

**Biologische Kristallisation von
Calciumphosphaten**

-

Untersuchung und Simulation

Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Fabian Peters
aus Mannheim

Hamburg 2001

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 1998 bis April 2001 am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie der Universität Hamburg.

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Epple
 2. Gutachter: Prof. Dr. R. D. Fischer
- Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2001

Viele versuchen zu leben
ohne zu altern.
Aber sie altern
ohne zu leben.

Alexander von Mitscherlich

Diese Arbeit sei gewidmet:

*meiner Mutter
die das alles leider nicht mehr erleben durfte.*

*außerdem:
Alexa und Andreas Gretschel
sowie Markus Wingender,
die mich in früher Jugend
auf dem eher explosiven Wege
zur Chemie gebracht haben.*

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Kristallisation	4
2.1 Keimbildung (Nukleation)	4
2.2 Übersättigung	5
2.3 Homogene Keimbildung	6
2.4 Heterogene Keimbildung	6
2.5 Primärkeimbildung	7
2.6 Sekundärkeimbildung	8
2.7 Kristallwachstum	9
2.8 Inhibition	11
2.8.1 Mechanismen der Inhibition	12
2.8.1.1 Einfluß auf die Keimbildung	12
2.8.1.2 Einfluß auf das Kristallwachstum	14
3. Das Calciumphosphat-System	17
3.1 Calcium	17
3.1.1 Bedeutung von Calcium in biologischen Systemen	18
3.2 Das Orthophosphat-System	19
3.3 Die Calciumphosphate	21
3.3.1 Brushit (DCPD) und Monetit (DCPA)	22
3.3.2 Hydroxylapatit und Fluorapatit	25
3.3.3 Amorphe Calciumphosphate und Defektapatite	31
3.3.4 Carbonatapatite	35
4. Biomineralisation	39
4.1 Biominerale	39
4.2 Stufen der Biomineralisation	41
4.3 Aufbau von Knochen	44
4.4 Zusammensetzung des Knochenminerals	47
4.5 Zelluläre Vorgänge beim Knochenwachstum	49
5. Verwendete spezielle Untersuchungsmethoden	51
5.1 Infrarot-Spektroskopie	51
5.2 Röntgenpulverdiffraktometrie	51

5.3	Thermogravimetrie mit Quadrupol-Massenspektroskopie und Differenz-Thermoanalyse (TG-DTA-MS)	52
5.4	Rasterelektronenmikroskopie mit energiedispersiver Röntgen-Spektroskopie (REM-EDX)	53
5.5	pH-Wert-Messungen	53
5.6	Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)	53
5.7	Photometrie	54
5.8	Messung mechanischer Eigenschaften	54
5.9	Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)	54
5.9.1	Grundlagen	54
5.9.2	Durchführung der Messungen	56
6.	Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien	57
6.1	Anforderungen an Knochenersatzmaterialien	57
6.2	Gängige Knochenersatzmaterialien	59
6.3	Untersuchung von Knochenersatzmaterialien	63
6.3.1	Infrarot-Spektroskopie	64
6.3.2	Hochauflösende Röntgenbeugung am HASYLAB	67
6.3.3	Röntgenabsorptionsspektroskopische Ergebnisse	70
6.3.4	Ergebnisse der Thermoanalyse	72
6.3.5	Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse	75
6.3.6	pH-Verläufe im Wasser	77
6.3.7	Zusammenfassung	78
7.	Pathologische Biomineralisationsvorgänge - Untersuchung der Chondrocalcinose	80
7.1	Pathologische Kristallisation	80
7.2	Chondrocalcinose der Kniegelenksmenisken	82
7.2.1	Untersuchung der Kristallablagerungen in chondrocalcinotischen Menisken	85
7.2.1.1	Untersuchungen an frischem Meniskusgewebe	85
7.2.1.2	Untersuchungen an getrockneten und geglühten Menisken	90
7.2.1.3	Zusammenfassung	95

8. Simulation der Biomineralisation	97
8.1 Fällung aus übersättigtem Medium	97
8.2 Kontrollierte Fällung mit der <i>Constant Composition</i> -Methode	98
8.3 Diffusionsmethoden	101
9. Die Konzeption der CCDD-Anlage	105
9.1 Die Calcium-Elektrode	107
9.1.1 Anschluß der Calcium-Elektrode an den Computer	109
9.1.2 Kalibration	110
9.1.3 Probleme	111
9.1.3.1 Spannungseffekte durch andere Elektroden	111
9.1.3.2 Rauschen	112
9.1.3.3 Drift	113
9.2 Die pH-Meter	115
9.3 Die Peristalticpumpen	116
9.4 Fehlerbetrachtung	118
9.5 Durchführung der <i>CCDD</i> -Versuche	119
9.6 Effizienz der <i>CCDD</i> -Versuche	120
9.7 Ergebnisse der <i>CCDD</i> -Versuche	124
9.7.1 Ergebnisse des Standardversuchs unter physiologischen Bedingungen	125
9.7.2 Einfluß des pH-Wert auf die <i>CCDD</i> -Fluorapatit-Aggregate	131
9.7.3 Zusammenfassung	135
9.7.4 Einfluß der Konzentration auf die <i>CCDD</i> -Fluorapatit-Aggregate	137
9.7.5 Einfluß der Fluorid-Konzentration auf die <i>CCDD</i> -Fluorapatit-Aggregate	142
9.7.6 Zusammenfassung	146
9.8 Simulation pathologischer Mineralisationsvorgänge mit der <i>CCDD</i> -Anlage	148
9.8.1 Einfluß von Cholesterin auf die <i>CCDD</i> -HAP-Kristallisation	148
9.8.2 Einfluß von Magnesium auf die HAP-Kristallisation	149
9.8.3 Zusammenfassung	150

10. Herstellung und Optimierung eines Knochenersatzmaterials	152
10.1 Die Konzeption des Kompositmaterials	152
10.1.1 Abbaubare Polymere	153
10.2 Kompositmaterialien aus Polyglycolid und Calciumphosphat	154
10.2.1 Einstellung des pH-Wertes des Komposits	155
10.2.2 Carbonathaltige amorphe Calciumphosphate	158
10.2.3 Stabilität des Komposits	167
10.2.4 Zellkulturtestung auf Biokompatibilität	169
10.2.5 Konversion des amorphen carbonathaltigen Calciumphosphats	170
11. Konversion von Brushit in verschiedenen Medien	176
11.1 Konversion in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung	177
11.2 Konversion in Zellnährmedium	186
12. Zusammenfassung und Ausblick	195
13. Summary	204
14. Literatur	211
15. Präparativer Teil	229
15.1 Darstellung von Brushit	229
15.2 Darstellung von Monetit	229
15.3 Darstellung von Octacalciumphosphat	230
15.4 Darstellung von Carbonat-ACP	230
15.5 Herstellung einer übersättigten Calciumphosphat-Lösung	231
15.6 Durchführung eines CC-Versuchs	231
15.7 Phosphat-Bestimmung mittels Photometrie	232
16. Beschreibung und Unterprogramme von VISIDAQ	233
16.1 Das Programm „KALIBRA“	233
16.1.1 Arbeitsanweisung	234
16.1.2 Die Programmierung	235
16.1.2.1 Inhalte der Benutzerprogrammblöcke	236
16.2 Das Programm „pH-MESS“	239
16.2.1 Arbeitsanweisung	239
16.2.2 Die Programmierung	240

16.3	Das Programm „CC-HALB“	242
16.3.1	Arbeitsanweisung	242
16.3.2	Die Programmierung	243
16.4	Das Programm „CC“	248
16.4.1	Arbeitsanweisung	250
16.4.2	Die Programmierung	251
16.4.2.1	Die Ca-stat-Einheit	251
16.4.2.2	Die Füllstandsberechnung und Speicherung	254
16.4.2.3	Die Speicherung der Daten	256
17.	Anhang	258
17.1	Sicherheit und Entsorgung	258
17.1.1	R-Sätze	259
17.1.2	S-Sätze	259
17.1.3	Entsorgungshinweise	260
17.2	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	260
17.3	Kurzzusammenfassung	261
17.4	Veröffentlichungen	262
17.5	Dank	266

1. Einleitung

Kristallisationen von Festkörpern lassen sich in drei Gruppen unterteilen. Die erste, die geologische, fand und findet über lange Zeiträume unter oder über der Erde in Schmelzen, in Festkörperreaktionen und/oder unter hohen Drücken statt. Das Resultat dieser Langzeitkristallisationen sind sehr große Kristalle, die sehr hochgeordnet sind. Gleichzeitig enthalten diese geologisch entstandenen Kristalle eine große Anzahl Heteroionen. Die zweite Gruppe, die chemische Kristallisation, wird im Labor unter normalen Bedingungen praktiziert. Bei einer solchen Kristallisation durch Fällung (Präzipitation) aus übersättigter Lösung erhält man für gewöhnlich ein pulverförmiges Produkt, bestehend aus sehr kleinen, ungeordneten Kristalliten. Durch die sehr schnelle Bildung von Kristalliten entstehen eine große Anzahl von Kristalldefekten. Durch das saubere Arbeiten mit reinsten Ausgangsprodukten wird die Inklusion von Heteroionen in das Kristallgitter verhindert.

Die dritte Art der Kristallisation ist die biologische Kristallisation, auch *Biomineralisation* genannt. Hier werden durch langsame Kristallisationsvorgänge kleine Kristalle erzeugt, die jedoch in sich hochgeordnet sind. Die Kristalle beinhalten Heteroionen und sind strukturell defekt.

Biomineralisation verweist auf den Vorgang, über den Organismen Mineralien formen und für ihre eigenen Zwecke funktionalisieren [Lowenstam & Weiner 89]. Die vergleichsweise harten Biomineralien übernehmen zumeist eine Stütz- oder Schutzfunktion, welche das weiche organische Gewebe vor Deformation durch Druck- Zug- oder Scherkräfte bewahrt [Volkmer 99]. Das Forschungsgebiet ist daher ein multidisziplinäres Feld, das sowohl die anorganische als auch die organische Chemie sowie weite Bereiche der Biologie umfaßt.

Sehr viel weiter lassen sich all die Disziplinen umfassen, die direkt aus der Erforschung der Biomineralisation wertvolle Kenntnisse gewinnen. Organismen aus allen Klassen der Lebewesen stellen ca. 60 verschiedene Mineralien her und es ist offensichtlich, daß die gesamte Bedeutung dieser Prozesse noch lange nicht erfaßt ist [Lowenstam & Weiner 89]. Manche biogene Mineralien wurden und werden in einer Menge hergestellt, daß sie ein wichtiger Bestandteil der marinen Sedimente sind und somit einen großen Einfluß auf die Meereschemie und -geologie haben. Eine der

hauptsächlichen Funktionen biogener Mineralien ist die Skelettbildung, und oft haben die so gebildeten Materialien erstaunliche mechanische Eigenschaften bei geringstem Materialbedarf, so daß Materialwissenschaftler und Ingenieure daran interessiert sind, diese komplexen Strukturen zu simulieren. Die Aufklärung der Mechanismen des Knochenwachstums soll helfen, Implantatmaterialien und –techniken zu entwickeln, die operative Eingriffe erleichtern oder verhindern können.

Von großem Interesse ist also, wie organische Makromoleküle mit anorganischen Materialien so kombiniert werden können, daß einzigartige und exquisite Biomaterialien gewonnen werden können, in denen die Struktur, Größe, Form, Orientierung, Textur und Zusammenlagerung der Komponenten präzise kontrollierbar sind [Mann 95]. Die Mineralisations- und Demineralisationsvorgänge in Organismen können aber auch pathologischer Natur sein, so daß in der medizinischen Forschung großer Bedarf an der Aufklärung von Karies, pathologischen Calcifikationsvorgängen (wie z.B. Arteriosklerose) und der Bildung von Nierensteinen besteht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Biomineralisationsvorgänge anhand des Calciumphosphatsystems, das die anorganische Komponente der Skelette der meisten Wirbeltiere und der Zähne vieler Fischarten und Säugetiere darstellt, mittels verschiedener Techniken untersucht und simuliert.

Mittels Synchrotronstrahlungsmethoden (hochauflösende Röntgenbeugung und Röntgenabsorptionsspektroskopie) wurden biologisch entstandene Calciumphosphate aus humanen Knochen in einer vergleichenden Studie untersucht. Pathologische Kristallisationsvorgänge wurden in Form der Chondrocalcinose des Kniegelenksmeniskus, in den durch zelluläre Fehlfunktionen Calciumphyosphatdihydrat-(CPPD-)Kristalle eingelagert waren, untersucht. Die Aufklärung über Art und Beschaffenheit dieser Kristallite gab Aufschluß über die Morphologie, Kristallinität und Orientierung im Bindegewebe. Strukturelle Untersuchungen an verschiedenen Knochenersatzmaterialien zeigten, daß die heute eingesetzten Implantatprodukte im Vergleich mit Knochen viel zu kristallin und hochgeordnet sind. Die thermodynamische Stabilität eines hochkristallinen Calciumphosphats erschwert die Resorbierbarkeit in biologischer Umgebung und verhindert den Umbau in körpereigenes Gewebe.

