcrachten. Er bestaat echter nog heel wat discussie over wat dit verband zou kunnen zijn. De redenering die hierna volgt is een intuïtieve verklaringen die ik zelf plausibel acht.

Indien we transities van ladingsdragers tussen vallen onderling mogelijk achten, dan zou de aanwezigheid van meer ondiepe vallen aanleiding kunnen geven tot een sneller verval van de persistente intensiteit. De diepe vallen zouden dan immers gelegeed kunnen worden via een twee- (of meer-) stappen proces, waarbij voor elke stap minder thermische energie of interactie vereist is dan voor de rechtstreekse *detrapping* via de conductieband. Indien er in verhouding meer ondiepe vallen aanwezig zijn per diepe val, kan dit meer-stappen proces makkelijker doorgaan en in belang toenemen t.o.v. rechtstreekse *detrapping*. Op die manier kunnen de vallen sneller gelegeed worden, wat aanleiding geeft tot een grotere tijdsconstante en een sneller verval van de persistente intensiteit. Deze redenering zou de hierboven besproken resultaten aannemelijk kunnen maken, maar uiteraard zijn nog een hele resem andere verklaringen mogelijk. Verder onderzoek hiernaar is noodzakelijk. Bovendien werden er een aantal onderstellingen gemaakt waarvan niet zeker geweten is of ze in praktijk voldaan zijn. Zo wordt bijvoorbeeld ondersteld dat de vallen zich ruimtelijk en/of energetisch voldoende dicht bij elkaar bevinden, zodat een efficiënte transfer tussen beide mogelijk wordt.

Als belangrijkste conclusie uit deze paragraaf onthouden we dat in het materiaal met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux de meeste vallen nuttig kunnen bijdragen aan de persistente luminescentie bij kamertemperatuur. In het materiaal zonder flux en het materiaal met KF flux is dit niet het geval aangezien veel vallen reeds gelegeed worden beneden kamertemperatuur. Dit lijkt een belangrijke vaststelling om de verhoogde persistente lichtemissie in de materialen met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux te verklaren.

### Invloed van KF, $\text{NH}_4\text{Cl}$ of KCl flux op de materiaalsamenstelling

Tot slot kan nagegaan worden of de materiaalsamenstelling gewijzigd wordt door toevoeging van fluxmaterialen. In eerste instantie kan dit geverifieerd worden door middel van XRD metingen.



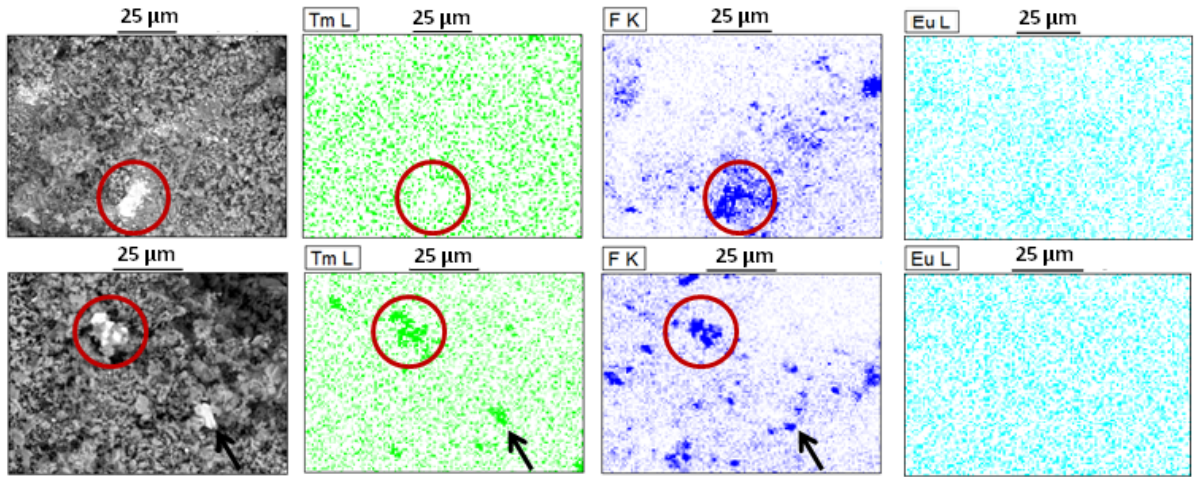
**Figuur 4.7:** Algemeen (links) en sterk uitvergroot (midden en rechts) SEM beeld van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  met 8wt% KF. Ter verduidelijking zijn een grote hoeveelheid helder ogende partikels omcirkeld in de linkse figuur.

Het lijkt vrij onwaarschijnlijk dat de kristalstructuur beïnvloed wordt door toevoeging van flux. Dit wordt bevestigd door de XRD metingen aangezien de diffractiepieken zich op dezelfde positie bevinden. De metingen komen bovendien goed overeen met het XRD spectrum voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  in de database en benaderen in goede mate de eerder gerapporteerde spectra [7, 8]. Een opvallende vaststelling voor de materialen met KF flux is echter de tendens naar sterker uitgesproken  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  pieken in het spectrum (zie figuur 4.6). Siliciumnitride is een van de startproducten van het mengsel en de aanwezigheid van deze pieken wijst op een overblijvende zuivere  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase en dus een onvolledige reactie. De XRD spectra zonder flux en met 3wt% KF bleken niet sterk verschillend (data niet getoond), maar 8wt% KF heeft duidelijk een nefaste invloed op de vormingsreactie. De reden waarom de persistente intensiteit toeneemt, kan dus zeker niet op dit macroscopische niveau gezocht worden. In tegenstelling tot KF flux, heeft toevoeging van 3 of 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of KCl geen uitgesproken invloed op de ongetransformeerde  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase. Een verbeterde vormingsreactie kan echter ook voor deze materialen niet afgeleid worden uit de XRD resultaten. Het dient hierbij opgemerkt dat in alle materialen een resterende  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase maar geen  $\text{Ca}_3\text{N}_2$  fase wordt waargenomen. Dit werd eerder ook gerapporteerd door K. Van den Eeckhout, maar bijhorend onderzoek toonde aan dat de persistentie desondanks verbeterd wordt door een ondermaat  $\text{Ca}_3\text{N}_2$  bij het vormingsproces [7].

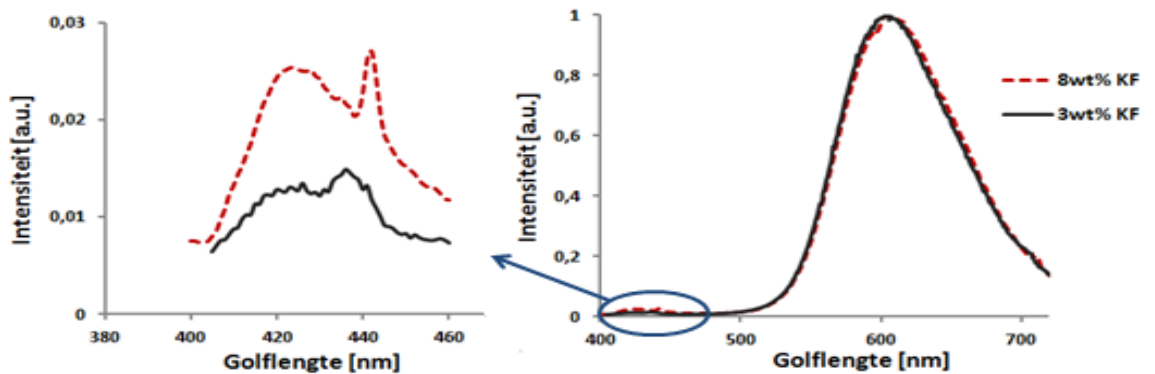
De samenstelling kan vervolgens ook op microscopische schaal bekeken worden door middel van SEM-EDX metingen. Op deze manier kan onder andere de verspreiding van de europium en thulium dopanten in beeld gebracht worden. Bovendien kan ook nagegaan worden of de fluxen zich na het bakproces nog (deels) in het materiaal bevinden. De resultaten hierover zijn behoorlijk consistent: de fluor- en chlooratomen zijn niet volledig uit het materiaal verdwenen en de resterende hoeveelheid stijgt met toenemende concentratie flux. Het is weinig zinvol om hierover kwantitatieve uitspraken te doen, maar vooral de fluoratomen lijken zich op te hopen in het materiaal met de vorming van een aparte fase tot gevolg. Dit wordt geïllustreerd in figuur 4.7 waarbij zowel een overzicht wordt gegeven als enkele uitvergroete varianten. Chlooratomen bleven in veel mindere mate aanwezig in het mengsel en zeker voor de materialen met  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux werden deze nog amper waargenomen. Dit lijkt logisch gezien het lage kookpunt van  $\text{NH}_4\text{Cl}$ .

Vooraf in de materialen met een hoge concentratie KF flux, worden steeds grote hoeveelheden helder ogende partikels gedetecteerd. In deze partikels wordt vaak een verhoogde fluorconcentratie waargenomen samen met een verhoogde thuliumconcentratie. Partikels met een verhoogde hoeveelheid van een van beide elementen afzonderlijk, komen echter ook voor (zie figuur 4.8). Cathodeluminescentie-metingen geven aan dat deze deeltjes een verminderde lichtemissie vertonen. Bovendien emitteren de fluorrijke partikels deels in het blauwe gebied rond 435nm (zie ook sectie 4.3.3). Dit lijkt te wijzen op  $\text{CaF}_2:\text{Eu}$  emissie en werd logischerwijze enkel in de materialen op basis van KF flux waargenomen [36]. De hoeveelheid aan dergelijk partikels is op macroscopische schaal vrij beperkt, waardoor de invloed op het emissiespectrum klein is. Een grondige





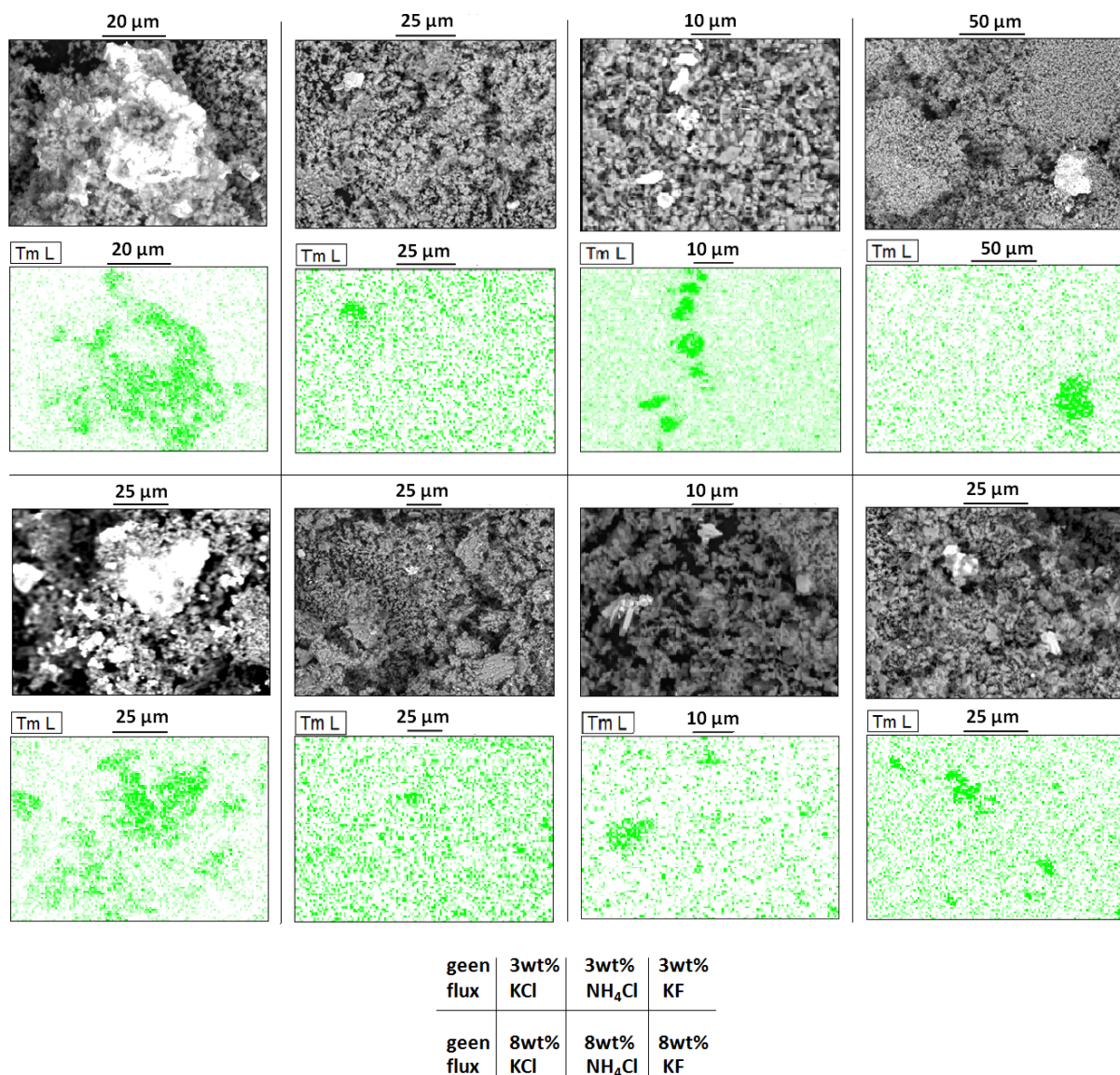
**Figuur 4.8:** SEM beeld en EDX spectra voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met 8wt% KF. In de bovenste figuur worden vooral plaatsen met verhoogde F concentratie waargenomen, terwijl in de onderste figuur Tm en F geregeld samen voorkomen. De europiumconcentratie is homogeen.



**Figuur 4.9:** Emissie in het blauwe gebied (links) en totale fluorescente emissiespectrum (rechts) van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met 3 en 8wt% KF flux.

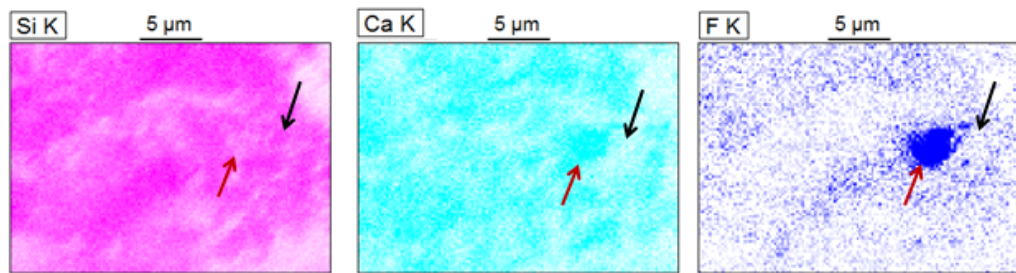
inspectie toont echter dat deze blauwe emissie ook op macroscopische schaal wordt waargenomen. Figuur 4.9 toont het fluorescente emissiespectrum voor de materialen met 3 en 8wt% KF flux samen met een uitvergroting in het blauwe gebied. De emissie rond 435nm bedraagt hooguit enkele procenten van de maximale emissie rond 610nm, maar is wel duidelijk zichtbaar. Een hogere concentratie KF flux zorgt voor een sterkere blauwe emissie, wat de ophoping van fluorides en de vorming van een  $\text{CaF}_2:\text{Eu}$  fase enkel lijkt te bevestigen.

De verhoogde concentratie fluor is uiteraard specifiek voor de materialen met kaliumfluoride flux, maar thuliumrijke gebieden worden in alle materialen waargenomen. Gebieden met een hoge europiumconcentratie worden echter niet gedetecteerd en de verspreiding van deze dopant lijkt zeer homogeen. Het verschillend gedrag van Eu en Tm dopanten kan verklaard worden op basis van de verschillende valentietoestand:  $\text{Eu}^{2+}$  kan eenvoudig op de  $\text{Ca}^{2+}$  posities gesubstitueerd worden terwijl het trivalente  $\text{Tm}^{3+}$  moeilijker in het rooster ingebouwd kan worden. De SEM-EDX metingen laten geen nauwkeurige concentratiebepaling toe, maar kwantitatief bleek de concentratie thulium typisch een factor tien hoger in de thuliumrijke gebieden dan in de normale gebieden. Deze thuliumrijke fase werd reeds eerder gerapporteerd en het ontstaan van een  $\text{CaTm}(\text{Si}_4\text{N}_7)$  fase werd voorgesteld als mogelijke verklaring [7, 19]. De metingen in deze masterproef kunnen deze hypothese niet bevestigen aangezien de waargenomen thulium concentratie enkel de helft van de calcium concentratie bedraagt.



**Figuur 4.10:** Typisch SEM beeld en EDX map van de hoeveelheid Tm voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  zonder flux en  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met 3 of 8wt% KCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of KF flux. De volgorde van de figuren is onderaan aangeduid. Let op de verschillende schalen in de deelfiguren.

De fluxmaterialen werden toegevoegd aan het mengsel om de vormingsreactie en de verspreiding van dopanten te verbeteren. Bijgevolg zou men een verschil tussen de materialen met en zonder flux kunnen verwachten. Aangezien de SEM-EDX metingen enkel info geven over een zeer klein deel van het materiaal, zijn veralgemeningen echter niet steeds gerechtvaardigd en moet men zich behoeden voor te sterke uitspraken. De thuliumrijke gebieden worden in elk materiaal teruggevonden en directe conclusies zijn dus in elk geval niet mogelijk. Een oordeel over de hoeveelheid thuliumrijke gebieden is altijd enigszins subjectief, maar de materialen met een grote hoeveelheid flux lijken een kleinere hoeveelheid thuliumrijk materiaal te bevatten. Deze conclusie is gebaseerd op verschillende metingen van meerdere monsters van elk materiaal om de objectiviteit te vergroten. Het verschil ligt voornamelijk in de grootte van de thuliumrijke aggregaten: de diameter is typisch een tiental micrometer of minder voor de bovenvermelde materialen, terwijl deze kan oplopen tot 30  $\mu\text{m}$  en meer in de materialen zonder flux of met een lage concentratie KF flux (zie figuur 4.10). Dit verschil in diameter gaat gepaard met een groot verschil in volume en heeft dus een sterke invloed op de totale concentratie thuliumrijk materiaal. Dit alles lijkt er op te wijzen dat de verspreiding van thuliumdopanten inderdaad



**Figuur 4.11:** SEM-EDX mappings voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  met 8wt% KF. Bemerkt een fluor- en calciumrijk gebied (rode pijl) en een siliciumrijk gebied (zwarte pijl).

verbeterd wordt door de aanwezigheid van fluxmaterialen in het startmengsel. De verbeterde persistente luminescentie kan hierdoor waarschijnlijk alvast gedeeltelijk verklaard worden. In het geval van de KF flux wordt dit effect echter enigszins teniet gedaan door de vorming van fluorrijke aggregaten zoals hierboven vermeld. De chloorhoudende fluxmaterialen daarentegen bleven in mindere mate aanwezig in het poeder en chloorrijke fases werden niet opgemerkt. Dit verschil tussen de soorten fluxen zou dus in verband gebracht kunnen worden met het verschil in persistentie.

Tot slot kunnen de EDX resultaten ook gebruikt worden om de aanwezigheid van een zuivere  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  te onderzoeken. Dit bleek echter veel minder evident op basis van EDX mappings dan op basis van XRD resultaten. Bij geen van de eerder besproken EDX metingen werd een uitgesproken verschil waargenomen tussen de Ca en de Si map. Deze metingen werden typisch uitgevoerd op een schaal van enkele tientallen micrometer en op deze schaal is er dus geen enkele aanwijzing voor het bestaan van een zuivere  $\text{Si}_3\text{N}_4$  fase. Bij metingen op grotere schaal konden eveneens geen  $\text{Si}_3\text{N}_4$  aggregaten waargenomen worden, maar op kleinere schaal was dit in beperkte mate wel het geval. Figuur 4.11 geeft hiervan een voorbeeld voor het materiaal met 8wt% KF flux. De positie aangeduid met de rode pijl vertoont een hogere calcium- en fluorconcentratie terwijl de positie ernaast (zwarte pijl) bijna geen calcium bevat maar wel vrij veel silicium. Lokaal ontstaat dus een onevenwicht tussen Ca en Si en dit onevenwicht wordt hier klaarblijkelijk gestimuleerd door de fluoratomen. Men kan vermoeden dat een gedeelte van de calciumatomen reageren met de fluoratomen tot  $\text{CaF}_2$  en dat hierdoor een overmaat silicium achterblijft in een  $\text{Si}_3\text{N}_4$  fase. Dit zou ook meteen verklaren waarom een sterker uitgesproken  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase waargenomen wordt in de XRD metingen van dit materiaal (zie figuur 4.6).

#### 4.1.2 Verbeteren van het persistente emissiespectrum

In het voorgaande gedeelte (sectie 4.1.1) werd het verbeteren van de persistente intensiteit uitvoerig besproken. Bij het gebruik van persistente luminescentie voor *in vivo* beeldvorming is echter ook het persistente emissiespectrum van groot belang. Dit staat in nauw verband met het optisch venster en werd reeds besproken in hoofdstuk 2. In dit hoofdstuk werd ook het fluorescente en persistente emissiespectrum van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  weergegeven (zie figuur 2.6). Beide zijn een tiental nanometer verschoven ten opzichte van elkaar en het persistente spectrum piekt rond 620nm terwijl het fluorescente spectrum zijn maximum bereikt rond 610nm. De minimale weefselattenuatie bevindt zich typisch tussen 650nm en 750nm, afhankelijk van de exacte samenstelling van het weefsel, dus een verschuiving van het persistente emissiespectrum naar grotere golflengten kan de efficiëntie van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  voor *in vivo* beeldvorming verder verbeteren. Er bestaat echter geen kant-en-klaar voorschrift om een dergelijke verschuiving te verkrijgen en men is dus in sterke mate aangewezen op *trial and error*.

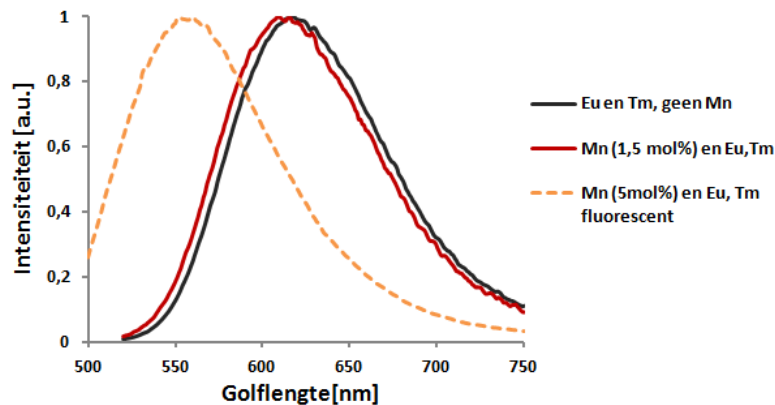
Binnen de groep van de nitrido-silicaten, werden zowel  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}$ ,  $\text{Sr}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}$  als  $\text{Ba}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu}$

en hun zeldzame aard cogeneratede (R= Nd, Dy, Sm, Tm) varianten reeds onderzocht [19]. Het emissiespectrum van  $\text{Ba}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,R}$  is gepiekt in het geel-oranje gebied en bovendien kan niet dezelfde persistente intensiteit bereikt worden als voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ . Het fluorescente emissiespectrum van  $\text{Sr}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,R}$  is gepiekt bij 620nm en ligt dus bij iets langere golflengten dan voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  (610nm). De persistente intensiteit van dit materiaal is echter onbruikbaar voor alle onderzochte codopanten. Men zou kunnen beargumenteren dat een gedeeltelijke substitutie van de Ca door de Sr atomen in  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  een shift van het emissiespectrum met zich mee zal brengen. Dit is echter niet zomaar het geval: de kristalstructuur van beide materialen is verschillend en het is dus niet a priori duidelijk welke invloed kan verwacht worden. Een continue verschuiving van het spectrum lijkt uitgesloten. Aangezien de shift in emissiespectrum tussen  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,R}$  en  $\text{Sr}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,R}$  klein is en de persistente intensiteit van  $\text{Sr}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,R}$  heel beperkt is, wordt een gedeeltelijke Sr substitutie hier echter niet verder onderzocht.

De optie die in deze masterproef wel onderzocht wordt om het emissiespectrum te beïnvloeden, is dopering met mangaan, bismut, chroom of lood. Het effect hiervan kan op voorhand niet voorspeld worden, maar deze extra dopering kan kleine wijzigingen in de structuur aanbrengen en zou ook de distributie aan vallen of de interactie tussen vallen kunnen beïnvloeden.

### Invloed van Mn, Bi, Cr of Pb dopering op de emissiespectra

Het eerste materiaal dat als dopant getest werd, is mangaan (onder de vorm van  $\text{MnF}_2$ ). Mangaan werd eerder reeds aan  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  toegevoegd met het oog op conversiefosforen. Een piek in het fluorescente emissiespectrum bij 599nm werd gerapporteerd [37], terwijl dit in onze metingen 620nm bedroeg. Ook het persistente emissiespectrum piekte bij 620nm. De persistentie van dit materiaal is echter zeer laag en dotering met europium en thulium is nodig voor de persistente intensiteit.

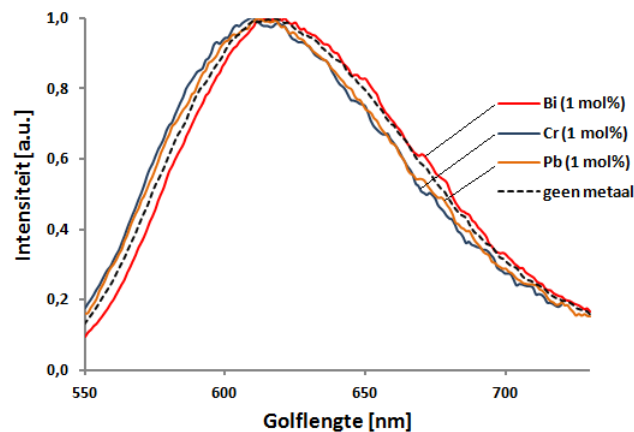


**Figuur 4.12:** Persistent emissiespectra van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  en  $\text{Ca}_2\text{Mn}_{0.03}\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  en fluorescent emissiespectrum van  $\text{Ca}_2\text{Mn}_{0.1}\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  (persistente intensiteit te laag voor meting van het persistent spectrum).

$\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  monsters met en zonder 1.5mol% mangaandotering vertonen een gelijkaardig emissiespectrum qua vorm. Dit blijft zo onafhankelijk van de eventuele toevoeging van flux. In vergelijking met ongedoteerd  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  bereiken de fluorescente emissiespectra hun maximum rond 605nm in plaats van 610nm. Het verschil is relatief klein maar het valt op dat de emissiespectra opgeschoven zijn naar iets kortere golflengten. Voor de materialen met 5mol% mangaan is deze verschuiving veel sterker uitgesproken. De verschuiving van de persistente emissiespectra is bovendien zeer gelijkaardig aan deze van de fluorescente spectra en bijgevolg is mangaandotering niet geschikt om een roodverschuiving te verkrijgen (figuur 4.12). Het toont

echter wel aan dat codopering een sterke invloed op het emissiespectrum kan hebben.

Vervolgens werd de invloed van bismut-, chroom- of looddopering onderzocht. Deze dopanten werden aan het mengsel toegevoegd onder de vorm  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ,  $\text{CrO}_3$  en  $\text{PbO}$ . De resultaten voor de persistente emissiespectra van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  respectievelijk zonder metaaldopanten en met 1mol% Bi, Cr en Pb, worden weergegeven in figuur 4.13. De verschuiving van de emissiespectra is zeer klein en dit was ook het geval voor hogere concentraties (2 en 4 mol%) Bi. Ook dopering met Bi (1, 2 of 4mol%), Cr (1mol%) of Pb (1mol%) brengt dus geen noemenswaardige roodverschuiving van het spectrum met zich mee. Ter volledigheid dient opgemerkt dat in al deze materialen enkel  $\text{Eu}^{2+}$  emissie wordt waargenomen en dat geen merkbare fluorescentie of persistentie van Bi, Cr of Pb wordt gedetecteerd. De enige uitzondering hierop zijn de eerder besproken materialen met Mn dotering, zonder Eu en Tm.



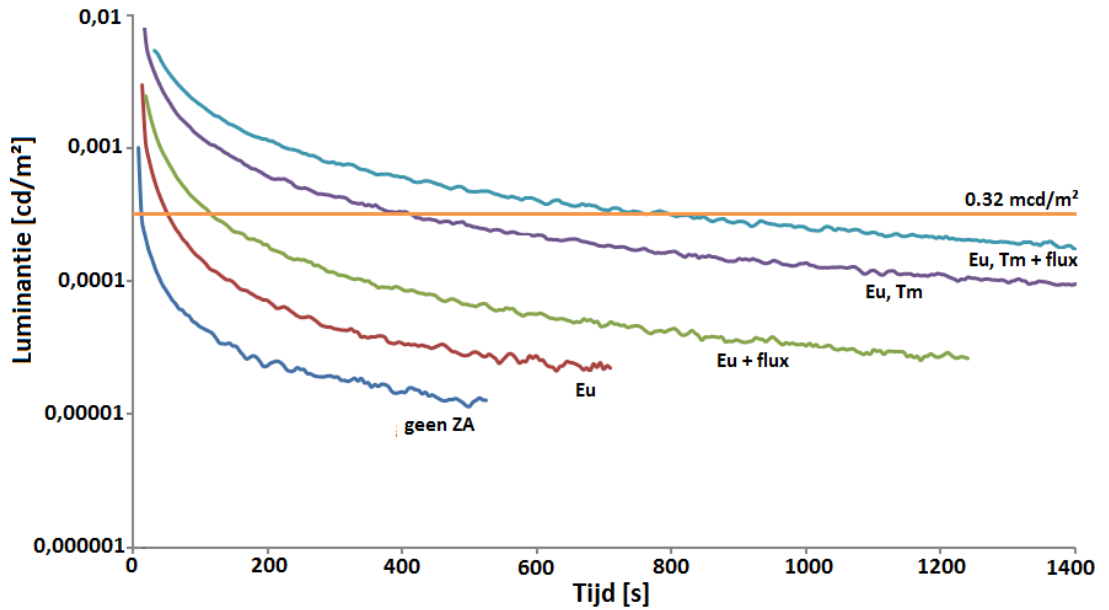
**Figuur 4.13:** Persistente emissiespectra van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  zonder extra metaaldopering en van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  met respectievelijk 1 mol% Bi, Cr of Pb.

### Invloed van Mn, Bi, Cr of Pb dopering op de persistente luminescentie

De dopering met Mn, Bi, Cr of Pb blijkt geen roodverschuiving van het emissiespectrum met zich mee te brengen, maar het is op zich ook interessant om de invloed van deze elementen op de persistente intensiteit na te gaan. Extra dopanten kunnen immers extra persistente vallen induceren of kunnen de interactie tussen bestaande vallen beïnvloeden.

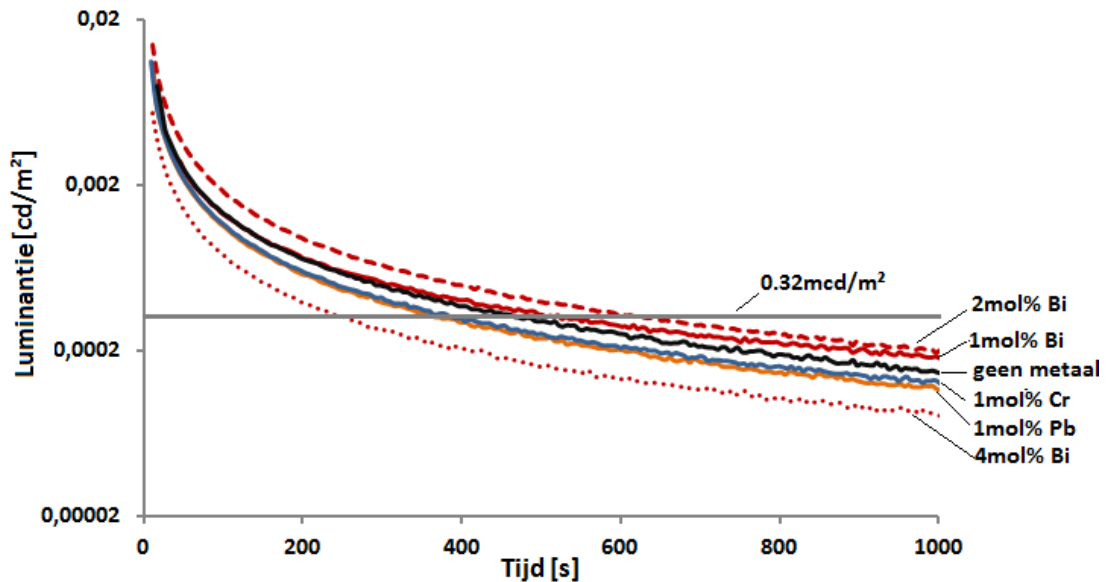
De Mn gedoteerde  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  monsters (met 1.5 en 5mol% Mn) zonder toevoeging van zeldzame aarden, vertonen een verwaarloosbare persistente luminescentie. Daarom werd voor de materialen met 1.5mol% Mn de invloed getest van respectievelijk extra Eu, Eu en flux, Eu en Tm, en tot slot Eu, Tm en flux. Als flux werd 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gebruikt (figuur 4.14). Extra doteren met 1% Eu zorgt voor een duidelijke intensiteitsstijging en toevoegen van flux bij de bereiding zorgt ook hier voor een aanzienlijke verbetering. De extra additie van 1% Tm bovenop de 1% Eu, geeft aanleiding tot een nog sterkere intensiteit en na toevoeging van flux wordt finaal een nalichtingstijd rond de 900 seconden bekomen (figuur 4.14). Het mag dus duidelijk zijn dat, ook na de toevoeging van Mn, de beste resultaten nog steeds verkregen worden met toevoeging van zowel Eu, Tm als flux. De 1.5mol% mangaandopering had geen wezenlijke invloed op de persistentie van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  zonder flux, maar de additie van  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux bleek minder effectief. Rekening houdend met de blauwverschuiving van de emissiespectra, is Mn dotering dus zinloos voor de beoogde toepassingen. Deze conclusie werd bevestigd door metingen op een gelijkaardige reeks materialen met 5mol% Mn dotering. Hierbij werd nog amper persistentie waargenomen.