Aus diesen Kenntnissen heraus wurden verschiedene Calciumphosphate hergestellt, um in einem Komposit mit porösem Polyglycolid als Knochenersatzwerkstoff eingesetzt werden zu können. Die biologische Abbaubarkeit des Polyesters Polyglycolid

soll dabei das Einwachsen von körpereigenem Gewebe in den Knochendefekt unterstützen. Der Einsatz eines sehr niedrigkristallinen und somit im Vergleich mit den Knochen thermodynamisch wesentlich instabileren Calciumphosphats soll die Resorbierbarkeit und die Bildung von neuem Knochengewebe im Sinne eines Calcium-Depots unterstützen.

Langsame Kristallisationsphänomene, wie sie in der Biomineralisation vorkommen, sind durch Inhibition und durch Diffusion geprägt. Die Simulation solcher Phänomene bildet den dritten Teil dieser Arbeit. Inhibition führt zur Verlangsamung der Kristallitbildung, da durch verschiedene Mechanismen, beispielsweise der Adsorption eines Inhibitors (z.B. Magnesium, Komplexbildner, große organische Moleküle) auf die Kristallflächen spezifische Wachstumsrichtungen ganz oder teilweise unterbunden werden. Dadurch können andere Morphologien gewonnen werden. Die Konversion von einem sauren Calciumphosphat, dem Brushit ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) in ein thermodynamisch stabileres Endprodukt unter dem Einfluß von Inhibitoren in einem Zellnährmedium beschäftigt sich mit der Untersuchung dieses Phänomens. Die Diffusion von Biomineralien in eine Matrix wurde schon verschiedentlich untersucht [Hasse & Epple 98], [Schwarz & Epple 98], [Busch 98]. Das Kernstück einer solchen Diffusionsapparatur bildet dabei eine Doppelrohrkonstruktion in der sich, getrennt durch die Matrix (Polyglycolid, Gelatine), die einzelnen, wasserlöslichen Bestandteile eines Biominerals (z.B. CaCl_2 auf einer Seite und Na_2HPO_4 auf der anderen Seite) befinden. Durch langsame Diffusion in die Matrix wird eine langsame und damit regelmäßige Kristallisation erreicht. Während des Diffusions- und Kristallisationsvorganges verändern sich jedoch der pH-Wert und die Ionenkonzentrationen in den Lösungen. Dadurch wird die Kristallbildung beeinflusst, und es bilden sich unter Umständen andere Produkte.

Um diesem entgegenzuwirken wurde eine Anlage erdacht, die sowohl den pH-Wert als auch die Ionenkonzentrationen konstant hält. Ähnlich einem biologischen System, sei es ein menschlicher Organismus oder nur eine einzelne Zelle, in dem durch diverse Transportprozesse die Ionenkonzentrationen und auch der pH-Wert immer konstant bleiben, ist es damit möglich geworden, Biomineralisationsvorgänge exakt zu simulieren. In dieser ersten Studie mit der Anlage wurde versucht aufzuklären, inwieweit die Matrix die Morphologie von Fluorapatit-Aggregaten ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) beeinflusst und welchen Einfluß die Änderung anderer Parameter (pH, Konzentration) auf die Kristallbildung hat.

Ein wichtiges Kriterium für diese Unterscheidung ist die Anwesenheit oder Abwesenheit einer festen Phase. Während *Primärkeimbildung* in der Abwesenheit von festen Partikeln der kristallisierten Substanz eintritt, ist die *Sekundärkeimbildung* von der Präsenz von Kristallen abhängig.

Die *homogene* Keimbildung erfordert keine Festphase, während die *heterogene* Keimbildung durch eine Fremdkörperoberfläche katalytisch induziert wird.

2.2 Übersättigung

Die Triebkraft bei der Primärkeimbildung und dem Kristallwachstum ist die Differenz der chemischen Potentiale zwischen Phase 1 und Phase 2 ($\Delta\mu$). Dabei wird für die flüssige Phase das Produkt der Ionenaktivitäten (IP) eingesetzt, für die Aktivität der festen Phase wird die Aktivität genommen, die die Lösungslösungen im Gleichgewicht bei unendlich ausgedehnter Kristalloberfläche bei gegebenen Bedingungen (p, T) hätten (IP_∞). Damit ist:

$$\Delta\mu = kT \ln \frac{IP}{IP_\infty} \quad (\text{Gl. 2.1})$$

Unter der Annahme, daß die Aktivitätskoeffizienten bei nicht zu großen Übersättigungen konstant bleiben, ergibt sich näherungsweise:

$$\begin{aligned} \Delta\mu &= kT \ln \left(\frac{\prod_B c_B^{v_B}}{\prod_B c_{B,\infty}^{v_B}} \right) \\ &= \nu kT \ln S \end{aligned} \quad (\text{Gl. 2.2})$$

$$\nu = \sum_B \nu_B \quad (\text{Gl. 2.3})$$

Mit S , dem Sättigungsverhältnis und ν , der Summe der stöchiometrischen Koeffizienten [Mayer 97]. Die Übersättigung kann absolut (Δc) oder relativ (σ) ausgedrückt werden:

$$\Delta c = c - c_{\infty} \quad (\text{Gl. 2.4})$$

$$\sigma = \frac{\Delta c}{c_{\infty}} = S - 1 \quad (\text{Gl. 2.5})$$

Thermodynamisch läßt sich die Übersättigung folgendermaßen ausdrücken:

$$\sigma = \frac{IP^{\frac{1}{v}} - K_L^{\frac{1}{v}}}{K_L^{\frac{1}{v}}} \quad (\text{Gl. 2.6})$$

Die Triebkraft für die Kristallisation wird als Änderung der freien Enthalpie von der übersättigten zur gesättigten Lösung ausgedrückt [Salimi et al. 84]:

$$\Delta G_{cryst} = -RT \ln \left(\frac{IP}{K_L} \right)^{\frac{1}{v}} \quad (\text{Gl. 2.7})$$

2.3 Homogene Keimbildung

Die Rate der Keimbildung steigt in dem Maße, wie die innere Oberflächenspannung sinkt. Dadurch, daß beispielsweise Tenside die Oberflächenspannung stark senken, wird bei Tensidzusatz die Keimbildungsrate erheblich erhöht. Auf der glatten Fläche kann die Keimgröße durch die Benetzung stark vermindert sein. Daher wird in die Berechnung der freien Energie noch ein vom Kontaktwinkel θ abhängiger Faktor $\Phi(\theta)$, der zwischen 0 und 1 liegt, eingeführt.

2.4 Heterogene Keimbildung

Die Heterogenkeimbildung kann als Sekundärkeimbildung mit einem Diffusionsmechanismus behandelt werden. Auf der Festkörperoberfläche befinden sich mehr oder weniger orientierte Cluster, die durch Abtrennung durch die Flüssigkeit (Scherkräfte)

wieder zurück in die Lösung getrieben werden können. Wenn diese Cluster die kritische Keimgröße erreicht haben, so können sie überleben und neue Keime bilden. Da die Oberflächenspannung von Kristallen auf verschiedenen kristallographischen Flächen unterschiedlich ist, hängt Φ noch von der Lage der Flächen des Keims zur Unterlage ab. Die Heterogenkeimbildungsarbeit läßt sich dann folgendermaßen ausdrücken:

$$\Delta G_{het}^* = \Phi(\theta)\Delta G_{hom}^* \quad (\text{Gl. 2.8})$$

Wenn der Benetzungswinkel 0° beträgt, dann wird auch $\Phi=0$ und die Keimbildungsarbeit verschwindet. Die Unterlage gleicht dann einer arteigenen. Ist $\theta=180^\circ$, so wird $\Phi=1$. Es liegt keine Benetzung vor und die Heterogenkeimbildungsarbeit ist gleich der Homogenkeimbildungsarbeit.

Die heterogene Keimoberfläche und der wachsende Kristall haben also unterschiedliche Gitter, die mehr oder minder aufeinander passen. Das orientierte Wachsen eines Kristalls auf einer heterogenen Oberfläche, wobei das Wachstum des Keimes einer spezifischen Orientierung folgt, nennt man Epitaxie [Koutsoukos & Nancollas 81].

2.5 Primärkeimbildung

Um einen Keim aus einer klaren Lösung zu erhalten, muß die Keimbildungsarbeit ΔG^* aufgebracht werden. Diese setzt sich zusammen aus der Oberflächenarbeit ΔG_o , die vom neu zu bildenden Teilchen aufgenommen wird, und der Freien Kristallisationsenthalpie ΔG_{crist} :

$$\Delta G = \Delta G_o - \Delta G_{crist} \quad (\text{Gl. 2.9})$$

Diese freie Enthalpie ist abhängig von der neu entstandenen Oberfläche, der Oberflächenspannung, der Zahl der Bausteine im Aggregat und von der Differenz der chemischen Potentiale.

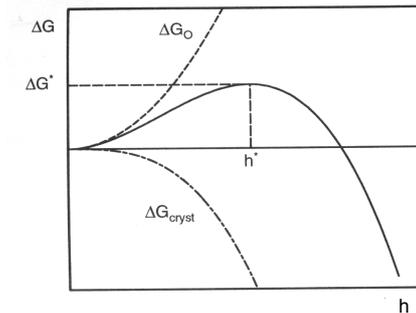


Abb. 2.1: Keimbildungsarbeit in Abhängigkeit von der Zentraldistanz. Bei $h=h^*$ ist die Wahrscheinlichkeit der Wiederauflösung und des Weiterwachsens gleich groß [Mayer 97].

Die Energie ΔG^* ist die Energie im Maximum bei der Zentraldistanz h^* , bei der die Wahrscheinlichkeit des Aggregates, sich aufzulösen oder weiterzuwachsen gleich groß ist (Abb. 2.1).

Auf artfremden Unterlagen (Fremdpartikel, Gefäßwand) ist die Keimbildungsarbeit herabgesetzt.

2.6 Sekundärkeimbildung

Die Sekundärkeimbildung wird durch Kristallmaterial, welches in der Lösung bereits vorhanden ist, hervorgerufen. Die Sekundärkeimbildung leistet den größten Beitrag zur Kristallisation. Dabei werden diverse Effekte unterschieden. Bei der Staubimpfung wird die Keimbildung durch anhaftende kleine Kristalle (Staub) hervorgerufen, beim Zerschlagen und Dendritenabbruch werden Keime durch Bruchstückbildung erzeugt. Der Begriff der Kollisionskeimbildung wird für Sekundärkeimbildung, die aus Stößen ohne erkennbaren Abrieb zwischen zwei Kristallen erfolgt, verwendet. Die Keimbildung durch Scherkräfte als Effekt lösungsnaher Bereiche in der Diffusionsgrenzschicht, deren Ordnung höher ist als die in der Lösung (Clusterbildung), wurde schon als Effekt der heterogenen Keimbildung (siehe Kapitel 2.3) behandelt.

Die Sekundärkeimbildungsrate B hängt von vielen Parametern ab, wie z.B. von der Übersättigung σ , dem spezifischen Energieeintrag in die Lösung ε , der Suspensionsdichte ρ_{sus} sowie der Korngröße L und ihrer Verteilung $N(L)$ [Mayer 97]:

$$B = B(\sigma, \varepsilon, \rho_{sus}, L, \dots) \quad (\text{Gl. 2.10})$$

$$= \text{const.} \cdot \sigma^{u_1} \cdot \varepsilon^{u_2} \cdot \rho_{\text{SUS}}^{u_3} \cdot L^z \quad (\text{Gl. 2.11})$$

Will man den Einfluß eines Parameters untersuchen, so müssen alle anderen Parameter konstant gehalten werden. Dies ist im Fall von diskontinuierlichen Kristallisationsuntersuchungen eine fast nicht lösbare Aufgabe.

2.7 Kristallwachstum

Ein Kristall wächst im allgemeinen, indem sich Netzebenen einiger ausgezeichnete Richtungen mit besonders dichter Atomlage aufeinanderstapeln. Die Netzebene wächst im einfachsten Fall entlang einer Kette von Atomen.

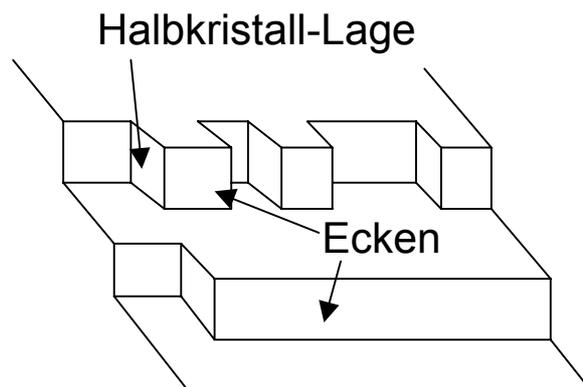


Abb. 2.2: Die Kristalloberfläche (schematisiert).