De toevoeging van 1mol% chroom of lood bleek een licht negatieve invloed te hebben op de



**Figuur 4.14:** Verval van de luminescente intensiteit na het uitschakelen van de excitatie, voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  met 1.5mol% Mn en eventueel 1% extra zeldzame aarde (ZA) dopanten (Eu en/of Tm) en flux (8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ).

persistente intensiteit. De additie van 1mol% bismut bevorderde de persistentie echter enigszins en daarom werd in dit geval ook een hogere concentratie getest. Een additie van 2mol% Bi kon de persistente intensiteit nog lichtjes verder verbeteren, terwijl 4mol% Bi een sterke intensiteitsdaling teweegbracht. Dit alles wordt geïllustreerd door de vervalcurven in figuur 4.15.

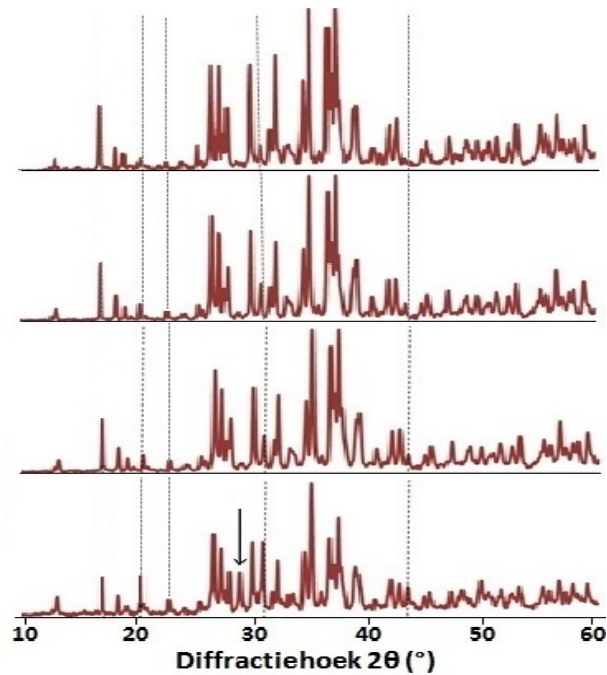


**Figuur 4.15:** Verval van de luminescente intensiteit na het uitschakelen van de excitatie, voor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  zonder metaaldopant of met 1,2 of 4mol% Bi of 1 mol% Cr of Pb.

### Invloed van Mn, Bi, Cr of Pb dopering op de materiaalsamenstelling

Aangezien de extra metaaldotering oninteressant bleek voor verdere toepassing, werden geen uitgebreide EDX mappings uitgevoerd op deze materialen, maar enkel XRD metingen. De XRD

spectra van de mangaangedoteerde monsters kunnen de intensiteitsdaling bij hoge mangaan concentratie eenvoudig verklaren. In figuur 4.16 worden de XRD spectra weergegeven voor monsters zonder mangaan, met 1.5mol% mangaan en tot slot 5mol% mangaan met en zonder 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux. De hoofdpijken van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  blijven duidelijk zichtbaar en er worden geen pieken waargenomen die wijzen op een mangaanrijke fase. Het versterken van de  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  pieken, is echter meer opmerkelijk. De intensiteit van deze pieken stijgt naarmate de concentratie mangaan stijgt en naarmate flux wordt toegevoegd. In het monster met 5mol% mangaan en 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux, worden bovendien ook sporen van  $\text{Ca}_2\text{N}_3$  teruggevonden, waarvan de grootste piek aangeduid wordt met de pijl. De overblijvende  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (en  $\text{Ca}_2\text{N}_3$ ) fase wijst duidelijk op een onvolledige vormingsreactie van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ .



**Figuur 4.16:** Van boven naar onder: XRD spectra van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,Tm}$ ;  $\text{Ca}_2\text{Mn}_{0.03}\text{Si}_5\text{N}_8$ ,  $\text{Ca}_2\text{Mn}_{0.1}\text{Si}_5\text{N}_8$  en  $\text{Ca}_2\text{Mn}_{0.1}\text{Si}_5\text{N}_8\text{:Eu,Tm}$  met 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . De stippellijnen wijzen op een  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase en de pijl rond  $29^\circ$  toont de belangrijkste  $\text{Ca}_2\text{N}_3$  piek.

## 4.2 Reduceren van de deeltjesgrootte

Om het persistent luminescente materiaal bruikbaar te maken voor *in vivo* beeldvorming, moet het poeder omgevormd worden tot nanopartikels. Na het bespreken van de optimalisatie van de fosfor in de vorige sectie, zal hier de transformatie naar nanopartikels in oplossing behandeld worden. Voor beide gebruikte technieken (PLAL en malen in oplossing) wordt de resulterende deeltjesdiameter en de opgemeten zetapotential besproken. Zowel gecentrifugeerde als niet-gecentrifugeerde oplossingen zullen aan bod komen. Het centrifugeren gebeurde in een Heraeus Multifuge 1 S-R (Thermo Scientific) gedurende 5 minuten aan 4500rpm.

### 4.2.1 Gepulste laserablatie (PLAL)

De eerste techniek die gebruikt wordt om nanodeeltjes te verkrijgen is gepulste laserablatie. De verkregen partikels worden gekarakteriseerd met behulp van DLS metingen voor de grootte en de zetapotential. De laserablatie wordt uitgevoerd in drie verschillende oplosmiddelen: ethanol

en twee mengsels van gedeïoniseerd water met respectievelijk 5mM en 50mM NaOH. De hierna gerapporteerde resultaten werden bekomen na 4uur laserablatie.

## Diameter

Bij DLS meting van de diameter worden steeds drie opeenvolgende metingen op hetzelfde monster uitgevoerd. Hierbij bestaat elke meting op zich uit 10 scans van 10 seconden. De resultaten van de drie opeenvolgende scans zijn vaak (licht) verschillend, wat er in sommige gevallen op kan wijzen dat de colloïdale oplossing niet volledig stabiel is en dat aggregaten gevormd worden. De laserbundel scant verschillende posities in het monster af en een inhomogeen mengsel kan dus ook aanleiding geven tot variërende metingen. De rechtstreeks opgemeten data worden onder de vorm van een intensiteit weergegeven. Hieruit kan benaderend een distributie van het aantal deeltjes in functie van de diameter berekend worden. Hierbij wordt rekening gehouden met de veel lagere intensiteit bij de detectie van kleinere deeltjes. Dit verband tussen intensiteit en diameter is gebaseerd op de *Rayleigh scattering* theorie waaruit  $I \propto d^6$  volgt.

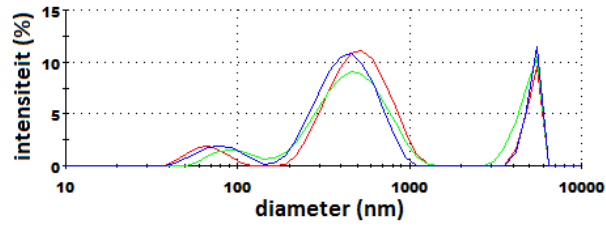
Figuren 4.17(a) en 4.17(b) tonen twee metingen van een monster in 5mM NaOH oplossing, waarbij de eerste meting voor het centrifugeren (5min aan 4500rpm) werd uitgevoerd en de tweede erna. Men kan drie duidelijke populaties rond respectievelijk 100nm, 500nm en  $5\mu\text{m}$  zien. De grootste deeltjes (nabij de  $5\mu\text{m}$ ) kunnen eenvoudig afgezonderd worden door centrifugeren en worden (bijna) niet meer waargenomen bij de tweede meting. De relatieve populatie in de piek rond 100 en 500nm wijzigt ook, waarbij de kleinste deeltjes aan belang winnen. Door de zeer sterke invloed van de diameter op de gedetecteerde intensiteit ( $\propto d^6$ ), levert de conversie naar het aantal partikels een totaal ander beeld: de overgrote meerderheid van de deeltjes bevindt zich in de 100nm range terwijl de andere populaties verwaarloosbaar zijn (zie figuur 4.17(c)). Diameters in de buurt van 100nm lijken ideaal voor de beoogde *in vivo* toepassingen aangezien de uitgezonden lichtintensiteit groot genoeg blijft en de deeltjes vrij goed gedistribueerd kunnen worden in het lichaam (zie hoofdstuk 2, sectie 2.6). De resultaten illustreren dus dat het mogelijk is om met PLAL geschikte nanodeeltjes te verkrijgen.

In de NaOH oplossingen werd bij sommige metingen een opmerkelijke populatie aan 0.5 tot 5nm deeltjes gedetecteerd. Het berekende deeltjespercentage in deze groep bedroeg bijna 100%, wat de significantie van deze resultaten aantoont. Deze populatie was echter enkel zichtbaar kort na ultrasonische behandeling van het monster en werd niet gedetecteerd in de andere metingen. We kunnen bijgevolg besluiten dat deze populatie onstabiel is en snel aggregeert tot grotere partikels. De eerder gerapporteerde deeltjesgrootte bekomen na PLAL in 5mM NaOH oplossing bedroeg 3-5nm [2], wat vrij goed overeenstemt met deze waarnemingen. Aangezien deze kleine nanopartikels heel weinig licht uitzenden en snel aggregeren, werden geen verdere stappen ondernomen om deze te stabiliseren en te analyseren.

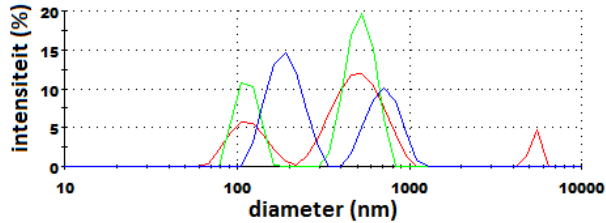
## Zetapotential

Ook bij het meten van de zetapotential worden steeds drie opeenvolgende metingen van hetzelfde monster uitgevoerd. De zetapotential van de 5mM NaOH oplossing is sterk negatief, met een gemiddelde rond -40mV (bij pH 10). De opgemeten potential is vrij breed, maar heeft een beperkt positieve bijdrage en de colloïdale oplossing is bijgevolg behoorlijk stabiel (figuur 4.18(b)). In de rest van deze masterproef wordt dan ook een 5mM NaOH oplossing gebruikt. In de 50mM NaOH oplossing werd een iets minder sterk negatieve potential opgemeten (figuur 4.18(a)), met een gemiddelde van -25mV (bij pH 13). Een hogere concentratie NaOH verbetert de stabiliteit niet en is dus niet aangewezen.

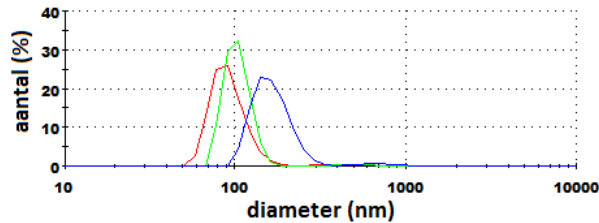




(a) deeltjesgroottedistributie na laserablatie, maar voor centrifugering (o.b.v. rechtstreeks opgemeten intensiteit)



(b) deeltjesgroottedistributie na laserablatie en na centrifugering (o.b.v. rechtstreeks opgemeten intensiteit)



(c) berekende distributie voor het aantal deeltjes met een bepaalde diameter, na laserablatie en na centrifugering (berekend o.b.v. de intensiteitsdistributie in figuur 4.17(b))

**Figuur 4.17:** Deeltjesgroottedistributie na laserablatie in 5mM NaOH, zowel voor en na centrifugering. De bovenste twee figuren geven de rechtstreeks opgemeten intensiteit weer, terwijl de onderste figuur het berekende aantal deeltjes met een bepaalde diameter na centrifugering weergeeft. De drie lijnen stellen verschillende metingen van hetzelfde monster voor.

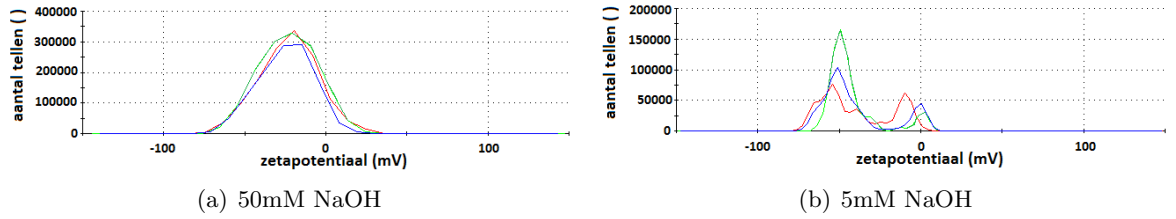
De ethanol oplossing vertoont zoals verwacht een zetapotential die vrij symmetrisch ten opzichte van het neutraal punt gelegen is (figuur 4.19(b)). Bijgevolg zal de colloïdale stabiliteit heel laag zijn en aggregaten zullen snel gevormd worden. De metingen tonen inderdaad een deeltjespopulatie met een gemiddelde diameter rond de micrometer (figuur 4.19(a)), wat een stuk groter is dan de diameters waargenomen in de NaOH oplossingen.

#### 4.2.2 Malen in oplossing

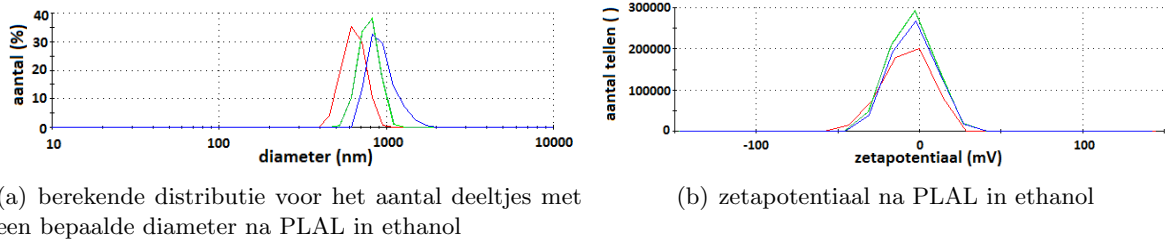
De PLAL experimenten nemen meerdere uren in beslag en de hoeveelheid nanomateriaal dat bekomen wordt is door de beperkte puls frequentie van de laser (1Hz) heel beperkt. Een eenvoudigere en snellere methode voor het vermalen van de poeders, maakt gebruik van malen in oplossing (*wet grinding*).

#### Diameter

In eerste instantie werden een aantal verschillende behandelingen getest, waaruit bleek dat 10min malen aan 400rpm een distributie van NPs met een diameter rond 100nm kon opleveren. Aan

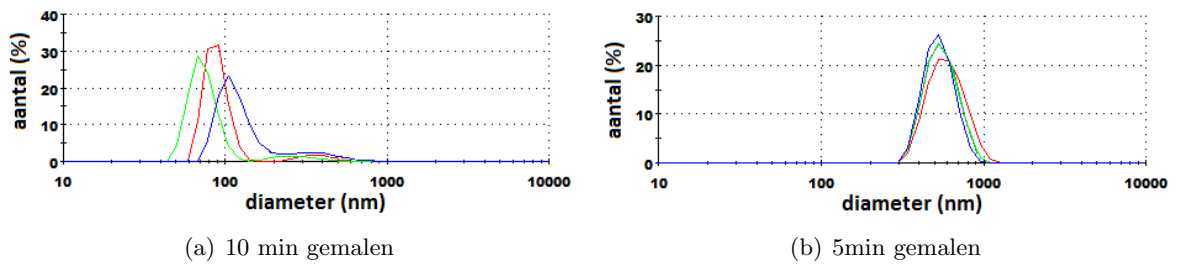


**Figuur 4.18:** Zetapotential voor 50mM en 5mM NaOH oplossingen na laserablatie. De drie lijnen geven verschillende metingen van hetzelfde monster weer.



**Figuur 4.19:** Berekende distributie voor het aantal deeltjes met een bepaalde diameter (links) en zetapotential (rechts) na laserablatie in ethanol. De drie lijnen geven verschillende metingen van hetzelfde monster weer.

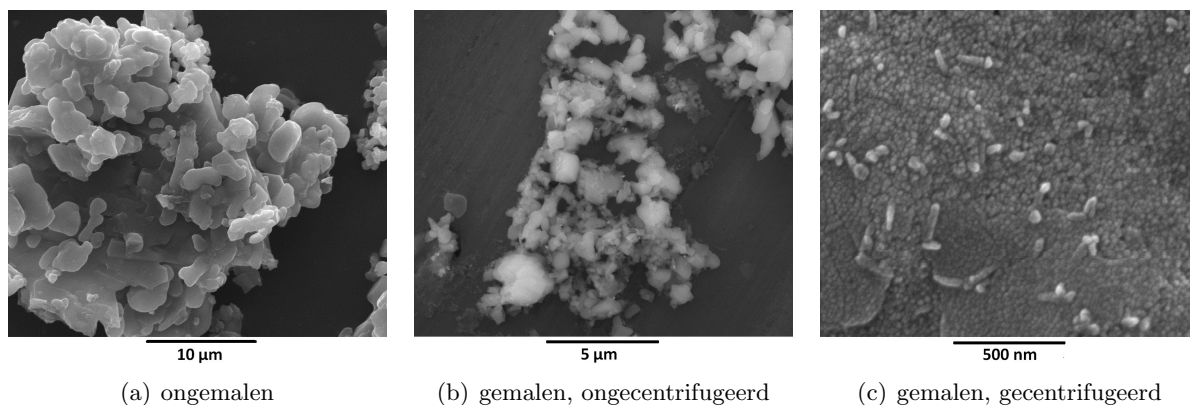
dezelfde snelheid malen gedurende 5min gaf daarentegen aanleiding tot grotere deeltjes met diameters van 300 tot 1000nm (zie figuur 4.20). Diameters in de buurt van 100nm lijken ideaal (hoofdstuk 2, sectie 2.6) en de stockoplossing voor het nanotoxiciteitsonderzoek werd dan ook bekomen door 10min *wet grinding*. Een centrifugering (5min aan 4500rpm) was hierbij uiteraard noodzakelijk om grotere partikels uit de oplossing te verwijderen. Het malen vond plaats in gedeïoniseerd water en de oplossing werd daarna gemengd tot een 5mM NaOH oplossing. Bij het malen bedroeg de hoeveelheid  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu},\text{Tm}$  in water 1mg/ml en de oplossing werd achteraf aangelengd tot een 5mM NaOH oplossing met concentratie 0.5mg/ml.



**Figuur 4.20:** Berekende distributie van het aantal deeltjes met een bepaalde diameter na 10min malen (links) en 5min malen (rechts) voor het centrifugeren. De drie lijnen geven verschillende metingen van hetzelfde monster weer.

In totaal werden 27 metingen uitgevoerd op 9 verschillende monsters van de stockoplossing, waarbij elk van de metingen opnieuw bestond uit 10 scans van 10 seconden. De resultaten voor de verschillende monsters waren steeds zeer gelijkaardig en bevestigen de homogeniteit van de stockoplossing. Als gemiddelde piekwaarde (in de figuren met het berekend aantal deeltjes in functie van de diameter), werd 114nm bekomen en de standaardafwijking hierop bedroeg 43nm. Deze waarden kunnen echter enkel een ruwe indicatie geven van de werkelijke distributie, aangezien de omrekening van intensiteit naar aantal deeltjes steeds benaderend is. We kunnen hieruit wel besluiten dat de stockoplossing op dit vlak prima aan de vereisten lijkt te voldoen.

Naast de DLS metingen, werden ook SEM beelden gemaakt om de grootte van de nanodeeltjes

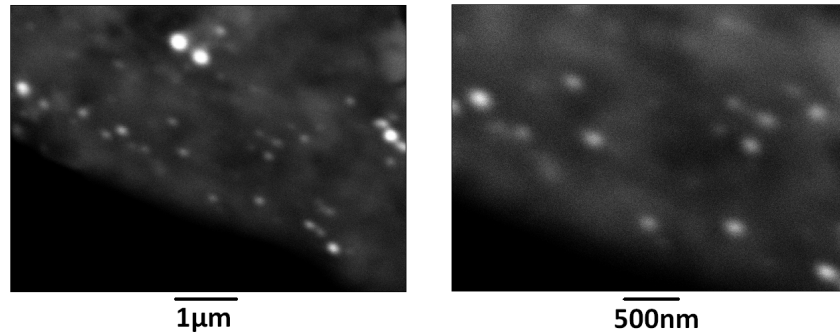


**Figuur 4.21:** SEM beelden van een ongemalen poeder en een gemalen poeder (zowel gecentrifugeerd als ongecentrifugeerd). Bij het gemalen en gecentrifugeerde monster werd een goudcoating aangebracht.

te bepalen. Figuur 4.21(c) toont een van de gemaakte SEM beelden (met de Quanta 200F (FEI) SEM) voor een 5mM NaOH oplossing waarvan de DLS meting de overgrote meerderheid aan partikels in de 50-150nm range weergaf. Ter vergelijking worden hierbij ook de SEM beelden weergegeven van een ongemalen poeder en een gemalen maar ongecentrifugeerd poeder. Het verschil tussen het compacte, ongemalen poeder en de gemalen structuur, is duidelijk zichtbaar. De aggregaten nemen sterk af in grootte en de substructuur oogt veel fijner. Voor het ongemalen poeder hebben de kleinste entiteiten micrometer afmetingen, terwijl deze in het gemalen poeder afnemen tot een honderdtal nanometer. Deze entiteiten hangen nog enigszins aan elkaar vast, maar door goed schudden of een ultrasoon bad kunnen deze losgekoppeld worden. Centrifugeren en suspenderen in een 5mM NaOH oplossing gaf uiteindelijk aanleiding tot het monster weergegeven in figuur 4.21(c). Dit SEM beeld werd verkregen na het aanbrengen van een goudcoating om de elektrostatische oplading tegen te gaan en zo de scherpte van het beeld te verbeteren. De goudpartikels zijn duidelijk zichtbaar en maken de figuur op het eerste zicht iets minder duidelijk. De gesputterde gouddeeltjes zijn gelukkig wel monodispers en iets kleiner dan de korrels van het onderzochte proefstuk. Hierdoor kunnen toch nog vrij eenvoudig een aantal  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  deeltjes waargenomen worden, waarvan de diameter rond de 40-100nm wordt geschat.

De gemiddelde diameter die op basis van deze SEM beelden afgeschat wordt (40-100nm), is iets lager dan de diameter bekomen met DLS metingen (50-150nm). Dit hoeft ons niet te verbazen aangezien de DLS metingen waarden voor de hydrodynamische diameter weergegeven van deeltjes met omringende solvatatieschil. Beide meetmethoden leveren dus consistente resultaten op. De eenvoud van DLS metingen voor deeltjes in oplossing, maakt deze metingen uiteraard meer toegankelijk en het merendeel van de metingen werd dan ook op deze manier uitgevoerd.

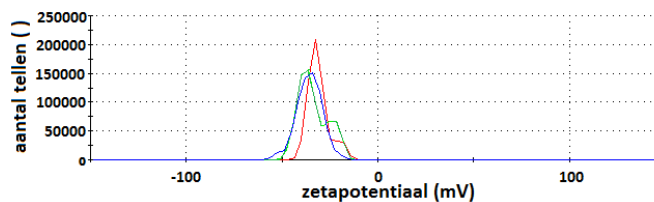
Tot slot werden met de Hitachi S-3400N SEM ook een aantal beelden gemaakt van een gemalen poeder (10min) voor het centrifugeren (figuur 4.22). De 5mM NaOH oplossing werd uitgedampt op een aluminium substraat en de nanopartikels bevinden zich dus in een natriumrijke omgeving. Aangezien de detectie gebeurt op basis van teruggestrooide elektronen is de gedetecteerde intensiteit hoger voor de zwaardere Ca en Si atomen dan voor het lichtere Na. Daarom kunnen de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  partikels duidelijk waargenomen worden als helder ogende stippen in de natriumrijke omgeving. Dit werd tevens bevestigd door EDX opnames. In figuur 4.22 (links) wordt een duidelijke spreiding op de grootte van de partikels waargenomen. Dit hoeft ons niet te verbazen aangezien de oplossing nog niet gecentrifugeerd werd voor de uitdamping.



**Figuur 4.22:** SEM beelden van uitgedampte nanopartikels (5mM NaOH oplossing, voor centrifugeren). De helder ogende partikels werden geïdentificeerd als  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8\cdot\text{Eu,Tm}$  deeltjes en zijn ingebed in een natriumrijke omgeving.

### Zetapotential

Uit de resultaten van de PLAL experimenten bleek de 5mM NaOH oplossing een goede stabiliteit te verzekeren. Daarom werden de materialen na het malen in gedeïoniseerd water gemengd tot een 5mM NaOH oplossing. Een typisch voorbeeld van de opgemeten zetapotential wordt in figuur 4.23 gegeven. De zetapotential bleek opnieuw gepiekt rond -35mV tot -40mV (bij pH 10) en het neutrale punt wordt niet overschreden. De goede stabiliteit van deze oplossing wordt bevestigd door de DLS metingen van de grootte, waarbij na verloop van enkele weken nog steeds weinig tot geen aggregatie werd waargenomen.



**Figuur 4.23:** Opgemeten zetapotential in een 5mM NaOH oplossing na 10min *wet grinding*.

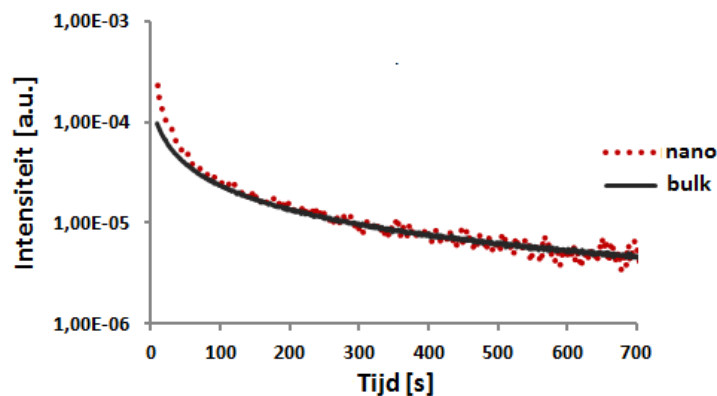
## 4.3 Karakterisering van de nanodeeltjes

De diameter van de deeltjes en de zetapotential zoals hierboven besproken, zijn twee belangrijke eigenschappen van een colloïdale oplossing. Een verdere karakterisering van de persistent luminescente nanopartikels is in deze masterproef echter onontbeerlijk. Hierbij kan nagegaan worden in welke mate het malen van het materiaal invloed heeft op luminescente eigenschappen zoals het persistente verval en het emissie- en excitatiespectrum. Bovendien kunnen SEM-CL metingen andere interessante informatie over de partikels geven en ook de concentratie van de colloïdale oplossing is een belangrijke parameter. Al deze topics zullen dan ook aan bod komen in deze sectie. Aangezien bij het produceren van de stockoplossing vertrokken werd van het materiaal met 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux, worden de resultaten van de NPs vergeleken met de eigenschappen van dit bulkpoeder. Voor de duidelijkheid wil ik hier herhalen dat de stockoplossing bekomen wordt door het poeder 10min te malen in de planetaire ballenmolen en daarna te centrifugeren (5min aan 4500rpm). De overgrote meerderheid van de deeltjes heeft een diameter rond de 100nm (zie sectie 4.2.2) en deze oplossing wordt ook gebruikt voor het toxiciteitsonderzoek. Naast resultaten voor de stockoplossing zullen in deze sectie echter ook resultaten voor ongecentrifugeerde oplossingen en droge NPs aan bod komen. Alle NPs in deze sectie werden verkregen door malen

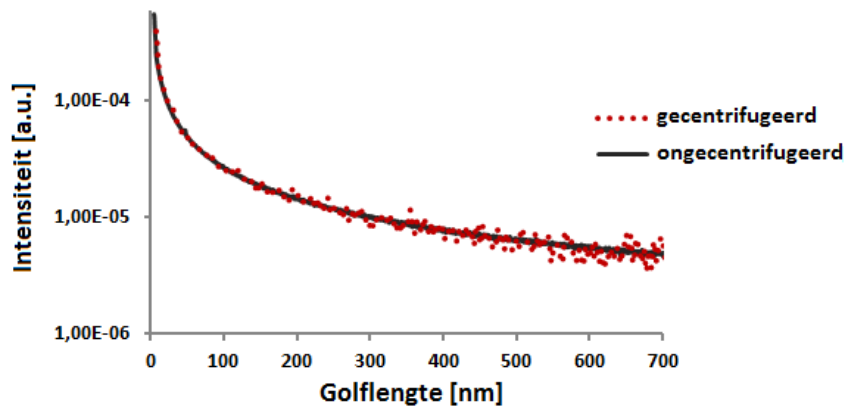
in oplossing en partikels bekomen met gepulste laserablatie zullen hier niet verder behandeld worden.

### 4.3.1 Persistent verval

Bij het malen van het persistent luminescente materiaal, wordt in eerste instantie de deeltjes-grootte gereduceerd. Deze groottereductie kan echter verregaande gevolgen hebben op de persistente eigenschappen. Zo lijkt het aannemelijk dat extra oppervlakdefecten worden gegenereerd door het malen en dat de verhoogde oppervlak tot volume verhouding aanleiding kan geven tot meer niet-radiatieve recombinatie. Net zoals voor het bulk materiaal, werd de persistente luminescentie van de nanodeeltjes geïnduceerd door de colloïdale oplossing (in een glazen beker) te belichten met een Xe boog lamp bij 1000lux gedurende twee minuten. Daarna werd de beker onder de ILT spectrometer geplaatst om het persistente verval te detecteren.



**Figuur 4.24:** Persistent luminescent verval voor bulkpoeder (8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux) en een deel van de stockoplossing ('nano').



**Figuur 4.25:** Persistent luminescent verval voor een ongecentrifugeerde en gecentrifugeerde oplossing met nanopartikels. De gecentrifugeerde oplossing is de stockoplossing (zie ook figuur 4.24).