In jedem Moment ist die typische Wachstumsstelle des Kristalls, die *Halbkristall-Lage*, die Stelle, wo sich mit größter Wahrscheinlichkeit das nächste Atom anlagern wird, das vorläufige Ende einer unvollständigen Netzebene. Sie bietet den energetisch günstigeren Ansatzpunkt, d.h. den mit den meisten Bindungen zu Nachbaratomen (Abb. 2.2).

Das Kristallwachstum läßt sich allgemein in 8 Stufen unterteilen:

1. Transport von Ionen zur Oberfläche durch Konvektion
2. Transport von Ionen zur Oberfläche durch Diffusion
3. Adsorption auf der flüssig/fest-Oberfläche
4. Diffusion im Inneren der hydratisierten Adsorptionsfläche

5. Adsorption an einer Stufe der Kristalloberfläche
6. Bewegung entlang der Stufe
7. Partielle oder totale Dehydratation der Ionen
8. Integration an der Stufe

Es ist inzwischen allgemein anerkannt, daß die ersten drei Schritte ausreichend schnell verlaufen, so daß die Kristallisation der meisten schwerlöslichen Salze durch Reaktionen an der Kristalloberfläche kontrolliert wird. Diese Reaktionen können Oberflächennukleation, Spiralwachstum oder eine Kombination aus beiden sein [Nancollas & Zawacki 84].

Ein angelagertes Atom schwingt mit der Frequenz ν und hat die Wahrscheinlichkeit $e^{-W/kT}$, die Abtrennenergie W auf sich zu vereinigen. Daraus sollte folgen, daß nur die jeweils angefangene Atomkette fertiggestellt werden kann, denn das erste Atom einer Reihe betätigt nur zwei statt drei Bindungen und hat daher eine um $e^{W/3kT}$ höhere Chance, wieder abgetrennt zu werden. Dieses Hindernis der Kettenkeimbildung kann durch Oberflächendiffusion umgangen werden (Punkt 6 der Unterteilung). Diese Diffusionsvorgänge zu Nachbarbindungen sind wahrscheinlicher als die vollständige Ablösung. Wenn ein solches Atom oder Atompaar dabei an eine Halbkante gelangt, so ist die Keimbildung geglückt, falls sich dort schnell genug andere Atome anlagern, um die neue Atomkette zu konsolidieren [Gerthsen et al. 92]. Die Schaffung neuer Netzebenenkeime ist wesentlich schwieriger. Manchmal wird diese Schwierigkeit durch Spiralwachstum umgangen. An der Halbkante einer Schraubenversetzung können sich unbeschränkt Teilchen in energetisch günstiger Weise anlagern, wobei diese Halbkante um die Versetzungslinie rotiert. Fortgesetztes Spiralwachstum um eine einzelne Schraubenversetzung oder andere Versetzungen ist möglicherweise verantwortlich für das haarähnliche Wachstum der *Whisker*.

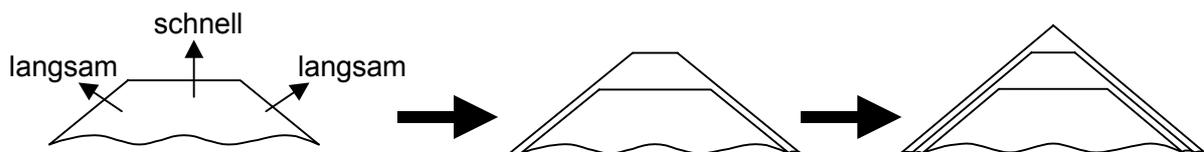


Abb. 2.3: Die Kristallflächen, die am langsamsten wachsen, überleben und bestimmen letztlich die Form des Kristalls

Unter Bedingungen eines ausreichend langsamen Wachstums wird die Form des Kristalls durch die Thermodynamik bestimmt: Der Kristall tendiert zur Wachstumsform eines Polyeders mit einer *minimalen Oberflächenenergie*. Die Kristallform wird normalerweise durch die Wachstumsgeschwindigkeit individueller Kristallflächen bestimmt. Nach dem *Prinzip der überschneidenden Flächen* überleben letztlich die am langsamsten wachsenden Kristallflächen (Abb. 2.3).

2.8 Inhibition

Ein Inhibitor kann als eine Substanz definiert werden, die in einem kristallisierenden System selbst nicht als ein eigener Festkörper ausfällt, aber die Kristallisation des Festkörpers beeinflusst. Solche Additive, die die Kristallisation beeinflussen, können in drei Gruppen unterteilt werden [Nývlt & Ulrich 95]:

- a) *Freie Säuren und Basen*, die den pH-Wert der Lösung einstellen. Der pH-Wert modifiziert die Natur und die Konzentration der Ionen in Lösung, hauptsächlich, wenn die Lösung Salze von schwachen Säuren oder Basen beinhaltet. Dabei haben die pH-Werte großen Einfluß auf Form, Größe und Beschaffenheit der Produktkristalle und beeinflussen außerdem die Wachstumsgeschwindigkeit. Säuren und Basen, die am häufigsten benutzt werden, haben mit der kristallisierenden Substanz ein gemeinsames Ion. So kann beispielsweise nadelförmiger Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) durch Fällung aus Calciumacetat und Kaliumhydrogenphosphat unter Zugabe von Essigsäure (pH 4,3-5,0) erhalten werden [Suzuki et al. 98].
- b) *Anorganische Additive* lassen sich in stark und schwach aktive Substanzen klassifizieren. Hochaktive Additive sind polyvalente Kationen, wie z.B. Fe^{3+} , Cr^{3+} , Al^{3+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} sowie gewisse Anionen, wie z.B. WO_4^{2-} , MoO_4^{2-} , PO_4^{3-} . Sehr geringe Konzentrationen dieser Anionen genügen, um einen dramatischen Effekt auf die Kristallisation auszuüben [Zawacki et al. 86]. Anorganische Additive, welche die Wachstumsrate beeinflussen, haben oft ähnlichen Einfluß auf die Löslichkeit der Kristalle. Magnesium ist bekannt als Inhibitor, der die Transformation von amorphem Calciumphosphat (ACP) zu Hydroxylapatit verzögert. Auch kann die Zuga-

be von Magnesium bei der Calciumphosphat-Kristallisation nicht zum thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit führen, sondern zur Bildung von Mg-haltigen β -Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, TCMP) [Salimi et al. 85].

- c) *Organische Additive* sind die meistbenutzten Kristallisationshilfsstoffe. Sie zeigen eine hohe Effektivität und sind oberflächenaktiv. Es konnte beobachtet werden, daß ein Molekül eines solchen Additivs auf 10^4 bis 10^6 Moleküle der kristallisierenden Substanz die Wachstumsrate senkt. Der Effekt großer organischer Moleküle muß nicht spezifisch wirken. Viele verschiedene organische Hemmstoffe können das Wachstum diverser Makrokristalle beeinflussen und letztlich können ganz ähnliche Morphologien beobachtet werden. Diese Effekte können am besten mit einem Adsorptionsmechanismus auf der Kristalloberfläche beschrieben werden, so daß die Wachstumsgeschwindigkeit verschiedener Kristallflächen wie in Abb. 2.3 beeinflußt werden kann. Der Einfluß dieser organischen Substanzen auf die Wachstumsrate ist gewöhnlich sehr hoch, der Einfluß auf die Löslichkeit dagegen vernachlässigbar.

2.8.1 Mechanismen der Inhibition

Kristallisationsinhibitoren unterdrücken die Kristallisation ganz oder teilweise durch Interaktion der Additive mit den Kristalloberflächen und Kristallkeimen. Die resultierende Reduktion der Aktivität des freien Kations oder Komplexbildung führt zu einem Senken der Übersättigung und daraus folgend der Inhibition der Kristallisation. Zugabe von chelatisierenden Agentien, wie z.B. EDTA in großen Mengen, ist die ökonomischste Art und Weise, die Kristallisation zu hemmen. Jedoch muß für die Quantifizierung der Inhibition zwischen der Formation von Ionenpaaren, Clustern und Keimen sowie der Interaktion von Additiven mit Kristallflächen unterschieden werden [Nancollas 84], [Nývlt & Ulrich 95].

2.8.1.1 Einfluß auf die Keimbildung

Die *Homogene Keimbildung* wird durch die Bildung von Koordinationsverbindungen (Komplexen) inhibiert. Diese Komplexbildung senkt die Keimbildungsrate. Je stärker ihr Einfluß, desto höher ist die Komplexstabilität. Es bilden sich dabei *Heterocluster* aus dem Inhibitor mit dem aktiven Ion im Zentrum. Die Größe dieser Heterocluster ist

proportional zur Additivkonzentration und dem Grad der Übersättigung. Die Übersättigung wird durch diese Komplexbildung effektiv gesenkt. Durch diese Mechanismen werden beispielsweise pathologische Kristallisationsformen in biologischen Systemen verhindert. Pyrophosphat verhindert die Bildung von Blasensteinen in einer bezüglich Calciumphosphat und Calciumoxalat hochgradig übersättigten Umgebung [Fleisch & Bisaz 62]. Anhand von Kristallisationsuntersuchungen konnte dies später bestätigt werden [Umegaki et al. 89]. Andere Elektrolyte, wie z.B. Natriumchlorid beeinflussen ebenfalls das Wachstum von Calciumphosphaten, da beide Ionen gut in die Kristallstruktur des Hydroxylapatits ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) inkorporiert werden können [Zawacki et al. 86] [Nancollas & Tomažič 74]. Desweiteren werden Adsorptionsmodelle postuliert. Im statischen Adsorptionsmodell soll die Keimoberfläche mit einer Monoschicht des Additivs überzogen sein, das dynamische Modell basiert auf der Möglichkeit von Zusammenstößen der Keimpartikel mit dem Kristallisationshilfsstoff. Theoretische Berechnungen zeigen, daß in der beginnenden Phase der Keimbildung der Kollisionsmechanismus vorherrscht, später dann der Adsorptionsmechanismus. Die endotherme Adsorption eines Additivs senkt die Stabilität der Oberfläche und erhöht die Energiebarriere zur Bildung eines kritischen Nucleus. In diesem Fall muß der gebildete Komplex zuerst getrennt werden, bevor sich ein kritischer Keim bilden kann. Dies führt zu einer erhöhten Stabilität des übersättigten Systems. Diverse Additive können die Keimbildungsrate erhöhen. Dies kann dann eintreten, wenn der Kristallisationshilfsstoff (in diesem Fall der *Promotor*) mit der Makrokomponente so reagiert, daß schlechter lösliche Substanzen gebildet werden.

Bei der *heterogenen Keimbildung* erfolgt eine Adsorption auf der Oberfläche des Heteropartikels. Dabei kann die Keimbildung erhöht oder gesenkt werden. Oberflächenaktive Substanzen deaktivieren heterogene Keimpartikel und erhöhen so die Breite der metastabilen Region. Ein entgegengesetzter Einfluß läßt sich dadurch erklären, daß oberflächenaktive Substanzen die Oberflächenenergie senken können, so daß die Keimbildungsrate steigen kann. Mit Additiven funktionalisierte Hetero-oberflächen können die Kristallform und sogar die Kristallmodifikation gezielt steuern [Küther et al. 98] [Küther et al. 98-2] [Küther et al. 98-3]. Epitaxieeffekte wurden ebenfalls für das unterschiedliche Wachstum von Calciumphosphaten auf artfremde Matrices (Wachstum von Hydroxylapatit auf Calciumfluorid- oder Calciumcarbonat-Kristallen) verantwortlich gemacht [Koutsoukos & Nancollas 81].

Der Einfluß von Additiven auf die *Sekundärkeimbildung* läßt sich mit einem physikalischen Adsorptionsmodell erklären. Aktive anorganische Additive verbreitern die metastabile Zone in übersättigten Lösungen. In Abwesenheit von Zusatzstoffen ist die Möglichkeit der Bildung stabiler Aggregate auf der Festkörperoberfläche höher als die in der umgebenden Lösung. Analog zu heterogenen chemischen Reaktionen erfolgt die Adsorption bevorzugt an energetisch aktiven Stellen auf der Oberfläche. Sind diese Stellen blockiert, so verringert sich auch die Möglichkeit, kritische Cluster zu bilden und die Keimbildungsrate sinkt. Wenn das Additiv darüber hinaus noch eine höhere Ionenladung als die der Makrokomponente besitzt, wird das Gleichgewicht der Oberflächenladung gestört; dies führt ebenfalls zur Senkung der Keimbildungsrate.

2.8.1.2 Einfluß auf das Kristallwachstum

Die Wachstumsrate ist, abhängig von unterschiedlichen Strukturen und energetischen Situationen, bei verschiedenen Kristalloberflächen unterschiedlich (siehe auch Abb. 2.3). Um den Effekt auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Morphologie zu beschreiben, müssen die Kristalloberflächen separat betrachtet werden.