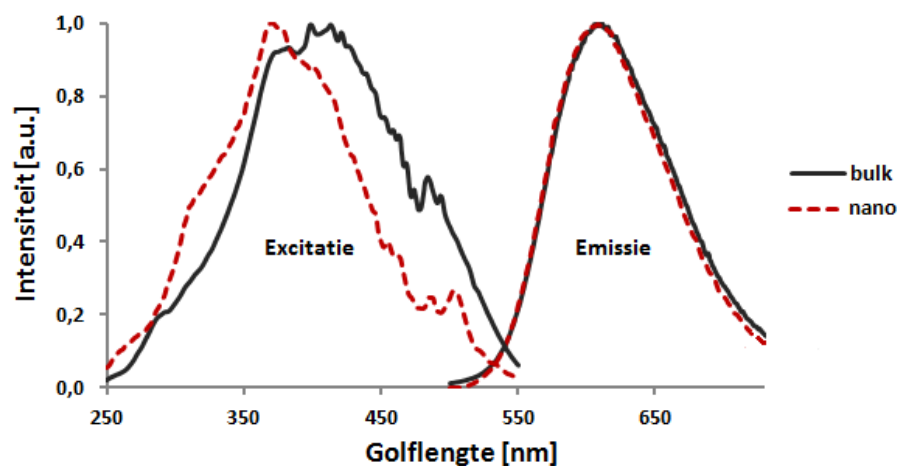
In figuur 4.24 wordt een opgemeten vervalcurve van het bulkmateriaal samen met deze van een colloïdale oplossing weergegeven. De onderzochte oplossing was in dit geval een gedeelte van de stockoplossing. Kwantitatieve uitspraken over de opgemeten intensiteit van de colloïdale oplossing (in  $\text{cd}/\text{m}^2$ ) lijken weinig zinvol. De intensiteit is sterk afhankelijk van de concentratie aan nanodeeltjes, het volume van de oplossing en het aantal partikels dat zich dicht bij het focaal vlak van de lichtmeter bevindt. Het is bovendien niet a priori duidelijk hoe de intensiteit voor bulk- en nanomateriaal op een zinvolle manier vergeleken kan worden. In figuur 4.24 wordt

daarom een herschaalde weergave van de metingen getoond. De metingen werden herschaald zodat het verval op het einde van de meting samenvalt. Op deze figuur is visueel waar te nemen dat de vervalconstante voor het bulk- en nanomateriaal zeer gelijkaardig is en dit werd ook bekomen uit de fittingen (zie tabel 4.1 voor nano en 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Deze eigenschap van het persistente verval wordt dus niet gewijzigd door het malen. In dezelfde figuur is echter ook zichtbaar dat het persistente verval van de nanodeeltjes initieel veel sterker is. Vooral de eerste seconden na de excitatie blijken hierbij cruciaal te verschillen. Dit is mogelijks toe te wijzen aan snellere oppervlakrelaxatie voor de nanodeeltjes.

Het dient tot slot opgemerkt dat de hier besproken vervalcurve van de stockoplossing (met 100nm deeltjes) samenvalt met de vervalcurves opgemeten voor gemalen maar ongecentrifugeerde oplossingen. Bovendien is ook de vervalcurve van droge NPs, uitgedampt uit een gemalen maar ongecentrifugeerde oplossing, hieraan identiek (data niet weergegeven). Het verval van de stockoplossing wordt samen met het verval van een ongecentrifugeerde oplossing weergegeven in figuur 4.25. Hierbij werden de resultaten opnieuw herschaald zodat ze samenvallen op het einde van de meting. Het persistente verval van de NPs in de stockoplossing werd tot slot ook opgemeten na 3 maand stockage. Hierbij kon geen intensiteitsafname worden waargenomen en de partikels lijken dus niet of nauwelijks te degraderen in de 5mM NaOH oplossing.

### 4.3.2 Emissie- en excitatiespectra

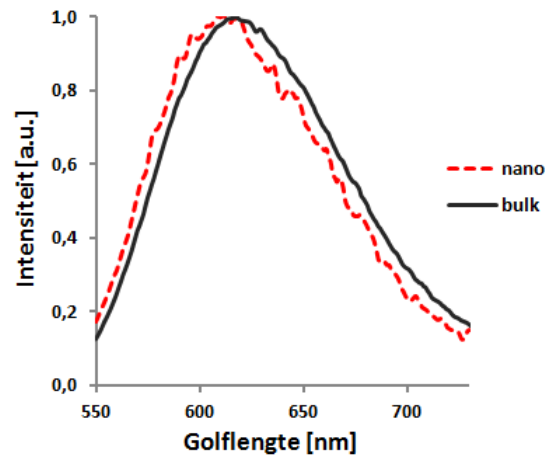
Net zoals bij de vervalmetingen, werden de emissie- en excitatiespectra zowel voor de stockoplossing (100nm deeltjes) als voor een ongecentrifugeerde oplossing gemeten. Hierbij werd vastgesteld dat de fluorescente excitatie- en emissiespectra van de stockoplossing vrijwel samenvallen met de spectra van de gemalen maar ongecentrifugeerde oplossingen (data niet weergegeven). Het persistente emissiespectrum werd om praktische redenen enkel gemeten voor een niet gecentrifugeerde en dus hoger geconcentreerde oplossing.



**Figuur 4.26:** Fotoluminescente emissie- en excitatiespectra voor bulkpoeder (8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux) en de stockoplossing ('nano').

De fluorescente emissie- en excitatiespectra voor respectievelijk het bulk- en het nanomateriaal worden weergegeven in figuur 4.26. Het nanomateriaal in deze figuur is een gedeelte van de stockoplossing. Het excitatiespectrum van de NPs is enigszins gewijzigd en opgeschoven naar kortere golflengten, maar de fotoluminescentie kan nog steeds geïnduceerd worden met nabij-UV en blauw licht. Het fluorescente emissiespectrum van de nanodeeltjes daarentegen is vrijwel ongewijzigd ten opzichte van dat van de bulk. Het persistente emissiespectrum tot slot werd niet gemeten voor de stockoplossing maar wel voor een ongecentrifugeerde oplossing. Hierbij bleek

dat het persistente emissiespectrum van het nanomateriaal niet verschoven is ten opzichte van het fluorescente spectrum. De emissiespectra vertonen dus in tegenstelling tot de bulkspectra geen roodverschuiving en de persistente emissiespectra van bulk- en nanomateriaal vallen bijgevolg niet langer samen (figuur 4.27). De reden hiervoor is niet a priori duidelijk.



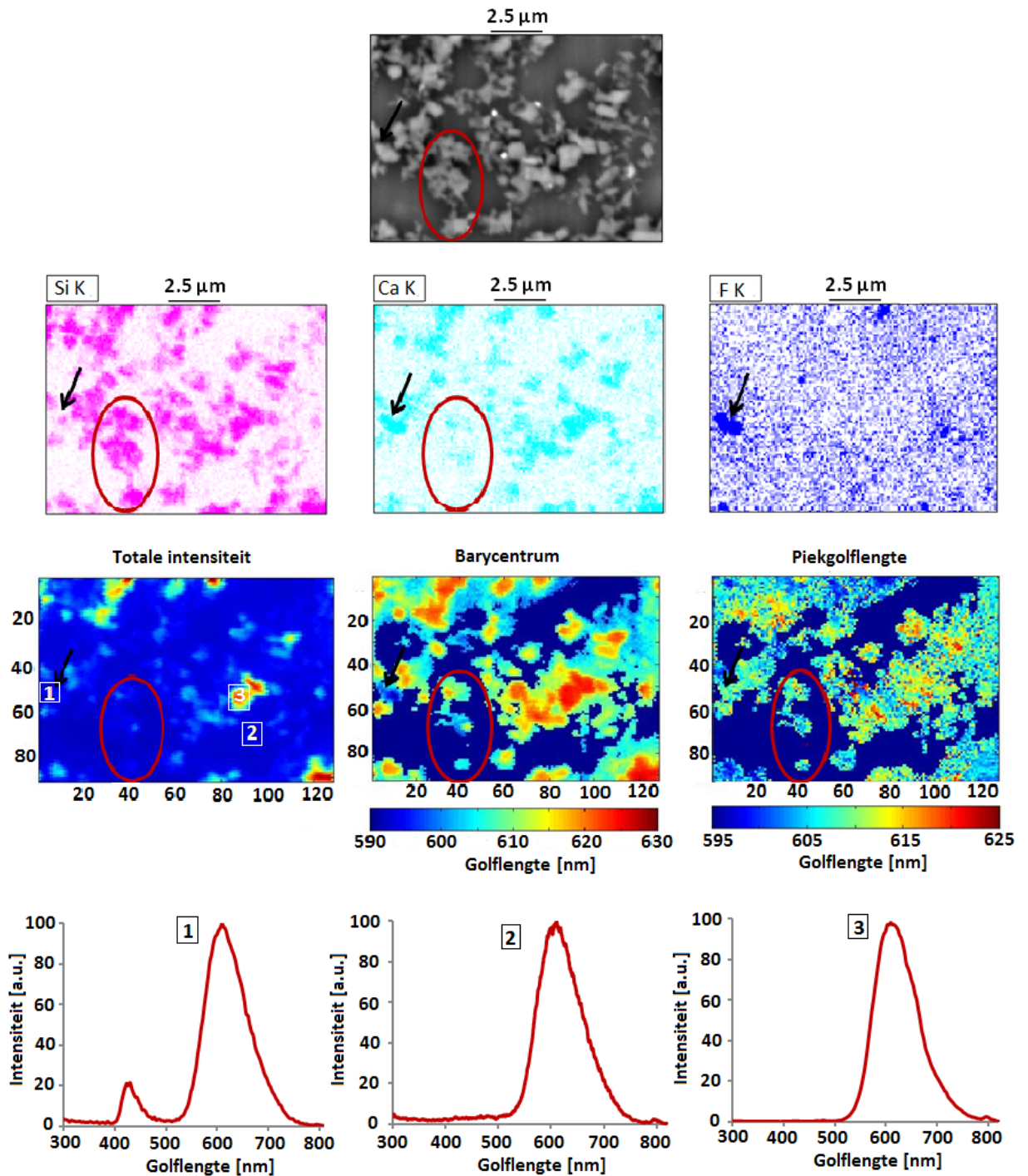
**Figuur 4.27:** Persistente emissiespectra voor bulkpoeder en nanomateriaal. Het nanomateriaal is hier een ongecentrifugeerde oplossing (10min gemalen) en niet de stockoplossing.

Om de verschuiving van het fluorescente excitatiespectrum en het persistente emissiespectrum te verifiëren, werden tot slot ook metingen uitgevoerd op droge nanopartikels. Deze partikels werden bekomen door een gemalen (10min) maar ongecentrifugeerde oplossing te laten uitdampen. De spectra van de droge partikels vielen quasi volledig samen met de spectra van de gesolvateerde NPs. Een artificiële verschuiving van het excitatiespectrum en/of persistente emissiespectrum ten gevolge van de omringende waterige oplossing kan dus in elk geval uitgesloten worden.

### 4.3.3 SEM-CL en SEM-EDX resultaten

SEM-CL en -EDX metingen zijn door de haalbare precisie niet enkel geschikt voor bulkpoeder maar ook voor het onderzoeken van nanopartikels. De combinatie van beide metingen maakt het bovendien mogelijk om de invloed van de materiaalsamenstelling op de cathodeluminescente emissie te onderzoeken. Door complicaties bij het uitdampen van NaOH oplossingen, werden dit soort metingen niet uitgevoerd op de stockoplossing maar wel op materialen die 5 of 10 minuten gemalen werden in gedeïoniseerd water. Het water werd uiteraard uitgedampt vooraleer de droge partikels met de SEM onderzocht werden.

In figuur 4.28 worden EDX resultaten (Si, Ca en F concentratie) gegeven voor een poeder dat 5min gemalen is. Het gebruikte poeder werd geproduceerd met 3wt% KF flux, wat de plekken met een verhoogde fluorconcentratie verklaart. De belangrijkste fluorrijke plek is aangeduid met een zwarte pijl in de figuur. De calciumconcentratie op deze positie is ook verhoogd terwijl de siliciumconcentratie verlaagd is. Dit stemt overeen met de observaties uit sectie 4.1.1 waarbij de vorming van een  $\text{CaF}_2\text{:Eu}$  fase werd gesuggereerd. Een naburige siliciumrijke fase is eveneens aangeduid op de figuur en wijst vermoedelijk (deels) op een overblijvende  $\text{Si}_3\text{N}_4$  fase. Resultaten van de overeenkomstige SEM-CL metingen worden weergegeven in figuur 4.28. Het is duidelijk dat de grootste partikels de sterkste lichtemissie veroorzaken maar dat ook de kleine partikels licht emitteren. Zoals verwacht, wordt ook vastgesteld dat het zuivere  $\text{Si}_3\text{N}_4$  geen licht uitzendt en dat de fluorrijke fase een beperkte cathodeluminescentie vertoont. Bovendien valt op dat het barycentrum van de emissie zich in de fluorrijke fase bij kortere golflengten bevindt. Het bijhorende emissiespectrum wordt weergegeven in figuur 4.28 (positie 1) en de duidelijke piek rond



**Figuur 4.28:** SEM beeld (bovenaan) en EDX map van Si, Ca en F (tweede rij) voor een gemalen materiaal (5min) met 3wt% KF flux. De zwarte pijl wijst op een calcium- en fluorrijke fase terwijl de rode ellips een siliciumrijke fase aanduidt. Op de derde rij worden de SEM-CL resultaten weergegeven: totale intensiteit (links), barycentrum (midden) en piekgolflengte (rechts). Onderaan worden drie emissiespectra getoond, behorend bij posities 1, 2 en 3 aangeduid in de totale intensiteit van de SEM-CL resultaten.

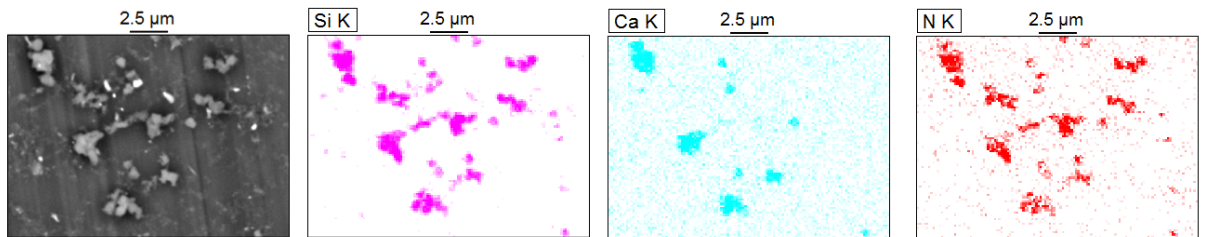
435nm verklaart waarom het barycentrum naar kortere golflengten is verschoven. Bovendien geeft de blauwe emissie evidentie voor de vorming van een  $\text{CaF}_2:\text{Eu}$  fase [36].

Tot slot merken we in figuur 4.28 nog op dat op basis van de berekende barycentra de minder intense en dus kleinere partikels licht lijken te emitteren bij kortere golflengten. Dit is echter

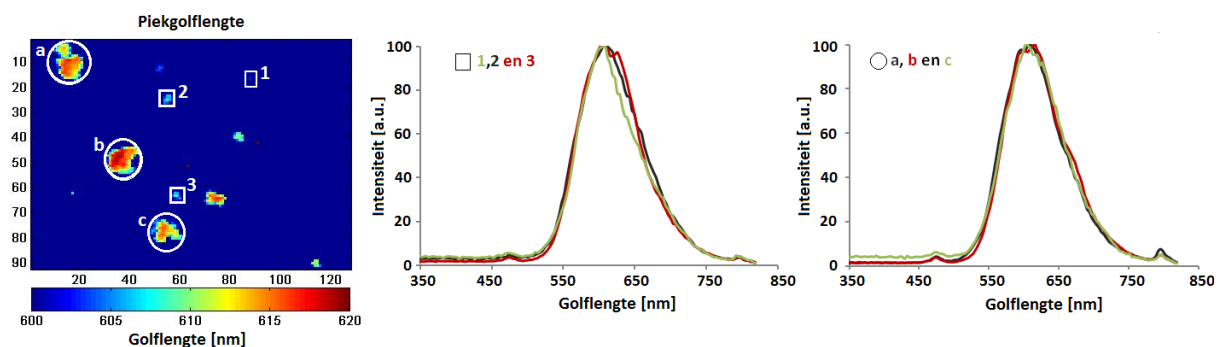


een te voorbarige conclusie aangezien voor deze punten de ruis in het blauwe spectraal gebied een sterke invloed heeft op het berekende barycentrum. De plot met de piekgolflengten vertoont veel minder spreiding en sluit in dit opzicht beter aan bij de verwachting van een gelijkaardig emissiespectrum onafhankelijk van de deeltjesgrootte. Dit wordt visueel verduidelijkt met de emissiespectra van positie 2 en 3 in figuur 4.28: het verschil in piekgolflengte is hooguit 1-2nm (afhankelijk van de gebruikte uitmiddeling) en het verschil in barycentrum wordt mede bepaald door de ruis op positie 2.

In figuur 4.29 worden de EDX resultaten voor een ander monster weergegeven samen met enkele bijhorende SEM-CL resultaten in figuur 4.30. Beide figuren maken het belang van een optimale vormingsreactie van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  duidelijk. De  $\text{Si}_3\text{N}_4$  fase zorgt immers voor veel nanopartikels die niet bijdragen tot de lichtemissie. Deze SEM beelden geven vermoedelijk een vertekend beeld van de reële concentratie  $\text{Si}_3\text{N}_4$  in het nanomateriaal, maar geven wel stof tot nadenken: het is immers niet a priori duidelijk of de concentratie  $\text{Si}_3\text{N}_4$  in het bulkmateriaal wel dezelfde is als de concentratie  $\text{Si}_3\text{N}_4$  in een gecentrifugeerde oplossing nanodeeltjes. Zo lijkt het niet onmogelijk dat  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  moeilijker tot kleine partikels vermalen kan worden dan  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , waardoor relatief gezien meer kleine  $\text{Si}_3\text{N}_4$  deeltjes overblijven na centrifugeren. Verder onderzoek hiernaar is echter noodzakelijk. Naast de aanwezigheid van  $\text{Si}_3\text{N}_4$ , kunnen we in de figuren ook waarnemen dat alle goed gevormde  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8$ , Eu, Tm deeltjes lichtemissie veroorzaken. In figuur 4.30 is duidelijk zichtbaar dat alle partikels bovendien een zeer gelijkaardig emissiespectrum vertonen, onafhankelijk van de grootte. Verder vallen secundaire emissiepieken rond 475nm en 800nm op. Deze pieken zijn vermoedelijk afkomstig van  $\text{Tm}^{3+}$  emissie [11, 36].



**Figuur 4.29:** SEM beeld en EDX map van Si, Ca en N voor een gemalen materiaal (10min) met 3wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux. Bemerkt de siliciumrijke gebieden (met een beperkte hoeveelheid calcium).



**Figuur 4.30:** SEM-CL resultaat voor de piekgolflengte samen met de emissiespectra van drie kleinere partikels (1,2 en 3) en drie grotere aggregaten (a,b en c). De vierkante en cirkulaire omrandingen werden aangebracht ter verduidelijking en de werkelijke meetpunten bevinden zich in het midden van de omrandingen. De overeenkomstige SEM-EDX resultaten voor dit monster (10min gemalen, 3wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux) zijn weergegeven in figuur 4.29.

#### 4.3.4 Concentratie van de colloïdale oplossing

Tot slot kan ook de concentratie van de stockoplossing onderzocht worden. De concentratie is een belangrijke parameter voor het toxiciteitsonderzoek, maar het bepalen van een absolute concentratie is echter geen evidentie. De aanwezigheid van 5mM NaOH in de oplossing zorgt hierbij voor complicaties. Om de concentratie van een oplossing te bepalen, kan men de vloeistof uitdampen en vervolgens het droge materiaal nauwkeurig wegen. Op deze manier bekomt men op eenvoudige manier een concentratie (in termen van gewicht aan materiaal per volume van de oplossing). De nauwkeurigheid van de weging beperkt de haalbare precisie, maar bij het uitdampen van een natriumhydroxide oplossing treden een aantal extra problemen op. Om te beginnen wordt het NaOH ook neergeslagen bij het uitdampen. Aangezien de molaire concentratie NaOH gekend is, en het gewicht dus kan berekend worden, hoeft dit op zich geen probleem te vormen. NaOH is echter hygroscopisch en het is zeer de vraag hoeveel water op die manier in het ‘droge’ materiaal aanwezig blijft of hoeveel water na het uitdampen snel terug wordt opgenomen. Bovendien is de werkelijke concentratie NaOH in de initiële oplossing vermoedelijk lager dan de bedoelde 5mM. Hiervoor bestaan twee oorzaken: enerzijds is het onzeker wat, na stockage, de werkelijke concentratie NaOH in de afgewogen pastilles is. Anderzijds kan de concentratie in de oplossing na verloop van tijd ook enigszins veranderen door reactie met CO<sub>2</sub> in de lucht. Dit alles zorgt voor extra onzekerheid bij interpretatie van de afgewogen massa. Andere goede alternatieven voor de concentratiebepaling waren echter niet onmiddellijk beschikbaar.

Om bruikbare resultaten te bekomen voor de concentratie van de stockoplossing, werden zoveel mogelijk controlemechanismen ingebouwd. De hoeveelheid fosfor werd afgewogen voor het malen en het volume van de oplossing werd bepaald. Op die manier is de initiële concentratie van de oplossing gekend. Door vervolgens de colloïdale oplossing te centrifugereren en het centrifugaat af te wegen, kan een eerste schatting van de finale concentratie bekomen worden. Hierbij werd benaderend ondersteld dat het centrifugaat geen NaOH bevat, maar dat al de NaOH tijdens het centrifugereren opgelost blijft in de resterende oplossing. Een tweede schatting wordt bekomen door de finale oplossing uit te dampen en het uitgedroogde materiaal te wegen. Hierbij werd rekening gehouden met de aanwezigheid van NaOH in het uitgedroogde materiaal. Tot slot kan dit herhaald worden voor verschillende monsters van de stockoplossing om de reproduceerbaarheid te controleren. Eventueel zou ook de stockoplossing vrijwel volledig gesedimenteerd kunnen worden door een voldoende lange centrifugering. Het gewicht van dit centrifugaat zou dan opnieuw dienst doen voor een benaderende concentratiebepaling. Het is echter moeilijk te voorspellen hoe lang hiervoor gecentrifugeerd moet worden en bovendien zijn er een aantal factoren die de nauwkeurigheid ook hier beperken. Daarom werd deze methode niet getest.

De concentratie die op basis van al de wegingen werd afgeschat, is  $\approx 0.1\text{mg/ml}$ . Eerder werd reeds vermeld (sectie 4.2.2) dat de oplossing na het malen van het poeder aangelengd werd tot een 5mM NaOH oplossing met een concentratie van  $0.5\text{mg/ml}$ . De efficiëntie waarmee NPs met een diameter van  $\pm 100\text{nm}$  bekomen worden, bedraagt dus  $\approx 20\%$ . Dit kan vergeleken worden met eerder gerapporteerde resultaten voor Ca<sub>0.2</sub>Zn<sub>0.9</sub>Mg<sub>0.9</sub>Si<sub>2</sub>O<sub>6</sub>:Eu,Dy,Mn waarbij 80 en 180nm partikels verkregen werden met een efficiëntie van respectievelijk 2 en 30% [38]. In dit geval werd het poeder handmatig gemalen gedurende 15min.

Indien we uitgaan van partikels met een diameter van 100nm en een concentratie van  $0.1\text{mg/ml}$ , kan op basis van en de massadichtheid van Ca<sub>2</sub>Si<sub>5</sub>N<sub>8</sub> ( $\rho = 3.06\text{g/cm}^3$ , via FindIt) het aantal partikels per milliliter oplossing afgeschat worden als  $\approx 6 \times 10^{10}$ . De molaire concentratie die overeenstemt met  $0.1\text{mg/ml}$  is ongeveer 300 micromolair. De concentraties die gebruikt worden voor toxiciteitsonderzoek, variëren sterk afhankelijk van de onderzochte partikels en hun chemische samenstelling. Vaak worden de concentraties uitgedrukt in molair (ook al is dit niet steeds de meest relevante eenheid) en worden *in vitro* proeven uitgevoerd op concentraties vanaf enkele nanomolair tot enkele micromolair. De stockoplossing is dus zeker voldoende geconcentreerd

om achteraf in het celmedium gemengd te worden voor verder toxiciteitsonderzoek (zie volgende sectie). Bij *in vivo* experimenten in de toekomst, zullen hogere concentraties waarschijnlijk noodzakelijk zijn.

## 4.4 Nanotoxiciteit van $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ nanopartikels

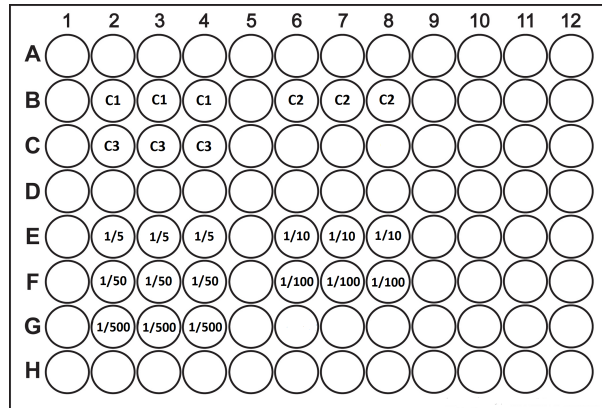
Tot slot van dit hoofdstuk, zal in deze sectie de toxiciteit van de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  nanopartikels besproken worden. Aangezien men het gebruik van proeven op dieren zoveel mogelijk wil beperken, wordt de nanotoxiciteit in eerste instantie steeds onderzocht met *in vitro* technieken in plaats van *in vivo* experimenten. Door middel van *in vitro* proeven (*assays*) kunnen potentiële toxicologische effecten vroegtijdig opgespoord worden. Tientallen, zo niet honderden verschillende proeven kunnen uitgevoerd worden om de toxiciteit van nanopartikels te onderzoeken. Zowel de cytotoxiciteit, de genotoxiciteit als de veranderende genexpressie en celproliferatie kunnen hiermee onderzocht worden. In deze masterproef zullen twee standaard proeven gebruikt worden voor het onderzoeken van de acute cytotoxiciteit: LDH en MTT. Dit moet ons in staat stellen om op relatief beperkte tijd een eerste indicatie van de toxiciteit te bekomen.

Deze proeven worden uitgevoerd op cellen in cultuur, waarvoor Hela cellijnen gebruikt werden. Deze cellijnen zijn zeer sterk en vruchtbaar en worden daarom vaak gebruikt voor wetenschappelijk onderzoek. Aan de proeven zelf gaat twee dagen voorbereiding vooraf: op de eerste dag worden de cellen in een 96-wells plaat (zie figuur 4.31) gezaaid in  $200\mu\text{l}$  medium, en na een dag wordt het medium verwijderd en de te onderzoeken oplossing aangebracht. Deze rustperiode is nodig om de cellen te laten aanhechten aan de well plaat. De cellen worden vervolgens nog één dag geïncubeerd (bij  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  bevochtigd) vooraleer de eigenlijke meting kan starten. Andere incubatietijden zijn eveneens mogelijk maar werden hier niet onderzocht. Tijdens de incubatieperiode kunnen de cellen reageren op de veranderde omstandigheden en de toxiciteit van de aangebrachte oplossing kan op die manier nagegaan worden. De onderzochte oplossingen bestaan in ons geval uit medium met daarin verschillende concentraties van de stockoplossing met luminescente deeltjes. Voor elke verdunning worden drie wells gebruikt (zie figuur 4.31) en bovendien worden voor elke proef drie 96-wells platen onderzocht. Er worden steeds ook een aantal controle wells gebruikt met medium en een aantal controle wells met een hoge concentratie stockoplossing maar zonder cellen (zie figuur 4.31). Deze laatste wells worden gebruikt om de interactie van de nanopartikels met de uitlezing van de proef te onderzoeken. Een dergelijke controle is nodig aangezien de uitlezingen gebaseerd zijn op absorptiemetingen terwijl de persistente nanopartikels zelf ook licht absorberen. De andere controlewells worden gebruikt als referentiewaarde voor 0% en 100% levensvatbaarheid (100% en 0% toxiciteit). De berekende toxiciteit of levensvatbaarheid wordt dan ook steeds ten opzichte van deze wells gerefereerd. De 0% referentie voor levensvatbaarheid (positieve controle) wordt bekomen door de cellen bloot te stellen aan een dodelijke concentratie Triton X-100. De referentie wells voor 100% levensvatbaarheid (negatieve controle) bevatten medium zonder nanopartikels of dodende stoffen.

### 4.4.1 Lactaatdehydrogenase (LDH)

Een eerste standaard proef voor het onderzoeken van cytotoxiciteit is gebaseerd op een meting van LDH. LDH is een enzym dat een belangrijke rol speelt bij celademhaling en is aanwezig in bijna alle types cellen. Onder normale omstandigheden blijft LDH grotendeels binnen in het cytoplasma van de cellen en uitwendig is weinig LDH aanwezig. Wanneer de celwand echter beschadigd raakt, wordt LDH snel vrijgegeven. Door de concentratie LDH in het extracellulair medium te meten, wordt dus een beeld verkregen van de membraanpermeabiliteit van de cellen. De LDH test wordt standaard gebruikt als een maatstaf voor celdood, maar eigenlijk is het dus

een rechtstreekse meting van schade aan het celmembraan. Aangezien celdood of cytotoxiciteit vaak geëvalueerd wordt op basis van de membraanschade, is LDH hiervoor echter een ideale marker. Bij de gebruikte LDH-cytotoxiciteit testkit, wordt gewerkt op basis van WST (*Water Soluble Tetrazolium*, water oplosbaar tetrazolium) voor een snelle en gevoelige detectie van LDH. Het principe is gebaseerd op een enzymatische koppelingsreactie waarbij uiteindelijk een oplosbaar geel formazanproduct wordt gegenereerd.



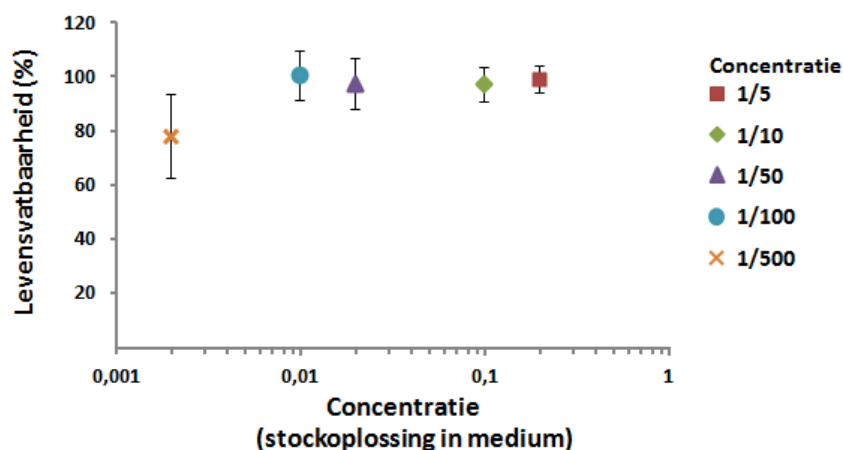
**Figuur 4.31:** Typische configuratie bij het incuberen op 96-wells platen. De wells met C1 en C2 bevatten medium en cellen. De wells met C3 bevatten medium met de hoogste concentratie (hier 1/5) aan stockoplossing maar geen cellen. De andere wells bevatten cellen en medium met de weergegeven concentratie aan stockoplossing.

Voor de LDH proef worden bij het kweken  $\pm 25000$  cellen per well aangebracht in 200 microliter medium. De onderzochte concentraties van stockoplossing in medium bedragen 1/5, 1/10, 1/50, 1/100 en 1/500. De gebruikte configuratie op de 96-wells plaat wordt geïllustreerd in figuur 4.31. Na 24 uur incuberen in deze oplossingen, worden de cellen in de positieve controlewells (C2 in de figuur) gedood met Triton X-100. Vervolgens wordt  $20\mu\text{l}$  uit elke well overgebracht in een andere plaat en in de nieuwe wells wordt  $100\mu\text{l}$  van een oplossing met WST toegevoegd. Tijdens de daaropvolgende 30min incubatie, kan WST met LDH interageren. De gele formazan kleurstof die hierbij ontstaat, heeft een absorptiepiek in het groene gebied (490nm) en emitteert in het gele gebied. De absorptie bij 490nm staat in direct verband met de vrijgekomen hoeveelheid LDH. De absorptie of optische densiteit (OD) is meer bepaald evenredig met de hoeveelheid LDH. De levensvatbaarheid van de cellen kan dus bepaald worden door de absorptie te meten en volgende formule toe te passen:

$$\text{Levensvatbaarheid(\%)} = \frac{\text{OD}_{\text{test monster}} - \text{OD}_{\text{positieve controle}}}{\text{OD}_{\text{negatieve controle}} - \text{OD}_{\text{positieve controle}}} \times 100. \quad (4.2)$$

Hierbij wordt gebruik gemaakt van de eerder vermelde positieve controles (0% levensvatbaarheid) en negatieve controles (100% levensvatbaarheid). De waarden voor de optische densiteit worden opgemeten met een plaatlezer (EnVision Multilabel Reader, PerkinElmer) en worden bij de verwerking uitgemiddeld over de drie identieke wells per plaat. De verkregen resultaten voor de levensvatbaarheid worden weergegeven in figuur 4.32. Op basis van de controlewells met enkel NPs (C3 in figuur 4.31) werd geen interactie van de NPs met de uitlezing van de proef waargenomen. Dit was ook het geval voor alle volgende proeven en deze controlewells werden dan ook niet verder gebruikt.

Op basis van deze resultaten, lijken de nanopartikels zeer weinig acute toxiciteit uit te lokken. De laagste concentratie nanopartikels (1/500) blijkt bovendien aanleiding te geven tot de meeste toxiciteit ( $\approx 20\%$ ). Dit is enigszins contra-intuïtief, maar kan vermoedelijk verklaard worden door rekening te houden met agglomeratie in het medium. Deze agglomeratie in biologische vloeistoffen wordt vaak vastgesteld bij het *in vitro* onderzoek en kan door NP en medium gerelateerde



**Figuur 4.32:** De berekende levensvatbaarheid (t.o.v. de positieve en negatieve controles) op basis van LDH voor verschillende concentraties van de stockoplossing in het medium. De foutenbalken geven de standaarddeviatie weer.