Auf der Kristalloberfläche ist nach Abbildung 2.2 zwischen drei verschiedenen Oberflächensituationen zu unterscheiden. Wie in Kapitel 2.7 beschrieben, repräsentieren die Kantenpositionen die energetisch günstigsten Inkorporationsstellen, weil an dieser Position die höchste Bindungsenergie frei wird. Flache Stellen sind die energetisch ungünstigsten Wachstumslagen.

Zusatzstoffe können, abhängig von ihrer sterischen und energetischen Natur an verschiedenen Stellen der Kristalloberfläche adsorbieren und sich somit auf die Energie individueller Stellen auswirken, oder auch die aktiven Wachstumsstellen blockieren. Der Effekt von solchen Inhibitoren ist unterschiedlich, wenn sie an unterschiedlichen Stellen (Kristalloberflächen) adsorbieren. Es wird dabei oft ein Sinken der Wachstumsrate, verbunden mit einer Änderung der Morphologie beobachtet. Das Sinken der Diffusionsgeschwindigkeit entlang einer glatten Fläche oder Stufe oder das Sinken der Anzahl von Kanten kann durch Adsorption des Additivs an diesen Stellen erfolgen.

Generell läßt sich diese Gruppe Zusatzstoffe in zwei Untergruppen aufteilen. Physisorption ist dabei für die *schwach adsorbierenden* Substanzen typisch, während chemische Bindung (Chemisorption) für die *stark adsorbierenden* Additive verantwortlich ist. Beim Mechanismus der stark adsorbierenden Inhibitoren werden die Hemmstoffmoleküle weit über die Kristalloberfläche verstreut. Wenn eine wachsende Stufe solch ein Molekül trifft, so wird die Kante an dieser Stelle verformt. Wenn der Abstand zweier Partikel, die nebeneinander adsorbiert sind, kleiner ist als der kritische Keim, wird das Wachstum an dieser Stelle unterbrochen.

Die Untersuchung des Einflusses von Polyacrylsäuren (PAA) auf die Kristallisationsgeschwindigkeit von Hydroxylapatit führte zu dem Ergebnis, daß 0.01 ppm PAA von niedrigem Molekulargewicht die Kristallisationsrate um ca. 60% senkt, 0.5 ppm unterdrücken die Kristallisation vollständig. Die Auftragung der Wachstumsgeschwindigkeit gegen die Konzentration des Polymers führt zu einer Adsorptionsisotherme vom Langmuir-Typ [Amjad 89].

Ein Langmuir-Modell der Adsorption auf Kristalloberflächen konnte ebenfalls beim Einfluß von Albumin auf die HAP-Kristallisation aufgestellt werden [Gilman & Hukins 94]. Weiterhin konnten auch Oberflächenadsorptionsmechanismen beim Einfluß von Citrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) und Phosphocitrat ($\text{Na}_5\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_{10}\text{P}$) auf das Kristallwachstum von Octacalciumphosphat (OCP) verantwortlich gemacht werden. Phosphocitrat adsorbiert fast doppelt so stark wie Citrat an der Oberfläche von Hydroxylapatit, der Unterschied auf der Kristalloberfläche von OCP war dagegen nicht so stark ausgeprägt. Die eher schwache Adsorption der organischen Komponenten auf OCP erfolgt daher eher durch elektrostatische Effekte als durch kovalente Bindung [Sharma et al. 92]. Der Einfluß von Hexacarboxybenzol, ebenso wie der Einfluß von Spuren von Hydroxyethyliden-1,1-diphosphonsäure (HEDP), welches die Vaterit-Modifikation von Calciumcarbonat stabilisiert, läßt sich bei Kristallisationsversuchen von Hydroxylapatit ebenfalls mit der Oberflächenadsorption erklären [Amjad 82].

Adsorbate können auch durch Einbau in das Kristallgitter ihren inhibierenden Einfluß ausüben. Magnesium inhibiert die Kristallisation von Hydroxylapatit beispielsweise ohne Inkorporation in das Kristallgitter, wohingegen Strontium in größerem Umfang in das Apatitgitter eingebaut wird, als es in der umgebenden Lösung vorliegt (niedrigeres Sr/Ca-Verhältnis im Kristall als in der umgebenden übersättigten Lösung) [Nancollas & Zawacki 84].

Die Untersuchung und Quantifizierung von Inhibitionsphänomenen ist schwierig durchzuführen. Die Reproduzierbarkeit ist in einfachen Systemen schlecht gegeben. Beispielsweise reagieren "vorgealterte" Kristalle durch ihre glatteren Kristallflächen und geringere Anzahl von Ecken- und Kantenpositionen oft unterschiedlich und wesentlich langsamer [Nancollas & Zawacki 84]. Hauptsächlich muß auf die konstante Übersättigung, bzw. auf konstante Ionenkonzentrationen geachtet werden. Das Langmuir-Modell geht außerdem von einer Monolage adsorbierter Moleküle auf der Oberfläche aus, ist aber in den beobachteten Fällen lediglich eine gute Annäherung an die realen Verhältnisse [Meyer & Fleisch 84].

3. Calciumphosphate

3.1 Calcium

Calcium ist das fünfthäufigste Element und kommt in Lagerstätten als Calciumcarbonat CaCO_3 (Kalkstein, Marmor, Kreide), Dolomit $\text{CaCO}_3 \cdot \text{MgCO}_3$, Gips $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und apatitischen Mineralien, ausgehend vom Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, vor. Die Kalklagerstätten rühren von marinen Ablagerungen her, was die Bedeutung des Calciums als biogenem Mineral unterstreicht.

Ionenradius r	100 pm
Verhältnis Radius/Ladung r/q	50 pm/q
Oberfläche $O=4\pi r^2$	125000 pm ²
Bevorzugte Koordinationszahl	6-8
Bevorzugte Koordinationsatome	O
Bevorzugter Ligandentyp	zweizählige Oxoliganden, z.B. verbrückende Carboxylate
Verteilung in humanen Erythrocyten (intrazellulär)	0.1 mM/kg
Verteilung im menschlichen Blutplasma (extrazellulär)	2.5 mM/kg

Tabelle 3.1: Charakteristika des Ca^{2+} -Kations (aus [Kaim & Schwederski 91]).

Tabelle 3.1 zeigt einige wichtige Eigenschaften von Calcium. Das Erdalkalimetall bildet in Wasser sehr labile Hydratkomplexe $[\text{Ca}(\text{H}_2\text{O})_6]^{2+}$. Die kinetische und thermodynamische Stabilität der Chelatkomplexe lässt sich durch Entropiezunahme erklären.

3.1.1 Bedeutung von Calcium in biologischen Systemen

Neben der Bedeutung des Calciums als kristallinem Stabilisator in zahlreichen Skelettsystemen dient die rasch verlaufende freie Diffusion von Alkalimetall- und Erdalkalimetallkationen zum *Informationstransfer* im Sinne der Signaltransduktion. Die wesentliche biochemische Bedeutung sind dabei die deutlich unterschiedlichen Konzentrationen im intra- und extrazellulären Raum. Die große Bedeutung des Calciums (neben K^+ , Na^+ , Mg^{2+}) geht auch daraus hervor, daß Störungen im Haushalt dieser Elektrolyte zu ernstesten Beeinträchtigungen der Gesundheit führen können. Bei schwerem Calciummangel oder nicht genügender effizienter Aufnahme und Verwertung treten unter anderem Beeinträchtigungen des Skelettaufbaus ein. Ca^{2+} -Überschuß im Zellinneren führt zur Leistungsminderung und dementsprechend erhöhter Muskelerregbarkeit (Krämpfen).

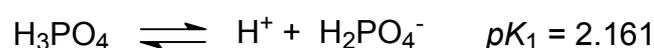
Calcium-Ionen spielen eine zentrale Rolle in grundlegenden physiologischen Vorgängen. Dabei läßt sich verallgemeinernd Calcium als Informations-Zwischenträger (*second/third messenger*), als Auslösefaktor (*Trigger*), Regulator und Signalverstärker verstehen. In vielfältigen komplexen Rückkopplungsmechanismen werden die Calcium-Aufnahme, -Speicherung und -Freisetzung durch hormonell beeinflusste Regelkreise gesteuert. Die Kontrolle der Ca^{2+} -Konzentration ist deshalb so wesentlich, weil dieses Ion an biologischen Membranen einen außerordentlich hohen Konzentrationsunterschied von mehr als drei Größenordnungen aufweisen kann (Tabelle 4.1). Auch zwischen Teilbereichen innerhalb komplexer Zellen (z.B. Mitochondrien) treten Konzentrationsunterschiede auf. Zur Aufrechterhaltung dienen verschiedene Ca^{2+} -Ionenpumpen, Ionenkanäle und Phospholipid-Membranen. Diese Membran- und Kanalstrukturen werden beispielsweise bei der Muskelkontraktion eingesetzt [Gollasch et al. 00].

Ca^{2+} ist ein Ion ohne Redoxfunktion, welches aufgrund des Ionenradius von 100 pm in seinen Komplexen eine hohe, variable und irreguläre Koordinationsgeometrie aufweist. Da Calcium gerne mit kleinen Wassermolekülen, mit Carbonylsauerstoffatomen von Peptidbindungen sowie mit den potentiell chelatbildenden Carboxylatresten koordiniert, wie sie in sauren Proteinen vorliegen (typische Koordinationszahl für die Bindung von Calcium in Proteinen ist eine Koordinationszahl von 7, im Gegensatz zur oktaedrischen Koordination, beispielsweise von Magnesium), ist hier eine vom Protein bestimmbare

Koordinationsgeometrie verwirklicht. Gleichzeitig gewährleistet der höhere Ionenradius eine höhere Geschwindigkeit der (De-)Komplexierung und damit raschen Ionentransfer [Kaim & Schwederski 91]. Die starke pH-Abhängigkeit der Komplexierung führt dazu, daß ein effektiver Wettbewerb zwischen den Carboxylatgruppen und den Protonen für Calcium-Bindungsstellen erfolgt. Calcium hat ein starkes Bestreben innerhalb und außerhalb der Zelle an PO_4^{2-} -Endgruppen zu binden. Die phosphorylierenden Proteine, welche oszillierende und flexible Grundgerüste aufweisen, sind dadurch fähig, die Affinität zur Calcium-Bindung und damit ihre Geometrie zu ändern. Alkalisierung des Zellinneren macht Bindungsstellen für Calcium-Ionen verfügbar und dient so dem Zellwachstum und der Mineralisierung. Damit verbunden erfolgt eine Freigabe von Calcium-Ionen aus dem Endoplasmatischen Reticulum, welches eine Calcium-Speicherfunktion innehat, gesteuert durch ein entsprechendes Signal (Inositoltriphosphat). Das Endoplasmatische Reticulum ist eine Zellorganelle, in der Protein- und Lipid-Synthese stattfindet. Außerdem kommuniziert es mit wichtigen Stellen der Zelle beispielsweise über den o.g. Ca-Nachrichtentransfer. Die Mitochondrien inkorporieren ebenfalls Calcium und mineralisieren dieses als anorganisches Calciumphosphat in ihren Matrices. Weiterhin erfolgt auch ein Calcium-Transport über Vesikel [Moskowitz 86].

3.2 Das Orthophosphat-System

Neben den wasserärmeren Metasäuren und Polysäuren bildet Phosphor Sauerstoffsäuren der allgemeinen Zusammensetzung H_3PO_n ("Orthosäuren", $n=2,3,4,5,6$). Orthophosphorsäure H_3PO_4 ist eine dreibasige mittelstarke Säure und bildet daher drei Reihen von Salzen. Die drei Dissoziationsstufen und ihre pK_S -Werte bei 25°C sind:



Daraus ergibt sich für den Zusammenhang zwischen Phosphationengehalt und einer Phosphatlösung folgendes Diagramm (Abb. 3.1).