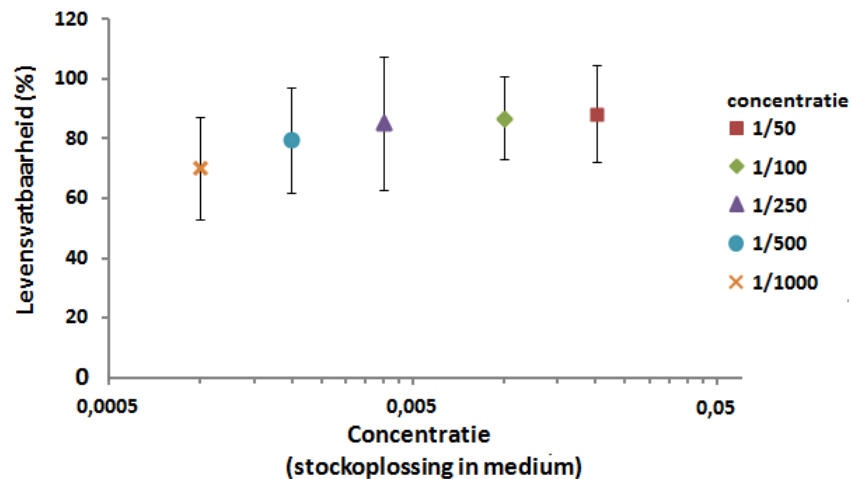
parameters beïnvloed worden [15, 39]. Een van de belangrijkste redenen voor agglomeratie, is vermoedelijk de aanwezigheid van serumproteïnen die een corona rond de nanopartikels vormen en agglomeratie stimuleren [40, 16]. Andere oorzaken zijn echter mogelijk en de reden(en) voor agglomeratie zijn nog steeds onderwerp van debat. Deze agglomeratie heeft niet alleen een invloed op de grootte maar ook op de oppervlakte tot volume verhouding en op het aantal partikels. Dit kan de toxiciteit uiteraard sterk veranderen. In de meeste gevallen wordt waargenomen dat de partikels na agglomeratie minder toxiciteit uitlokken aangezien grote agglomeraten moeilijker in de cellen worden opgenomen [41]. De opname van NPs of agglomeraten kan op verschillende manieren gebeuren en is van meerdere factoren afhankelijk. De mechanismen hierachter zijn nog niet volledig begrepen, maar het staat vast dat deze opname beperkter is voor grote partikels. Hogere concentraties NPs geven vermoedelijk sneller aanleiding tot aggregatie en de verminderde opname zou bijgevolg kunnen verklaren waarom hogere concentraties minder toxisch blijken. Het lijkt dan ook zinloos om nog hogere concentraties te testen.

In een tweede proevenreeks, werden wel lagere concentraties tot 1/2000 van de stockoplossing in medium getest. Om een onverklaarbare reden, bleken de negatieve controlewells bij deze test een bijzonder hoge LDH vrijgave te vertonen. Alle onderzochte concentraties vertoonden een veel grotere levensvatbaarheid dan de negatieve controlewells en het is dan ook niet zinvol om resultaten weer te geven relatief ten opzichte van deze wells als referentie. De resultaten van de verschillende concentraties NPs kunnen onderling echter wel nog steeds met elkaar vergeleken worden. Hieruit bleek dat de LDH vrijgave zeer gelijkaardig was voor cellen blootgesteld aan een concentratie van respectievelijk 1/500, 1/1000 en 1/2000 (afwijkingen kleiner dan de standaarddeviatie). Bijgevolg lijkt de toxiciteit niet verder verhoogd te worden door een lagere concentratie nanopartikels en de waargenomen cytotoxiciteit bedraagt dus maximaal  $\approx 20\%$ .

#### 4.4.2 MTT

De tweede test die in deze masterproef besproken wordt, maakt gebruik van de oplosbare tetrazolium kleurstof MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). De MTT test is een kwantitatief colorimetrische proef die gebruikt wordt om celproliferatie (groei en deling) en cytotoxiciteit te onderzoeken. Een verhoogde cellulaire metabolische activiteit zorgt voor een sterkere reductie van MTT. MTT wordt hierbij gereduceerd tot een paarse formazan substantie en de optische absorptie hiervan kan gebruikt worden als maatstaf voor de cellulaire activiteit. Dit is op zijn beurt een handige parameter om het aantal levensvatbare

cellen te onderzoeken en de cytotoxiciteit in kaart te brengen.



**Figuur 4.33:** De berekende levensvatbaarheid (t.o.v. de positieve en negatieve controles) op basis van MTT voor verschillende concentraties van de stockoplossing in het medium. De foutenbalken geven de standaarddeviatie weer.

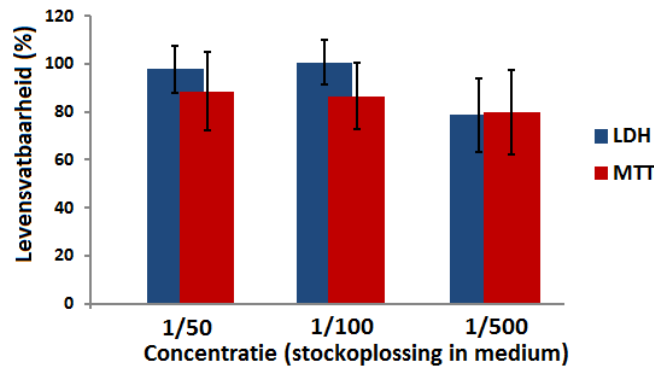
Voor de MTT proef worden bij het kweken  $\pm 50000$  cellen per well aangebracht in 200 microliter medium. De onderzochte concentraties van stockoplossing in medium bedragen 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 en 1/1000. Na 24 uur incuberen wordt vervolgens  $30\mu\text{l}$  van een MTT oplossing ( $5\text{mg/ml}$  in PBS) toegevoegd en de well plaat wordt opnieuw 3 uur geïncubeerd. Gedurende deze periode, zorgt de cellulaire activiteit voor een reductie van MTT tot paarse formazan kristallen. Na verwijdering van het medium wordt tot slot een oplosmiddel toegevoegd waarin de formazan kristallen oplosbaar zijn (1% Triton X-100 en  $0.04\text{M}$  HCl in isopropanol). De well plaat wordt vervolgens gedurende 1 uur geschud vooraleer de absorptie wordt gedetecteerd met een plaatlezer (EnVision Multilabel Reader, PerkinElmer). In de positieve controlewells (0% levensvatbaarheid) wordt voor de incubatie met MTT een dodelijke hoeveelheid Triton X-100 toegevoegd. Deze wells vertonen dus (idealiter) geen cellulaire activiteit meer waardoor MTT niet gereduceerd wordt tot formazan en de absorptie minimaal is. De berekeningen gebeuren op identieke wijze als voor LDH en de resultaten worden weergegeven in figuur 4.33.

De spreiding op de resultaten bleek voor de MTT proef groter dan voor de LDH test, waardoor de standaarddeviaties behoorlijk oplopen. Hierdoor is enige voorzichtigheid bij de interpretatie van de resultaten noodzakelijk. De algemene trend lijkt echter opnieuw een stijgende toxiciteit voor dalende concentraties nanopartikels. In een tweede proevenreeks werden ook bij de MTT test lagere concentraties (tot 1/2000) getest. Aangezien ook hier problemen werden vastgesteld met de negatieve controlewells, worden deze resultaten opnieuw niet weergegeven. De concentratie 1/2000 bleek echter niet of nauwelijks te verschillen van de concentratie 1/1000 en een verhoogde toxiciteit werd dus ook hier niet meer waargenomen.

#### 4.4.3 Vergelijking MTT en LDH en conclusies cytotoxiciteit

Alvorens algemene conclusies te trekken, loont het de moeite om de resultaten van de MTT en LDH test met elkaar te vergelijken. Op basis van beide proeven werd immers een levensvatbaarheid afgeschat en idealiter zouden deze resultaten samenvallen. Om misverstanden te vermijden, wil ik hier eerst nog even de aandacht vestigen op de verschillende concentraties (stockoplossing in medium) bij de LDH en MTT proeven: 1/5, 1/10, 1/50, 1/100, 1/500 voor LDH en 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 en 1/1000 voor MTT. Deze aanpassing naar lagere concentraties werd gemaakt omdat de eerder uitgevoerde LDH testen weinig toxiciteit vertoonden voor

de hoogste concentraties (sectie 4.4.1). Expliciete vergelijkingen zullen dus enkel mogelijk zijn voor de concentraties 1/50, 1/100 en 1/500.



**Figuur 4.34:** Vergelijking van de berekende levensvatbaarheid op basis van LDH en MTT proeven voor drie verschillende concentraties (1/50, 1/100 en 1/500 stockoplossing in medium). De foutenbalken geven de standaarddeviaties weer.

Op basis van figuren 4.32 en 4.33 lijkt de berekende toxiciteit bij de MTT proef iets groter dan deze bij de LDH proef. De LDH testen wijzen enkel op een noemenswaardige toxiciteit voor concentraties vanaf 1/500 of lager (1/1000 en 1/2000 in de tweede proevenreeks). De MTT testen daarentegen lijken een verminderde levensvatbaarheid te impliceren voor alle concentraties (vanaf 1/50). Voor hogere concentraties lijken de resultaten dus enigszins van elkaar te verschillen. Het is echter te voorbarig om hieruit sterke conclusies te trekken: in figuur 4.34 worden de concentraties 1/50, 1/100 en 1/500 uit de LDH en MTT proeven expliciet met elkaar vergeleken. Hieruit blijkt dat het verschil tussen beide mogelijk niet echt statistisch relevant is, aangezien de afwijkingen zich binnen een standaarddeviatie bevinden. Aangezien LDH en MTT levensvatbaarheid afschatten op basis van een andere parameter (membraanpermeabiliteit en metabolische activiteit respectievelijk), zijn afwijkingen bovendien niet uitgesloten. De rechtstreekse conversie naar percentage levensvatbaarheid is immers steeds benaderend en afwijkingen tussen verschillende toxiciteitstesten worden regelmatig waargenomen [42]. De waargenomen verschillen tussen beide testen zijn dus zeker niet dermate groot om argwaan te wekken.

Algemeen kan dus besloten worden dat de persistente nanopartikels een beperkte acute cytotoxiciteit uitlokken voor alle onderzochte concentraties (1/5 tot 1/2000 stockoplossing in medium, dus ongeveer 60 $\mu$ M tot 150nM). Zowel de LDH als MTT proeven lijken dit te bevestigen. De sterkste toxiciteit werd, enigszins contra-intuïtief, niet bekomen voor de hoogste concentraties maar voor de lagere concentraties vanaf 1/500 en lager (tot 1/2000). Op basis van een tweede proevenreeks (zowel voor LDH als MTT) werden weinig tot geen verschillen waargenomen tussen concentraties 1/500, 1/1000 en 1/2000. Voor deze concentraties loopt de acute cytotoxiciteit op tot  $\approx$ 20% en de minimale levensvatbaarheid die werd waargenomen bedraagt dus  $\approx$ 80%. De verhoogde toxiciteit voor lagere concentraties kon aannemelijk gemaakt worden door rekening te houden met mogelijke agglomeratie in het medium (zie sectie 4.4.1). Algemeen kan gesteld worden dat deze eerste *in vitro* proeven de potentiële bruikbaarheid van Ca<sub>2</sub>Si<sub>5</sub>N<sub>8</sub>:Eu,Tm nanopartikels ( $\pm$ 100nm) voor *in vivo* toepassingen bevestigen. Verder doorgedreven onderzoek is uiteraard noodzakelijk, maar sterke acute toxiciteit kan in elk geval uitgesloten worden voor concentraties tussen enkele honderden nanomolair en tientallen micromolair.

Tot slot dient opgemerkt dat de toxiciteitsproeven hier rechtstreeks uitgevoerd werden op verdunningen van de stockoplossing. De toxiciteit van de Ca<sub>2</sub>Si<sub>5</sub>N<sub>8</sub>:Eu,Tm NPs werd met andere woorden onderzocht zonder voorafgaand een coating aan te brengen. In de praktijk zullen de partikels echter gecoat worden voor gebruik bij *in vivo* experimenten. Deze coating is nodig om de biodistributie en de circulatietijd in het lichaam te verbeteren [2, 6, 30, 16]. Een coating

wijzig de grootte van de partikels en de reactiviteit van het oppervlak en kan bovendien de agglomeratie sterk beïnvloeden [14, 16]. Het spreekt voor zich dat een oppervlakpassivatie de toxiciteit dus ook drastisch kan beïnvloeden. Het lijkt dan ook aangewezen om in een volgende fase het toxiciteitsonderzoek tevens uit te voeren op gecoate partikels. Dit doet echter geen afbraak aan dit onderzoek aangezien het belangrijk is om eerst de intrinsieke toxiciteit van de ongecoate partikels te onderzoeken.

#### 4.4.4 Confocale microscopie om cellulaire opname te bestuderen

In de vorige paragrafen werd meermaals gesuggereerd dat agglomeratie in het medium de verminderde toxiciteit voor hogere concentraties NPs kan verklaren. Agglomeratie geeft aanleiding tot grote partikels die vermoedelijk niet meer door de cellen worden opgenomen. Idealiter zou de agglomeratie en de eventuele celopname geïncubeerd kunnen worden met behulp van confocale microscopie. Hiertoe wordt bovenop de luminescente NPs een fluorescente celmerker toegevoegd die de cellen (of eventueel de celkernen) zichtbaar maakt.

In deze masterproef werden drie concentraties NPs getest voor confocale microscopie: 1/50, 1/500 en 1/1000 (stockoplossing in medium). De cellen werden gedurende een dag geïncubeerd met deze concentraties en na de incubatie werd Hoechst 33342 (Thermo Scientific) toegevoegd. Deze celmerker is exciteerbaar met UV licht en emitteert voornamelijk in het blauwe gebied (460-490nm). De  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  NPs en de celmerker werden geëxciteerd met een laser bij 408nm en de detectie gebeurde met een Nikon C1 confocale microscoop (Nikon Instruments Inc.). We zijn er echter niet in geslaagd om beelden van de NPs vast te leggen. Vermoedelijk is de opstelling niet gevoelig genoeg om de lage concentraties  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  NPs te detecteren. Ook voor onbehandelde stalen van de stockoplossing (met volume  $5\mu\text{l}$ ) kon immers geen fluorescentie waargenomen worden. Het beperkte volume van de stalen en de lage concentratie aan NPs bevorderen de detectie uiteraard niet. Bovendien wordt enkel een beperkt deel van het uitgezonden licht geïncubeerd in de microscoop. Tot slot is de beperkte absorptie van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  NPs mogelijk ook deels verantwoordelijk voor de moeizame detectie. Luminescente materialen met een beperkte hoeveelheid dopanten (hier 1mol% Eu en Tm), vertonen immers vaak een veel kleinere absorptie dan typische QDs met een sterke *bandgap* absorptie.

Uit deze experimenten kunnen we in elk geval besluiten dat confocale microscopie op kleine hoeveelheden  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  nanopartikels geen evidentie blijkt. Een gevoeligere detector en geoptimaliseerde meetomstandigheden lijken noodzakelijk om dit in de toekomst mogelijk te maken.



## Hoofdstuk 5

# Conclusies

Persistent luminescente materialen kennen vele toepassingen en werden hier onderzocht als interessante kandidaten voor *in vivo* beeldvorming. Om bruikbaar te zijn voor deze toepassing, moeten de fosforen een lange nalichtingstijd combineren met een rode of infrarode emissiegolflengte en een goede chemische stabiliteit. Bovendien moet het luminescente materiaal eenvoudig om te vormen zijn tot nanopartikels die preferentieel geen toxiciteit uitlokken. In deze masterproef werd hiervoor vertrokken van de eerder ontwikkelde persistente fosfor  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$ . Deze fosfor werd geoptimaliseerd en de deeltjesgrootte werd gereduceerd met het oog op *in vivo* toepassingen. Tot slot werd ook de toxiciteit van de nanopartikels onderzocht.