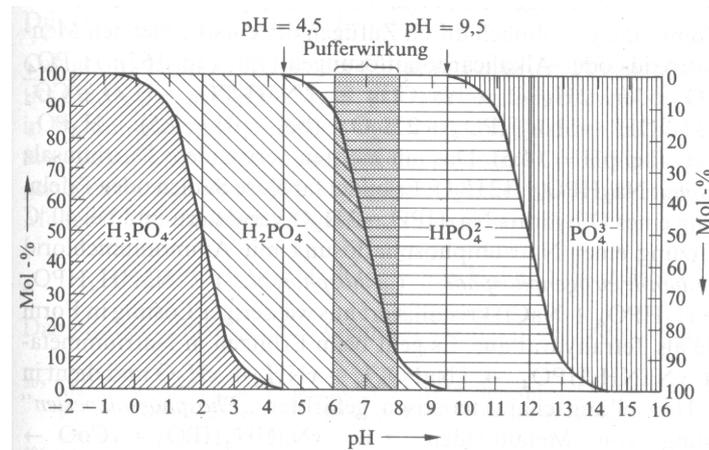
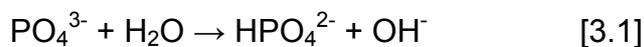


Abb. 3.1: Abhängigkeit der Ionenkonzentration vom pH-Wert in einer Phosphorsäure- (Phosphat-) Lösung [Holleman & Wiberg 85]

Aus dem Diagramm ist ersichtlich, daß bei einem pH-Wert von 2 die Hälfte aller Phosphorsäuremoleküle als H_3PO_4 , die andere Hälfte als $H_2PO_4^-$ vorliegt. Mit zunehmendem pH-Wert verschiebt sich das Gleichgewicht nach rechts hin zur ersten Dissoziationsstufe. Bei einem pH-Wert von 4,5 liegt praktisch alles in Form von $H_2PO_4^-$ vor, bei pH 14,5 ist die dritte Dissoziationsstufe zu 100% vorhanden. Man erkennt im Diagramm außerdem, daß wässrige Lösungen von Phosphorsäure mittelstark sauer, von *primären* Phosphaten schwach sauer (pH 4,5), von *sekundären* schwach basisch (pH 9,5) und von *tertiären* stark basisch (pH 14,5) reagieren. Letztere sind demnach also nur in stark basischer Lösung ohne Hydrolyse auflösbar. In Wasser (pH 7) erfolgt weitgehende Hydrolyse:



wobei die Lösung alkalisch wird. Im pH-Bereich 6-8 puffert ein Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat (90% $H_2PO_4^-$ + 10% HPO_4^{2-} bis 10% $H_2PO_4^-$ + 90% HPO_4^{2-} $pK_S=7.21$).

3.3 Die Calciumphosphate

Die Calciumsalze der dreibasischen Phosphorsäure können in allen Dissoziationsstufen gebildet werden. Solche mit H_2PO_4^- -Ionen bilden sich nur in saurem Medium (siehe Abb. 3.1). Beide anderen Dissoziationsstufen (HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}) kommen dagegen in der eher neutralen Mineralphase von Knochen und Zähnen vor (Siehe Kapitel 4). Manche Calciumphosphate enthalten Kristallwasser; diejenigen, die zur basischen Apatitfamilie gehören, enthalten OH^- -Ionen. Alle Calciumphosphate sind weiße Festkörper, die in Wasser schlecht löslich sind. Alle sind in Säuren löslich.

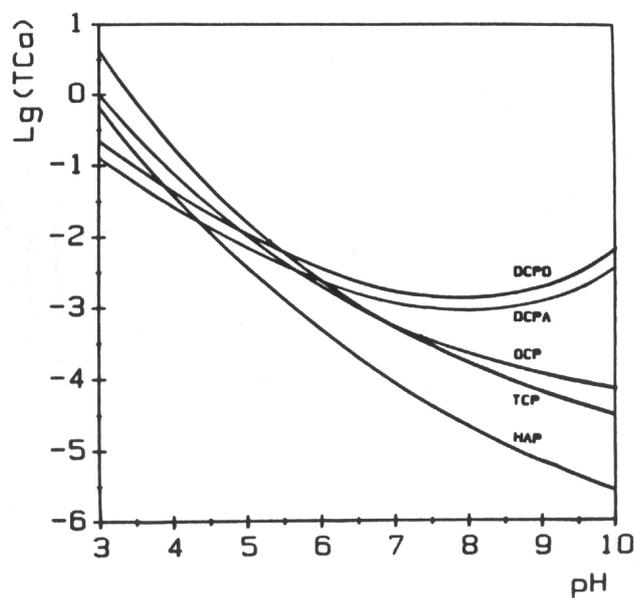


Abb. 3.2: Logarithmische Auftragung der Löslichkeitsisothermen einiger Calciumphosphate. HAP: Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, TCP: Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, OCP: Octacalciumphosphat $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, DCPA: Dicalciumphosphat CaHPO_4 , DCPD: Dicalciumphosphat-dihydrat $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Aus: [Koutsoukos et al. 80]

Bei der Kristallisation der Calciumphosphate sind kinetische Faktoren besonders wichtig. Thermodynamisch ist der Hydroxylapatit die stabilste Phase, bei schnellen Fällungsreaktionen entstehen jedoch oft das kinetisch bevorzugte Octacalciumphosphat oder ein amorphes Calciumphosphat, welches in einem langsamen Auflösungs/Rekristallisationsmechanismus zu dem thermodynamisch bevorzugten Hydroxylapatit umkristallisiert. Ein weiterer komplizierter Faktor ist die Bildung von Ionenpaaren, besonders von $[\text{CaHPO}_4]^0$ und $[\text{CaH}_2\text{PO}_4]^+$. Das Löslichkeitsprodukt ist also stark pH-abhängig. Abbildung 3.2 zeigt die Auftragung von Löslichkeitsisothermen der wichtigsten Calciumphosphate. Demnach ist Hydroxylapatit oberhalb eines pH-Wertes von 4,5 die stabilste Phase.

Abkürzung	Name	Mineralname	Formel	K_L	Ca/P-Verhältnis	$\Delta_f G^0$ [kJ mol ⁻¹]
DCPA	Dicalcium-phosphat wasserfrei („anhydrous“)	Monetit	CaHPO ₄	$1.83 \cdot 10^{-7}$ (mol l ⁻¹) ²	1.0	-1681.18
DCPD	Dicalcium-phosphat-dihydrat	Brushit	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	$1.87 \cdot 10^{-7}$ (mol l ⁻¹) ²	1.0	-2154.58
OCP	Octacalcium-phosphat	---	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ ·5H ₂ O	$5.0 \cdot 10^{-50}$ (mol l ⁻¹) ⁷	1.33	-12263
β-TCP	β-Tricalcium-phosphat	---	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	$2.07 \cdot 10^{-33}$ (mol l ⁻¹) ⁵	1.5	-3884.7
α-TCP	α-Tricalcium-phosphat	---	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	$8.46 \cdot 10^{-32}$ (mol l ⁻¹) ⁵	1.5	-3875.5
HAP	Hydroxylapatit	Hydroxylapatit	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	$6.62 \cdot 10^{-126}$ (mol l ⁻¹) ¹⁸	1.67	-12677
FAP	Fluorapatit	Fluorapatit	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	$6.30 \cdot 10^{-137}$ (mol l ⁻¹) ¹⁸	1.67	-12983

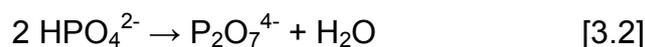
Tabelle 3.2: Abkürzungen, Namen, Ca/P-Verhältnisse, Thermodynamische Daten und berechnete Löslichkeitsprodukte der wichtigsten Calciumphosphate. Aus [Elliott 94].

3.3.1 Brushit (DCPD) und Monetit (DCPA)

Dicalciumphosphat-dihydrat (Brushit, DCPD) und wasserfreies Dicalciumphosphat (Monetit, DCPA) lassen sich in schwach saurer Lösung (pH 4-5) herstellen [LeGeros 94]. Oberhalb eines pH-Bereichs von ca. 5.5 ist eine nanokristalline Apatitphase bevorzugt [Abbona et al. 86].

Brushit wurde als Intermediat bei der Apatitfällung erkannt. In biologischen Systemen kommt es, im Gemisch mit Carbonatapatiten in pathologischen Calcifikationen vor [LeGeros 94] [Rodgers & Spector 86]. Es kristallisiert monoklin in einem Schichtgittertyp, in dessen Bindungsfeld Wasserstoffbrücken einen hohen Bindungsanteil, vor allem zwischen den [010]-Schichten, haben. Das Calcium-Ion ist mit 6 Phosphat-Sauerstoff-Atomen und zwei weiteren Wasser-Sauerstoff-Atomen koordiniert. Im Brushitgitter sind 5 kristallographisch unterschiedliche Wasserstoff-Positionen vor-

handen. Eine repräsentiert das acide Proton des HPO_4^{2-} -Ions, die 4 anderen gehören zu unterschiedlich eingelagerten Wassermolekülen, die unterschiedliche IR-Banden zeigen (Abb. 3.4). Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen einen blättchenförmigen Habitus. Die Kristallwachstumsgeschwindigkeit von Brushit ist proportional zum Konzentrationsprodukt $[\text{Ca}^{2+}][\text{HPO}_4^{2-}]$ über einen weiten Bereich der Ca/P-Verhältnisse. Bei Versuchen mit konstanter Ionenkonzentration (*Constant Composition*) konnte gezeigt werden, daß die Wachstumsgeschwindigkeit proportional zur Kristalloberfläche ansteigt [Hohl et al. 82]. In niedrigen pH-Bereichen sind Brushit bzw. Monetit kinetisch bevorzugt. Dieses ist auch mit Entropieeffekten erklärbar: Zur Bildung von Brushit oder Monetit ist nur das Zusammenkommen von jeweils einem Ion Ca^{2+} und HPO_4^{2-} notwendig, während die Bildung anderer Phasen das Zusammentreffen von mehr Ionen fordert [Abbona et al. 86]. Thermisch reagiert Brushit mit der Bildung von DCPA beim Erhitzen auf 180°C , Erhitzen auf $320\text{-}340^\circ\text{C}$ führt zur Bildung von $\gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ [Newesely 67]:



Bei 700°C bildet sich die β -Form des Pyrophosphats, welche sich bei 1200°C zur α -Form umwandelt. Die Hydrolyse von Brushit führt zu Hydroxylapatit in einem langsamen Auflösungs-Rekristallisationsprozeß.

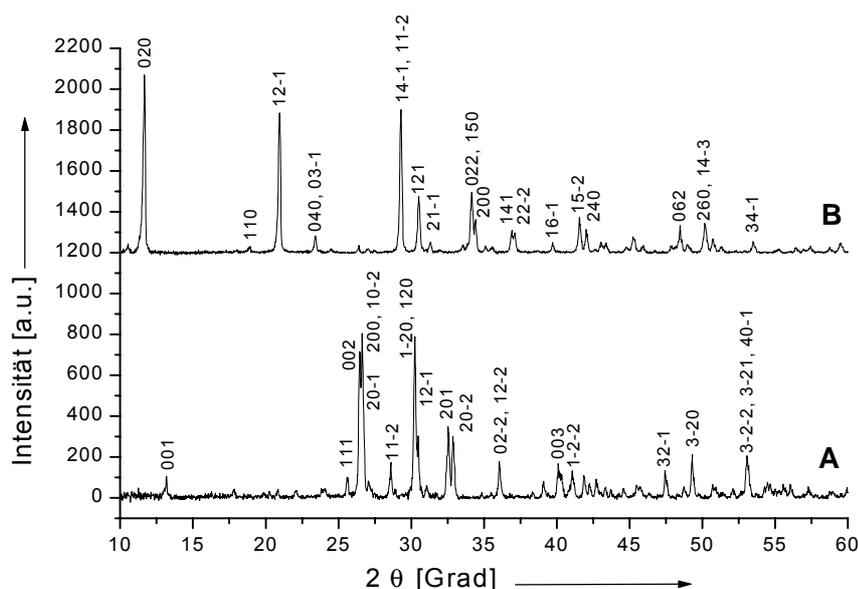


Abb. 3.3: Röntgenpulverdiffraktogramme mit Angabe der wichtigsten Miller-Indices von A: Monetit (DCPA , CaHPO_4) und B: Brushit (DCPD , $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).

Monetit (DCPA) kristallisiert triklin. Die Einheitszelle besteht aus CaHPO_4 -Ketten, die durch Ca-O-Bindungen und drei Arten von Wasserstoffbrücken zusammengehalten werden. Aus DCPD läßt es sich durch trockenes Erhitzen bei 180°C , durch Erhitzen einer wäßrigen DCPD-Lösung oder durch Fällung bei $60\text{-}90^\circ\text{C}$ herstellen.

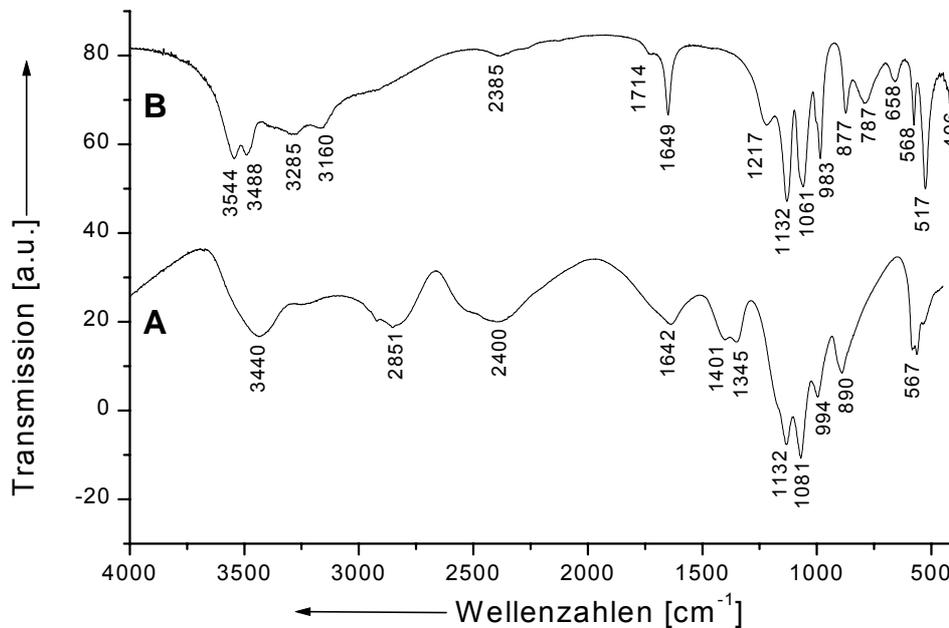


Abb. 3.4: FTIR-Spektren von A: DCPA (Monetit) und B: DCPD (Brushit).

DCPD entsteht schneller als das schlechter lösliche DCPA, denn die hydratisierten Ionen in Lösung lassen sich einfacher in einen hydratisierten Kristall inkorporieren. Außerdem hat eine hydratisierte Struktur eine niedrigere Oberflächenenergie in der Keimbildungsphase und wird somit gegenüber einer wasserfreien Phase auch thermodynamisch bevorzugt.

Wie bei DCPD führt auch die Hydrolyse von DCPA in überschüssigem Wasser zur Konversion zu nichtstöchiometrischem Hydroxylapatit. Die thermischen Reaktionen sind bereits zuvor beschrieben worden.

IR DCPA Wellenzahlen [cm^{-1}]	IR DCPA Schwingungen	IR DCPD Wellenzahlen [cm^{-1}]	IR DCPD Schwingungen
3440	O-H Streckschwingung von freien Wassermolekülen	3544-3488 3285-3160	O-H Streckschwingung von Kristallwasser
2851 2400	(P)O-H Streckschwingungen	2385	Kombinationsschwingung
1600-1700 (b)	H-O-H Bindungs- und Rotationsschwingungen von freiem Wasser	1649 (s)	H-O-H Bindungsschwingungen von Kristallwassermolekülen
1400-1350 (b)	in plane P-O-H Bindungsschwingung	1217	in plane P-O-H Bindungsschwingung
1132	P-O Streckschwingungen	1132	P-O Streckschwingungen
1081		1061	
994	P-O Streckschwingung	983	P-O Streckschwingung
890	P-O(H) Streckschwingung	877	P-O(H) Streckschwingung
		658	Kristallwasser
567	O-P-O(H) Bindungsschwingung	568	O-P-O(H) Bindungsschwingung
		406	O-P-O Bindungsschwingung

Tabelle 3.3: Zuordnung der FTIR-Banden von DCPA und DCPD. (s)-scharf, (b)-breit. Aus: [Tortet et al. 97].

3.3.2 Hydroxylapatit und Fluorapatit

Als Modellsubstanz der anorganischen Komponente von Knochen und Zähnen dient Hydroxylapatit der Summenformel $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{X})$ mit $\text{X}=\text{OH}^-$, der sowohl in der hexagonalen Raumgruppe $\text{P6}_3/\text{m}$ als auch in der monoklinen Form $\text{P2}_1/\text{b}$ kristallisiert [Elliott et al. 73]. Die zweite Form ist unter Normalbedingungen stabiler. Die Hydroxylgruppe ist vielfach substituierbar, hauptsächlich von Halogenatomen F^- (Fluorapatit), Cl^- (Chlorapatit). Einen Eindruck der Anordnung der Ionen im Apatitgitter ist in Abb. 3.5 gegeben. Parallel zur Ansicht ist die kristallographische c -Achse angeordnet. Eine Elementarzelle enthält zwei Formeleinheiten und hat die Gitterparameter $a=9,424 \text{ \AA}$ und $c=6,879 \text{ \AA}$. Wesentliches Strukturelement des Apatitgitters ist die 6-zählige Schraubenachse (6_3) in Richtung der c -Achse, auf welcher die X-Atome posi-

tioniert sind. Jedes X-Atom ist von einer trigonal-planaren Anordnung von Calcium-Atomen umgeben. Diese trigonalen Ebenen der Calciumionen sind in Richtung der *c*-Achse jeweils um 60° zueinander verdreht. Bei Aufsicht in *c*-Achsenrichtung ergibt sich daher eine hexagonale Orientierung der Ca-Atome um die X-Atome. Weiterhin ist diese Ca-Position von 6 weiteren Calciumionen umgeben. Aufgrund der unterschiedlichen kristallographischen Umgebung werden die „kanalbildenden“ Ca^{2+} -Ionen als Ca-Typ 1-Positionen und die hexagonalen Ca-Umgebungsionen als Ca-Typ 2-Positionen bezeichnet. OH^- -Ionen ragen um $0,3 \text{ \AA}$ aus dem Schwerpunkt der Typ-1-Calciumionen heraus.

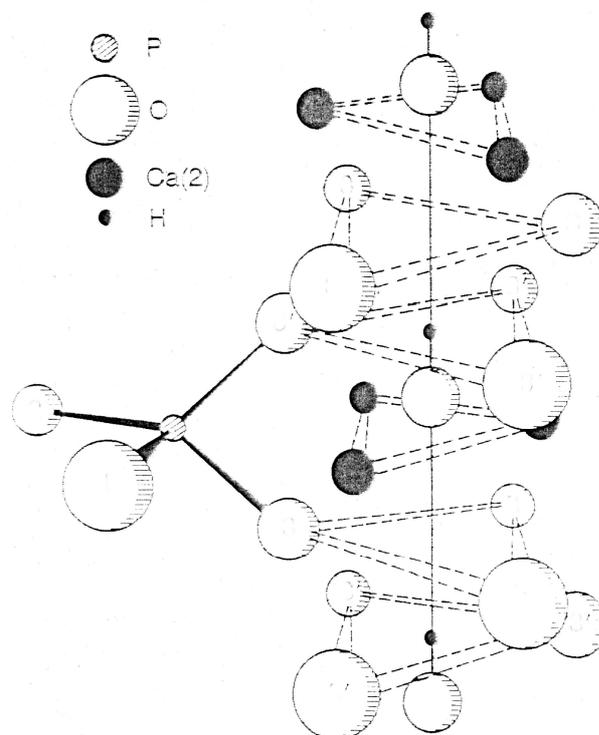


Abb. 3.5: Anordnung der Ionen im Kristallgitter von Hydroxylapatit. Aus [Elliott 94].

Die Stelle, in der die X-Ionen positioniert sind, wird oft auch als „Ionenkanal“ bezeichnet. Im Fall einer Vollbesetzung dieser Position wären benachbarte Sauerstoffatome nur um $0,6 \text{ \AA}$ voneinander entfernt. Die Position ist daher nur zu 50% besetzt und beide Orientierungen der OH^- -Ionen sind gleich häufig. In Abbildung 3.6 sind die möglichen Orientierungen der OH^- -Ionen innerhalb eines Ionenkanals dargestellt. Einen Beweis dafür, daß alle X-Ionen in die gleiche Richtung orientiert sind, gibt es bisher noch nicht. Einfache Überlegungen bezüglich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Hydroxylgruppen deuten darauf hin, jedoch konnte dies bisher nicht aus Meßergebnissen abgeleitet werden. Dagegen sind die X-Ionen im

monoklinen Hydroxylapatit geordnet arrangiert. Monokliner Hydroxylapatit lässt sich nur unter Hochtemperaturbedingungen herstellen, in wässriger Lösung konnte er bisher noch nicht hergestellt werden [Ikoma et al. 99]. Thermisch ist Hydroxylapatit wesentlich instabiler als Fluor- oder Chlorapatit.

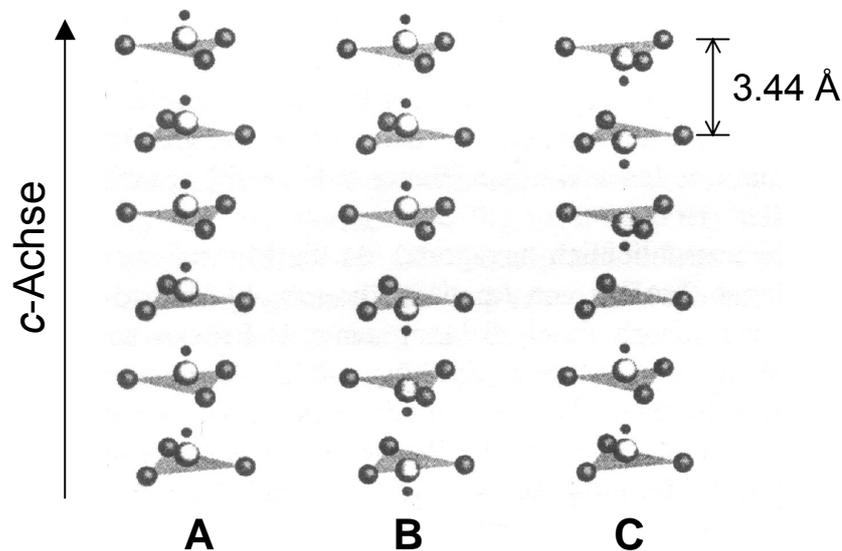


Abb. 3.6: Mögliche Orientierungen der OH⁻-Ionen innerhalb der Kanäle, gebildet durch die Ca²⁺-Ionen. Zur Verdeutlichung ist eine trigonale Ebene eingezeichnet, die von jeweils drei Calciumionen aufgespannt wird. A: geordnete Idealstruktur, B: Fehlordnung ohne Lücke, C: Fehlordnung infolge eines Schottky-Defekts. Aus [Busch 98].

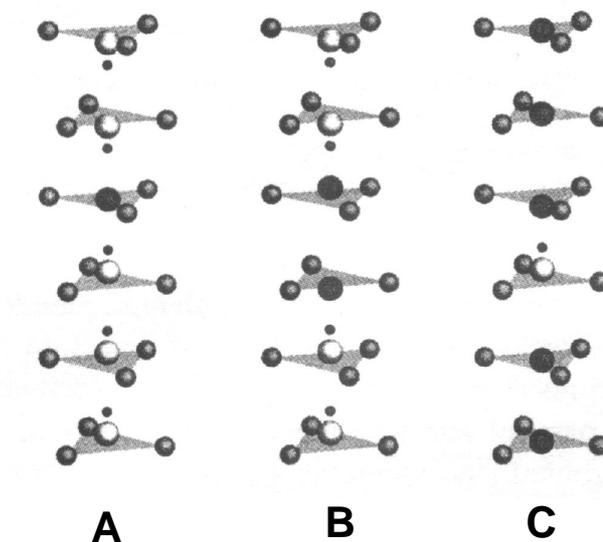


Abb. 3.7: Mögliche Anordnungen von OH⁻- und F⁻-Ionen in den Ionenkanälen der Apatitstruktur bei fluoridhaltigem Hydroxylapatit. A: F⁻ hat zwei OH⁻-Ionen als unmittelbare Nachbarn und behält seine Position bei. B: F⁻ erhält nur ein OH⁻-Ion als unmittelbare Nachbarn. Durch die Wasserstoffbrückenbindung wird das F⁻-Ion um 0,1 Å aus der Calcium-Ebene herausbewegt. C: Im hydroxidionenhaltigen Fluorapatit kommt dem F⁻-Ion ein OH⁻-Ion als Nachbar zu, bei gleicher Orientierung aller Hydroxylionen im Gitter wäre eine Polarität des Kristalls denkbar. Aus [Busch 98].

Bei Chlorapatit sind die Kanalpositionen zu mindestens 85% mit Chloridionen besetzt, wobei die Chloridionen 0,38 Å oberhalb der trigonalen Calcium-Ebene positioniert sind [Sudarsanan & Young 78].

Fluorapatit ist ausschließlich hexagonal, da die Fluoridionen exakt in der trigonalen Calcium-Ebene liegen. Weiterhin sind die Fluoridionen stärker an die umgebenden Ca-Atome gebunden [Posner 85]. In einer Mischstruktur aus Fluor- und Hydroxylapatit läßt sich aus Festkörper-NMR-Messungen ersehen, daß zu benachbarten Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken ausgebildet worden sind. Wenn alle Fluoridionen in die gleiche Richtung ausgelenkt sind, so wäre eine Polarität des Kristalls denkbar, jedoch fehlen bisher die Beweise dafür [Busch 98].