Voor de optimalisatie van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  werden twee pistes onderzocht. Enerzijds werden fluxmaterialen aan het startmengsel toegevoegd om de persistente intensiteit te verbeteren. Anderzijds werd getracht om het emissiespectrum te verschuiven naar langere golflengten om betere transmissie doorheen biologische weefsels te verkrijgen. Op een *trial and error* basis, werd hiervoor dopering van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  met Mn, Bi, Cr of Pb onderzocht. Deze codopering kon echter geen roodverschuiving van het emissiespectrum teweegbrengen en kwam in het algemeen de persistente intensiteit niet ten goede. Verdere inspanningen blijven in de toekomst dus noodzakelijk indien men een verschuiving van het emissiespectrum wil verwezenlijken.

De toevoeging van fluxmaterialen aan het startmengsel bleek daarentegen de persistente lichtemissie wel aanzienlijk te verhogen. Concentraties tot 8wt% KF, KCl en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux werden hiervoor onderzocht. De persistente intensiteit nam in het algemeen toe voor een verhoogde concentratie flux en de beste resultaten werden behaald voor materialen met 8wt% KCl flux en (3 of) 8wt%  $\text{NH}_4\text{Cl}$  flux. De nalichtingstijd was in deze gevallen verviervoudigd ten opzichte van het materiaal zonder flux. Een mogelijke verklaring voor de verbeterde persistentie, kon gevonden worden op basis van SEM-EDX resultaten. Hieruit bleek dat de toevoeging van flux vermoedelijk de verspreiding van Tm dopanten bevordert. Voor de materialen met KF flux werd dit voordeel echter enigszins teniet gedaan door de vorming van fluorrijke aggregaten. In tegenstelling tot de Cl atomen, bleven de F atomen in belangrijke mate aanwezig in het materiaal en de vorming van  $\text{CaF}_2:\text{Eu}$  met blauwe emissie (435nm) werd gesuggereerd. De emissie- of excitatiespectra werden niet of nauwelijks gewijzigd door de toevoeging van fluxen, maar de TL spectra en vervalconstanten werden er wel door beïnvloed. Tot slot werd in de XRD metingen een resterende  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase teruggevonden in alle materialen. Hierbij werd geen wezenlijke verandering opgemerkt tussen de materialen met (3 of 8wt%)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  of KCl flux enerzijds en het materiaal zonder flux anderzijds. Een hoge concentratie KF flux (8wt%) daarentegen gaf wel aanleiding tot een sterker uitgesproken  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase.

$\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  nanopartikels werden zowel door middel van gepulste laser ablatie als door malen in oplossing verkregen. De nanopartikels werden gestockeerd in een 5mM NaOH oplossing

om de stabiliteit te bevorderen. Malen in oplossing bleek een zeer tijdsefficiënte methode om nanopartikels te verkrijgen en werd daarom verkozen boven het tragere ablatieproces. Malen in een planetaire ballenmolen gedurende 10min aan 400rpm leverde een geschikte distributie aan deeltjes op, waaruit een aanzienlijke populatie  $\pm 100\text{nm}$  partikels kon worden gesynthetiseerd ( $\approx 20\%$  efficiëntie). Deze synthese gebeurde door middel van centrifugeren (5min aan 4500rpm) en de colloïdale oplossing werd onderzocht door DLS metingen van de diameter en de zetapotential. De stockoplossing voor het toxiciteitsonderzoek werd verkregen door 10min malen en 5min centrifugeren en de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  NPs werden in een 5mM NaOH oplossing bewaard.

Voor de deeltjes in de stockoplossing werd een gemiddelde diameter van ongeveer 110nm afgeschat op basis van DLS metingen. De goede stabiliteit van de colloïdale oplossing werd gesuggereerd door metingen van de zetapotential en werd ook bevestigd door nieuwe metingen van de diameter na enkele weken stockage. De grootte van de droge partikels werd vervolgens ook door middel van SEM beelden geanalyseerd. Zowel DLS metingen als SEM beelden leverden consistente resultaten. Naast de diameter van de deeltjes en de stabiliteit van de oplossing, werden ook de luminescente eigenschappen en de concentratie van de oplossing bepaald. De concentratie van de stockoplossing werd afgeschat als 0.1mg/ml. Het fluorescente emissiespectrum van de nanodeeltjes bleek ongewijzigd ten opzichte van de bulk. Het persistente emissiespectrum viel voor de NPs samen met het fluorescente spectrum en was dus 10nm verschoven ten opzichte van het bulkspectrum. Het persistente verval vertoonde dezelfde tijdsconstante voor bulk- en nanomateriaal, maar in de eerste minuut na de excitatie werd een snellere afname van de intensiteit waargenomen bij de NPs. Tot slot werden ook SEM-CL-EDX metingen uitgevoerd op droge NPs. Hieruit bleek dat ook de kleine deeltjes licht emitteren met hetzelfde spectrum, maar dat de aanwezigheid van een  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  fase in het poeder kan leiden tot een groot aantal niet-luminescente deeltjes.

Tot slot werd ook de toxiciteit van de  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  NPs in de stockoplossing onderzocht met behulp van LDH en MTT testen op cellen in cultuur. Deze twee standaard testen voor cytotoxiciteit zijn vrij eenvoudig toegankelijk en kunnen een eerste belangrijke indicatie geven van de acute toxiciteit. Zowel uit de LDH als MTT testen werd besloten dat de nanodeeltjes een beperkte acute toxiciteit uitlokken. De grootste toxiciteit ( $\approx 20\%$ ) werd waargenomen voor de laagste concentraties (1/500, 1/1000 en 1/2000 van de stockoplossing in medium). Deze enigszins tegenintuïtieve vaststelling werd aannemelijk gemaakt door rekening te houden met agglomeratie in het medium. De belangrijkste algemene conclusie is echter de beperkte acute toxiciteit die het potentieel van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  nanopartikels voor *in vivo* toepassingen aanzienlijk vergroot.

Doorheen deze masterproef werd de praktische haalbaarheid van  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  NPs voor *in vivo* beeldvorming in kaart gebracht, zowel op materiaalkundig als op toxicologisch vlak. De nanopartikels bleken veelbelovend op beide vlakken. Het materiaal is immers stabiel en bleek eenvoudig om te vormen tot nanopartikels. Daarentegen zijn de oranje emissie en de matige intensiteit mogelijk nog voor verbetering vatbaar. Het lijkt vooral interessant om de baktemperatuur (en/of baktijd) nog te verhogen en hierbij opnieuw de Eu, Tm,  $\text{Ca}_3\text{N}_2$ ,  $\alpha\text{-Si}_3\text{N}_4$  en flux concentratie in het startmengsel te optimaliseren. Op die manier kan de persistente intensiteit mogelijk nog verbeterd worden. Momenteel is  $\text{Ca}_2\text{Si}_5\text{N}_8:\text{Eu,Tm}$  een van de best geschikte materialen voor *in vivo* beeldvorming, maar nieuwe en betere materialen zijn vermoedelijk geen overbodige luxe. Het lijkt immers waarschijnlijk dat intensere rode persistente fosforen noodzakelijk zullen zijn om beeldvorming met persistente materialen te laten doorgroeien tot een efficiënte en praktisch haalbare techniek. Om hierover uitsluitsel te krijgen is het echter de moeite waard om verdere *in vitro* en *in vivo* experimenten uit te voeren.

# Bibliografie

- [1] [http://www.imagewear.be/template\\_products\\_detail.asp?lng\\_iso=NL&pro\\_id=424](http://www.imagewear.be/template_products_detail.asp?lng_iso=NL&pro_id=424), (08/12/2012).
- [2] T. Maldiney, G. Sraiki, B. Viana, D. Gourier, C. Richard, D. Scherman, M. Bessodes, K. Van den Eeckhout, D. Poelman, P. F. Smet, *In vivo optical imaging with rare earth doped  $Ca_2Si_5N_8$  persistent luminescence nanoparticles*, *Optical Materials Express* 2, (2012) 261-268.
- [3] R. Weissleder, M.J. Pittet, *Imaging in the era of molecular oncology*, *Nature* 452, (2008) 580-589.
- [4] D. S. Wang, M. D. Dake, J. M. Park, M. D. Kuo, *Molecular imaging: a primer for interventionalists and imagers*, *Journal of Vascular and Interventional Radiology* 17, (2006) 1405-1423.
- [5] J. V. Frangioni, *In vivo near-infrared fluorescence imaging*, *Current Opinion in Chemical Biology* 7, (2003) 626-634.
- [6] Q. le Masne de Chermont, C. Chanéac, J. Seguin, F. Pellé, S. Maîtrejean, J.-P. Jolivet, D. Gourier, M. Bessodes, D. Scherman, *Nanoprobes with near-infrared persistent luminescence for in vivo imaging*, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, (2007) 9266-9271.
- [7] K. Van den Eeckhout, *Persistente luminescentie in zeldzameaardgedoteerd  $Ca_2Si_5N_8:Eu$* , masterproef, (2008-2009).
- [8] K. Van den Eeckhout, P. F. Smet, D. Poelman, *Persistent luminescence in rare-earth codoped  $Ca_2Si_5N_8:Eu^{2+}$* , *Journal of Luminescence* 129, (2009) 1140-1143.
- [9] G. Blasse, B.C. Grabmaier, *Luminescent materials*, Springer-Verlag, Berlin (1994) chapter 2.
- [10] <http://www.kintechlab.com/solutions/photonics/luminescent-materials-modeling/>, (26/11/2012).
- [11] S. Shionoya, W.M. Yen, *Phosphor handbook*, CRC Press Boca Raton, (1999) 11-47.
- [12] P. F. Smet, K. Van den Eeckhout, A. J.J. Bos, E. van der Kolk, P. Dorenbos, *Temperature and wavelength dependent trap filling in  $M_2Si_5N_8:Eu$  ( $M=Ca, Sr, Ba$ )*, *Journal of Luminescence* 132, (2012) 682-689.
- [13] Y.-Y. Huang, A. C.-H. Chen, M. Hamblin, *Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm*, *SPIE Newsroom*, (2009), <http://spie.org/x35504.xml> (10/12/2012).
- [14] S. J. Soenen, P. Rivera-Gil, J.-M. Montenegro, W. J. Parak, S. C. De Smedt, K. Braeckmans, *Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation*, *Nano Today* 6, (2011) 446-465.

- [15] R. Hardman, *A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors*, Environmental Health Perspectives 114, (2006) 165-172.
- [16] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, O. C. Farokhzad, *Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles*, Molecular Pharmaceutics 5, (2008) 505-515.
- [17] S. Zhang, J. Li, G. Lykotrafitis, G. Bao, S. Suresh, *Size-Dependent Endocytosis of Nanoparticles*, Advanced materials 21, (2009) 419-424.
- [18] Y. Miyamoto, H. Kato, Y. Honna, H. Yamamoto, K. Ohmi, *An Orange-Emitting, Long-Persistent Phosphor,  $Ca_2Si_5N_8:Eu^{2+}, Tm^{3+}$* , Journal of The Electrochemical Society 156, (2009) J235-J241.
- [19] K. Van den Eeckhout, P. F. Smet, D. Poelman, *Luminescent afterglow behavior in the  $M_2Si_5N_8:Eu$  family ( $M=Ca, Sr, Ba$ )*, Materials 4, (2011) 980-990.
- [20] H. Takasaki, S. Tanabe, and T. Hanada, *Long-lasting afterglow characteristics of Eu, Dy codoped  $SrO-Al_2O_3$  phosphor*, J. Ceram. Soc. Jpn. 104, (1996) 322-326.
- [21] K. Toda, Y. Imanari, T. Nonogawa, J. Miyoshi, K. Uematsu, and M. Sato, *Synthesis and characterization of new long persistent phosphor*, J. Ceram. Soc. Jpn. 110, (2002) 283-288.
- [22] K. Van den Eeckhout, P. F. Smet, D. Poelman, *Persistent luminescence in  $Eu^{2+}$ -doped compounds: a review*, Materials 3, (2010) 2536-2566.
- [23] D. D. Jia, W. Y. Jia, D. R. Evans, W. M. Dennis, H. M. Liu, J. Zhu, and W. M. Yen, *Trapping processes in  $CaS:Eu^{2+}, Tm^{3+}$* , J. Appl. Phys. 88, (2000) 3402-3407.
- [24] P. F. Smet, N. Avci, D. Poelman, *Red Persistent Luminescence in  $Ca_2Si_4:Eu, Nd$* , Journal of the Electrochemical Society 156, (2009) H243-H248.
- [25] X. J. Wang, D. D. Jia, and W. M. Yen,  *$Mn^{2+}$  activated green, yellow, and red long persistent phosphors*, J. Lumin. 102, (2003) 34-37.
- [26] F. Liu, W. Yan, Y.-J. Chuang, Z. Zhen, J. Xie, Z. Pan, *Photostimulated near-infrared persistent luminescence as a new optical read-out from  $Cr^{3+}$ -doped  $LiGa_5O_8$* , Scientific reports 3, (2013) article number 1554.
- [27] A. Bessière, S. Jacquart, K. Priolkar, A. Lecointre, B. Viana, D. Gourier,  *$ZnGa_2O_4:Cr^{3+}$ : a new red long-lasting phosphor with high brightness*, Optics Express 19, (2011) 10131-10137.
- [28] Z. Li, H. Zhang, H. Fu, *Red long-lasting phosphorescence based on color conversion process*, Optical Materials 35, (2013) 451-455.
- [29] H. N. Luitel, T. Watari, T. Torikai, M. Yada, *Luminescent properties of  $Cr^{3+}$  doped  $Sr_4Al_{14}O_{25}:Eu/Dy$  blue-green and red phosphor*, Optical Materials 31, (2009) 1200-1204.
- [30] T. Maldiney, C. Richard, J. Seguin, N. Wattier, M. Bessodes, D. Scherman, *Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice*, ACS Nano 5, (2011) 854-862.
- [31] T. Maldiney, A. Lecointre, B. Viana, A. Bessière, D. Gourier, M. Bessodes, C. Richard, D. Scherman, *Trap depth optimization to improve optical properties of diopside-based nanophosphors for medical imaging*, Proceedings of SPIE 8263, Oxide-based Materials and Devices III, San Francisco (2012) article id. 826318.
- [32] T. Schlieper, W. Schnick, *Nitrido-Silicate. I. Hochtemperatur-Synthese und Kristallstruktur von  $Ca_2Si_5N_8$* , Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie 621, (1995) 1037-1041.

- [33] W. F. Hornyak, R. Chen, *Thermoluminescence and phosphorescence with a continuous distribution of activation energies*, Journal of Luminescence 44, (1989) 73-81.
- [34] M. N. Berberan-Santos, E. N. Bodunov, B. Valeur, *Mathematical functions for the analysis of luminescence decays with underlying distributions: 2. Becquerel (compressed hyperbola) and related decay functions*, Chemical Physics 317, (2005) 57-62.
- [35] D. Jia, W. M. Yen, *Trapping mechanism associated with electron delocalization and tunneling of  $\text{CaAl}_2\text{O}_4:\text{Ce}^{3+}$ , a persistent phosphor*, Journal of The Electrochemical Society 150, (2003) H61-H65.
- [36] W.M. Yen, M.J. Weber, *Inorganic phosphors*, CRC Press LLC, (2004) Part 1 section 4.
- [37] C.J. Duan, W.M. Otten, A.C.A. Delsing, H.T. Hintzen, *Preparation and photoluminescence properties of  $\text{Mn}^{2+}$ -activated  $\text{M}_2\text{Si}_5\text{N}_8$  ( $\text{M}=\text{Ca}, \text{Sr}, \text{Ba}$ ) phosphors*, Journal of Solid State Chemistry 181, (2008) 751-757.
- [38] T. Maldiney, G. Byk, N. Wattier, J. Seguin, R. Khandadash, M. Bessodes, C. Richard, D. Scherman, *Synthesis and functionalization of persistent luminescence nanoparticles with small molecules and evaluation of their targeting ability*, International Journal of Pharmaceutics 423, (2012) 102-107.
- [39] A. Albanese, W.C. Chan, *Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity*, ACS Nano 5, (2011) 5478-5489.
- [40] A. Lesniak, A. Campbell, M.P. Monopoli, I. Lynch, A. Salvati, K.A. Dawson, *Serum heat inactivation affects protein corona composition and nanoparticle uptake*, Biomaterials 31, (2010) 9511-9518.
- [41] D. Drescher, G. Orts-Gil, G. Laube, K. Natte, R. W. Veh, W. Osterle, J. Kneipp, *Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects*, Analytical and bioanalytical chemistry 400, (2011) 1367-1373.
- [42] J. Weyermann, D. Lochmanna, A. Zimmerb, *A practical note on the use of cytotoxicity assays*, International Journal of Pharmaceutics 288, (2005) 369-376.