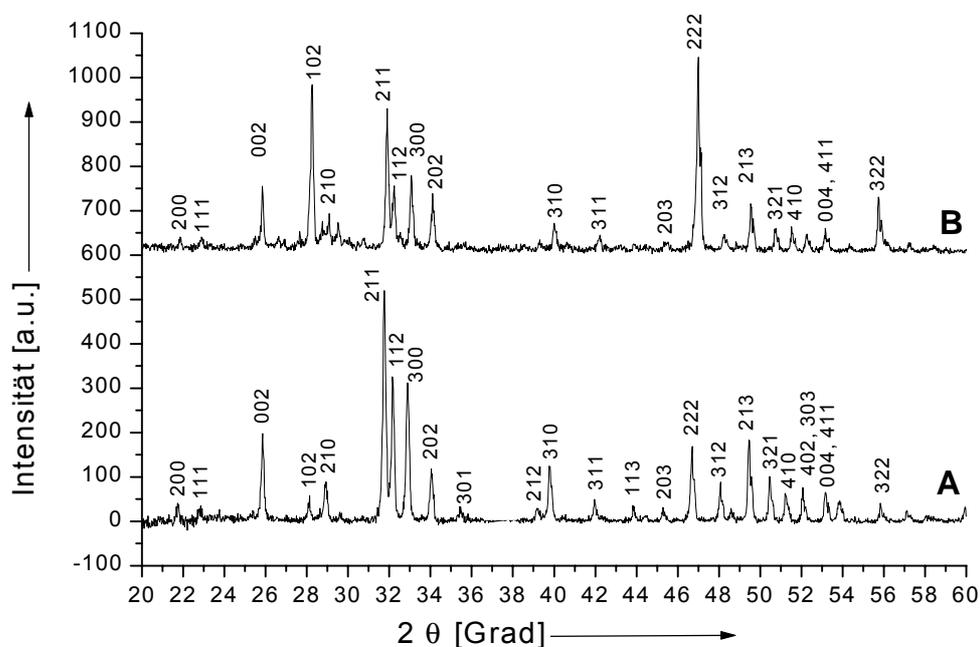


Abb. 3.8: Röntgenpulverdiffraktogramme und die wichtigsten Miller-Indices von A: Hydroxylapatit und B: Fluorapatit. Die etwas unterschiedlichen Intensitäten (z.B. 222-Reflex) deuten auf eine Vorzugsorientierung und sind herstellungsbedingt.

In Abbildung 3.8 sind die Röntgenbeugungsdiagramme von HAP und FAP dargestellt. Die nur geringen Unterschiede zwischen beiden Diagrammen (hauptsächlich Intensitätsunterschiede) können meß- bzw. herstellungsbedingt sein. Mit dieser Methode ist also kaum festzustellen, welcher Apatit vorliegt.

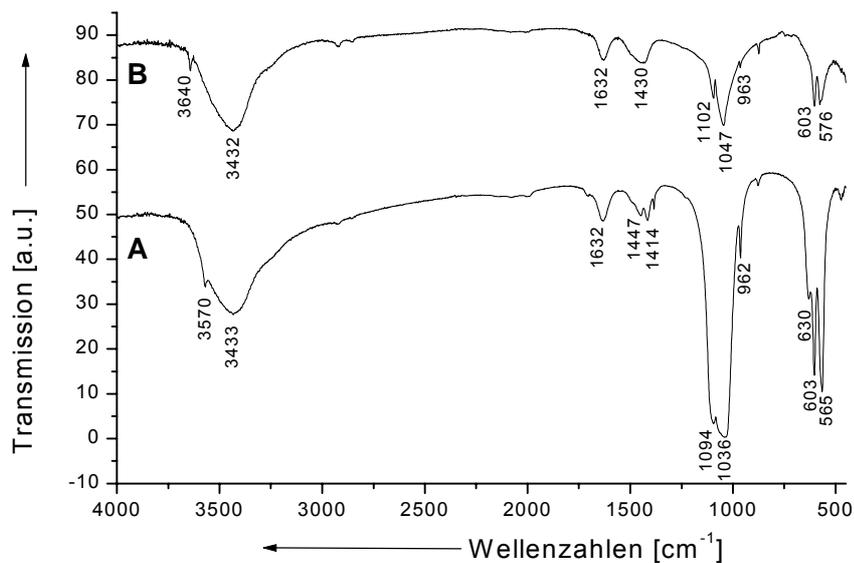


Abb. 3.9: FTIR-Spektren von A: Hydroxylapatit (HAP) und B: Fluorapatit (FAP).

IR HAP Wellenzahlen [cm ⁻¹]	IR HAP Schwingungen	IR FAP Wellenzahlen [cm ⁻¹]	IR FAP Schwingungen
3570-3430 (s, b)	O-H Streckschwingung von freien Wassermolekülen: $\nu_s(\text{OH})$	3570-3430 (s, b)	O-H Streckschwingung von freien Wassermolekülen: $\nu_s(\text{OH})$
2100-1985 (w, b)	P-O Kombinationsschwingungen ($\nu_3+\nu_1$)	2150-1990 (w, b)	P-O Kombinationsschwingungen ($\nu_3+\nu_1, \nu_4+\nu_1$)
1600-1700 (b)	H-O-H Bindungs- und Rotationschwingungen von freiem Wasser	1600-1700 (b)	H-O-H Bindungsschwingungen von Wassermolekülen
1094 (b)	P-O Streckschwingung $\nu_3^{\text{---}}$	1102 (b)	P-O Streckschwingung $\nu_3^{\text{---}}$
1065 (sh)	P-O Streckschwingungen $\nu_3, \nu_3^{\text{---}}$	1040-1075 (s, sh)	P-O Streckschwingungen $\nu_3, \nu_3^{\text{---}}$
1036 (s)			
962 (s)	Totalsymmetrische P-O Streckchwingung ν_1	963 (s)	Totalsymmetrische P-O Streckchwingung ν_1
630 (w)	$\nu_L(\text{OH})$		
603 (s)	P-O Streckschwingung $\nu_4^{\text{---}}$	603 (s)	P-O Streckschwingung $\nu_4^{\text{---}}$
570-565 (s)	P-O Streckschwingungen $\nu_4^{\text{---}}$ und $\nu_4^{\text{---}}$	576-566 (s)	P-O Streckschwingungen $\nu_4^{\text{---}}$ und $\nu_4^{\text{---}}$

Tabelle 3.4: Zuordnung der Schwingungsmodi zu den IR-Banden von HAP und FAP. Nach [Baddiel & Berry 66]. w-schwach (*weak*), s-Scharf, sh-Schulter (*shoulder*), b-breit.

Die Infrarotspektren zeigen ebenfalls eine große Ähnlichkeit. Einzig eine Schwingung, die nicht von Wasser-OH kommen kann, läßt sich im Fingerprintbereich des IR-Spektrums (630 cm⁻¹) ausmachen [Baddiel & Berry 66]

Die Substitution von Fluorid im Apatitgitter führt zu einer anisotropen Größenänderung der Kristalle. Die Dicke und/oder die Breite des Kristalls vergrößern sich bei gleichbleibender Länge [Eanes & Hailer 98].

Die Kristallisation von HAP und FAP verläuft über eine amorphe Vorstufe. Automatisierte Fällungsversuche unter *Constant Composition*-Bedingungen (pH-Wert, Ca^{2+} und F^- -Konzentrationen werden durch Titratoren konstant gehalten) in mittelmäßig übersättigten Lösungen zeigten durch zeitlich unterschiedliche Perioden der OH^- -Aufnahme bei der Kristallisation einen sigmoidalen Verlauf der Kristallisation. Diese Induktionszeiten (Zeit bis zum Erreichen der kritischen Keimgröße) lassen sich in drei Stufen aufteilen. In der ersten Stufe A wird zum Konstanthalten des pH-Wertes viel Lauge zugegeben, es werden also viele Protonen frei, was sich mit der Bildung von geringen Mengen amorphem Calciumphosphat (ACP) in Verbindung bringen lässt. In einer zweiten Periode B (110-140 min) wird wenig KOH benötigt, um den pH-Wert konstant zu halten. In Fällungsversuchen von HAP konnte in dieser Periode OCP nachgewiesen werden. Wird FAP gefällt, so sinkt die Fluoridkonzentration in diesem Bereich rapide. F^- wird also in das Gitter eingebaut. Hierbei wird die Konversion von dem bereits entstandenen ACP hin zu einer kristallinen fluoridhaltigen Phase postuliert. Im dritten Bereich C ab ca. 150 min erfolgt ein Ansteigen der Kristallinität und Größenwachstum. Mit steigendem Fluoridgehalt zu Beginn eines Fällungsexperiments wurde ein Sinken der Induktionszeiten A und B sowie eine höhere Kristallinität in der Periode C beobachtet. Die Übersättigungsgrenze ist also schneller erreicht und die Konversion zu einem apatitischen Produkt geht schneller vonstatten [van den Hoek et al. 80]. Bei sehr geringen Übersättigungsraten verläuft dagegen die Kristallisation von HAP ohne die Bildung von Vorstufen [Koutsoukos & Nancollas 81].

Auch andere Ionen werden in das Kristallgitter von Apatiten eingebaut. Strontium kann Calcium substituieren, wird aber in geringerem Umfang in das Apatitgitter eingebaut; das Sr/Ca-Verhältnis ist weit geringer als das in der umgebenden Lösung, was auf Fehlstellenbildung hinweist. Außerdem führt die Anwesenheit von Strontium zu einer geringeren Größe der Apatitkristalle [Koutsoukos & Nancollas 81-2]. Das Ausmaß der Substitution ist außerdem pH-abhängig [LeGeros 94].

Der Einfluß von Heteroionen auf die Kristallisationsgeschwindigkeit konnte folgendermaßen klassifiziert werden, der Einfluß sinkt von links nach rechts:



Der Einfluß dieser Heteroionen folgt zum einen aus dem Einbau in das Kristallgitter, zum anderen wird auch vermutet, daß der zugesetzte Elektrolyt als Koagulator der Partikel dienen kann. Außerdem wird die effektive Übersättigung durch Reduktion der Aktivitätskoeffizienten der Gerüstionen in der Lösung gesenkt. Auch Carbonat aus dem CO_2 der Luft wird in geringen Mengen in das Apatitgitter eingebaut. Dies ist im IR-Spektrum erkennbar durch C-O Schwingungsbanden im Bereich von $1410\text{--}1450\text{ cm}^{-1}$.

Aufgrund dieser Kenntnisse sollten bei Kristallisationsuntersuchungen der „reinen“ Apatitphasen möglichst Gegenionen gewählt werden, deren Ionendurchmesser so groß ist, daß sie nur in geringem Ausmaß in das Gitter inkorporiert werden und deren Einfluß auf die Kristallisation ebenfalls möglichst gering ist.

Aus diesem Grund wurden in den hier vorliegenden Versuchen meist $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ sowie die *Kaliumsalze* der Orthophosphorsäure verwendet.

3.3.3 Amorphe Calciumphosphate und Defektapatite

Apatitische Produkte können in molaren Ca/P-Verhältnissen von 1,5 bis 1,66 hergestellt werden. Die Dimensionen der Fällungsprodukte bewegen sich im Submikrometer-Bereich. Dadurch werden Oberflächenreaktionen bei der Fällung der Apatite sehr wichtig. Diese Faktoren machen die Herstellung und Untersuchung erheblich komplizierter. Apatitische Fällungsprodukte enthalten unterschiedliche Mengen Wasser, saure Phosphationen und Carbonat, welche in komplexen Reaktionen beim Erhitzen entfernt werden. All die Apatite, deren Ca/P-Verhältnis von dem Wert 1,67 für $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ abweichen, werden als *nichtstöchiometrische Apatite* oder *Defektapatite* bezeichnet. Defektapatite können durch Fällung aus übersättigter Lösung in neutralem bis alkalischem pH-Milieu und durch Hydrolyse

von DCPD gewonnen werden. Sie enthalten Fehlstellen und Versetzungen (z.B. Abb. 3.6 C). Wesentlich schwieriger ist dagegen die Herstellung von stöchiometrischen HAP. Eine typische Formel für Defektapatite, die in einem CO₂-freien System hergestellt wurden, ist $\text{Ca}_{10-x}\text{H}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-x}$, wobei x von 0 bis 2 variieren kann, was zu Ca/P-Verhältnissen zwischen 1,33 und 1,67 führen kann [Blumenthal et al. 81].

Amorphe Calciumphosphate lassen sich durch Fällung im pH-Bereich von 6,6 bis 10,6 herstellen. Die molaren Ca/P-Verhältnisse bewegen sich zwischen <1,3 (bei niedrigen pH-Werten) und über 1,7 (bei hoher Übersättigung) [Posner & Betts 75]. Werden die ACPs vor dem Trocknen gewaschen, so liegt das Ca/P-Verhältnis bei 1,50. Waschen senkt also den prozentualen Anteil von Phosphat, welches als HPO_4^{2-} okkludiert zwischen den Partikeln vorliegt. Durch die sehr geringe Korngröße und die Eigenschaft des ACPs zu sintern, sind auch okkludierte Wassermengen von 20%, welche auch im Vakuumexsikkator nicht entfernbar sind, keine Seltenheit. Wegen der Ähnlichkeit des molaren Ca/P-Verhältnisses von 1,5 zu TCP wird oft eine amorphe TCP-Phase (ATCP) postuliert. Das ACP ist stabiler, wenn es in Lösungen mit höherem pH-Wert, höherer Ionenstärke oder sehr hoher Ca^{2+} -Konzentration, gemessen an der HPO_4^{2-} -Konzentration hergestellt wird. Als Kristallisationsinhibitoren zur Stabilisierung der amorphen Phase dienen Mg^{2+} , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ oder CO_3^{2-} -Ionen [Termine et al. 70]. Die Röntgenpulverdiffraktogramme in Abbildung 3.10 zeigen Apatite verschiedener Kristallinität. ACP, welches durch schnelle Fällung in alkalischem Milieu aus einer moderat übersättigten Lösung hergestellt und schnell abfiltriert wurde (A), zeigt kein erkennbares Röntgenbeugungsmuster. Es sei an dieser Stelle vermerkt, daß all die apatitischen Produkte, die ein solches Röntgenpulverdiffraktogramm zeigen, als „amorph“ bezeichnet werden. Ein treffenderer Begriff wäre „röntgenamorph“.

Wird das ACP nicht schnell genug von der Flüssigkeit (Mutterlauge) durch schnelles Filtrieren befreit, entstehen nanokristalline Fällungsprodukte bzw. Defektapatite, wie das Beugungsmuster B in Abb. 3.10 zeigt. Hier ist schon eine geringe Kristallinität mit einer Vorzugsorientierung in (002)-Richtung erkennbar. Der (002)-Reflex ist bei HAP immer der erste, der bei beginnender Kristallisation erkennbar ist. Die *Konversion* oder Hydrolyse des ACPs hin zu nichtstöchiometrischen Defektapatiten erfolgt sowohl in Lösung innerhalb weniger Stunden als auch im festen Zustand innerhalb einiger Monate [Puech et al. 82]. Die Konversion von ACP wurde im einzelnen sehr genau untersucht und als Reaktion, die einer Kinetik erster Ordnung folgt, erkannt. Die Konversion erfolgt in drei Phasen, wobei zunächst eine langsame Induktionspe-

riode erfolgt, bei der nur geringe Änderungen der Kristallinität beobachtbar sind. In der zweiten, der Konversionsperiode steigt die Kristallinität gemessen an der Zeit relativ schnell an. Als letztes erfolgt eine Abklingperiode, wo nur noch geringe Änderungen der Kristallinität beobachtbar sind. Eine Steigerung des pH-Werts bringt dabei eine Steigerung der Konversionszeit mit sich [Boskey & Posner 73].

Die Feststoffkonzentration ist ein entscheidender Faktor bei der Konversion. Je mehr festes ACP in wässriger Lösung vorhanden ist, desto mehr PO_4^{3-} ist in der Lösung meßbar. Je mehr HAP gebildet wird, desto höher ist die Phosphat-Konzentration im Wasser. Während der Konversion sinkt außerdem das gemessene Ca/P-Verhältnis in der Mutterlauge. Bei niedrigerer Feststoffkonzentration bildet sich ein apatitisches Produkt, dessen analytische Werte wesentlich näher an der stöchiometrischen Formel für HAP liegen. Mit sinkendem Ca/P-Verhältnis steigt die Menge an HPO_4^{2-} an, welches durch Erhitzen und die daraus folgende Entstehung von Pyrophosphat (siehe Kapitel 3.3.1) quantitativ analysiert werden kann. Die Triebkraft für die Konversion und die Reifung der Defektapatite in Wasser ist die größere Löslichkeit der apatitischen Produkte mit niedrigem Ca/P-Verhältnis [Blumenthal et al. 81]. Höhere Kristallinitäten von HAP erhält man durch langsamere Fällung, beispielsweise mittels Tropftrichtern über mehrere Stunden aus warmer Lösung. Um die Kristallinität noch weiter zu steigern, empfiehlt sich Erhitzen auf 900°C über Nacht (Abb. 3.10 D).

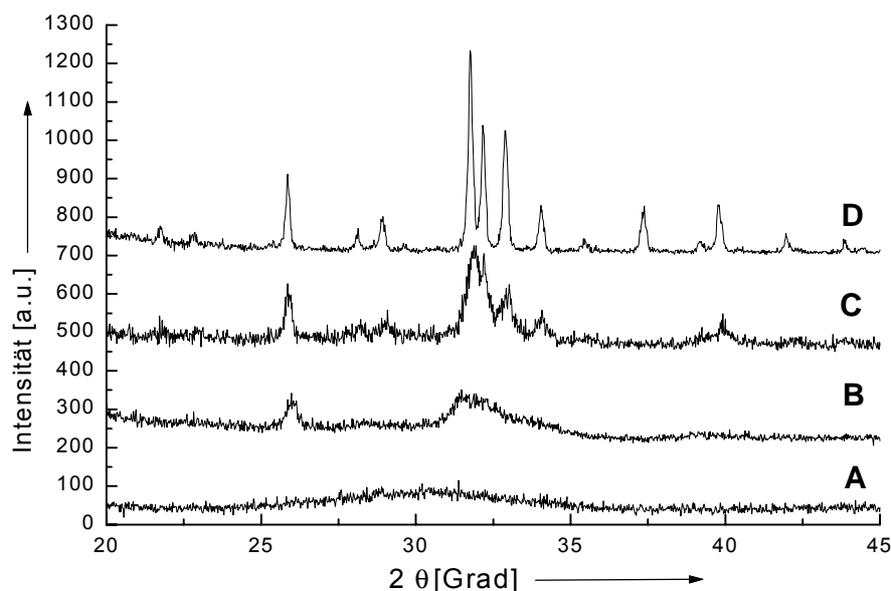


Abb. 3.10: Röntgenpulverdiffraktogramme von Apatiten verschiedener Kristallinität. A: ACP, hergestellt durch schnelle Fällung aus einer moderat übersättigten Lösung, B: nanokristalliner Apatit, hergestellt durch schnelle Fällung aus einer übersättigten Lösung und Alterung in Wasser, C: Hydroxylapatit, hergestellt durch langsame Fällung, D: Kristalliner HAP, hergestellt durch langsame Fällung und Sintern bei 900°C über Nacht.

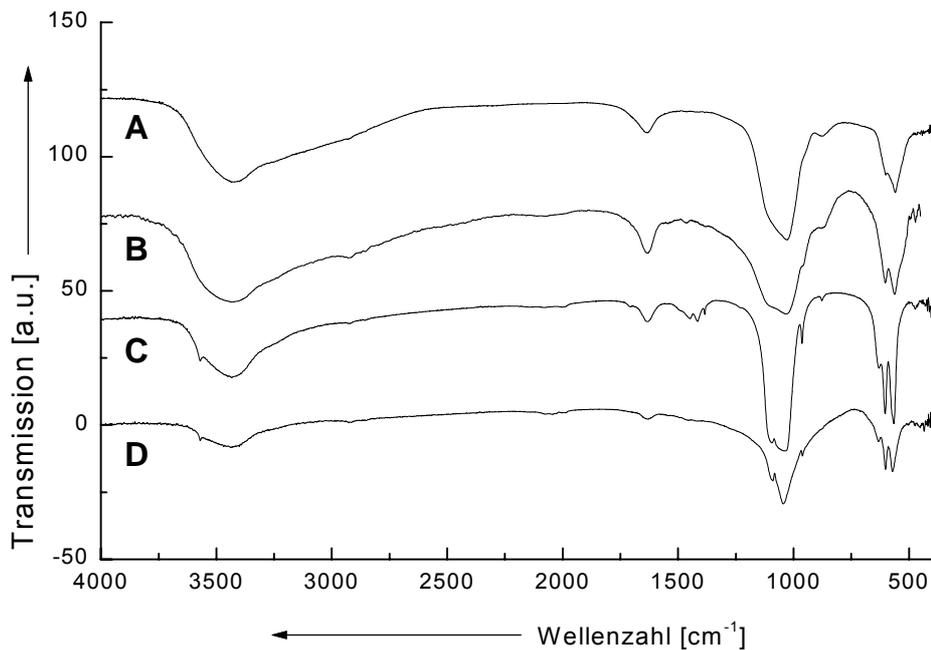


Abb. 3.11: FTIR-Spektren von A: Amorphen Calciumphosphat, B: nanokristallinen Apatit, C: HAP höherer Kristallinität, D: gesinterter Apatit

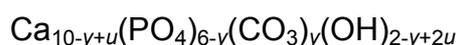
Die Infrarot-Spektren von amorphen Calciumphosphaten zeigen breite, diffuse Phosphat-Absorptionsbanden. Dieser Charakter ist von einem amorphen Material zu erwarten, denn die Ionen sind nicht in einer regulären Position plaziert, wie in einem kristallinen Material in einer Gitterstelle. Somit ist das IR-Spektrum eines ACPs ähnlich dem eines Phosphat-Ions in Lösung. Wie dort fehlt auch bei den ACPs die symmetrische P-O Streckschwingung (ν_1) bei 960 cm^{-1} , welche im freien Ion IR-inaktiv ist (Abb. 3.11 A und B). Bei steigender Kristallinität erfolgt zunächst eine Aufspaltung der antisymmetrischen P-O Bindungsschwingung (ν_4) im Bereich von 550 bis 600 cm^{-1} . Diese Aufspaltung ist früher erkennbar als das Auftauchen des diskreten (002)-Reflexes in der Röntgenbeugung. Daher wurde der sogenannte „Aufspaltungsfaktor“ (englisch *splitting factor*) schon früh zur Quantifizierung der Kristallinität eingesetzt [Termine & Posner 66] [Blumenthal et al. 75]. In Apatitphasen höherer Kristallinität nehmen dann auch die P-O Schwingungsbanden (ν_3) im Bereich von 1030 bis 1100 cm^{-1} an Schärfe zu.

3.3.4 Carbonatapatite

Synthetische Carbonatapatite kommen in zwei verschiedenen Formen vor, die unter sehr unterschiedlichen Bedingungen hergestellt werden. Der A-Typ (OH⁻-Ionengitterplätze sind durch CO₃²⁻-Ionen ersetzt) wird unter trockenen Bedingungen bei hohen Temperaturen hergestellt (Erhitzen von Hydroxylapatit im CO₂-Strom) und führt zu einem hochkristallinen Material, während sich der B-Typ (CO₃²⁻ ersetzt PO₄³⁻-Ionen) bei Fällung oder durch Hydrolyse in wässrigen Systemen bildet und zu kleineren Kristalliten führt [Gassmann 28] [Romo 54] [LeGeros 94].

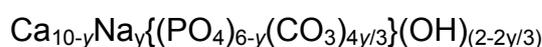
Der Effekt auf das Kristallgitter der Apatite hängt vom Typ der Substitution ab. Der A-Typ führt zur Expansion der *a*- und zur Kontraktion der *c*-Achsendimensionen. Der B-Typ verursacht Kontraktion der *a*- und Expansion der *c*-Achsendimension [LeGeros 65] [LeGeros 68].

Durch den wesentlich geringeren Carbonatgehalt und die kleineren Kristallgitterdimensionen des B-Typs ist es schwieriger, diese Substanz genauer zu charakterisieren. Die Substitution des tetraedrischen PO₄³⁻-Ions durch das trigonal planare CO₃²⁻-Ion führt sowohl zu Gitterfehlstellen und Gitterstörungen, als auch zu neuen Ladungssituationen. Diverse Modelle wurden diskutiert, um das Problem der fehlenden negativen Ladung bei der Substitution von PO₄³⁻ durch CO₃²⁻ zu lösen. Eine der ersten Modelle war das von Kühl und Nebergal, die folgende Formel postulierten:



mit $0 < y < 2$ und $0 < 2u < y$ [Kühl & Nebergal 63]. In diesem Modell wird angenommen, daß wenn ein Phosphation durch ein Carbonation ersetzt wird, damit eine Ca²⁺- und eine OH⁻-Fehlstelle erzeugt werden. Eine Anzahl *u* dieser Fehlstellen muß besetzt werden. Dieses Modell ist allgemein für gefällte Carbonatapatite anerkannt.

Nach Untersuchungen von Fällungen in natriumhaltigen Lösungen wurde folgendes Substitutionsmodell postuliert [Nelson & Featherstone 82]:

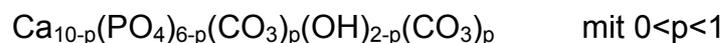


Es wurde in all diesen Experimenten beobachtet, daß bei niedrigen Carbonatgehalten die A-Position Carbonationen beinhalten kann, aber in keiner dieser Theorien wurde diese Beobachtung in das Substitutionsmodell einbezogen. Ein gemischter AB-Mechanismus wurde von [Driessens et al. 83] postuliert. Diese Autoren berichteten über Hochtemperatur-AB-Typ Carbonatapatite, wo eine geringe Menge Carbonat auf den A-Positionen eingelagert wird und drei PO_4^{3-} -Ionen durch drei CO_3^{2-} -Ionen und zwei Calcium-Fehlstellen ersetzt wurden. Es wurde folgende Formel des AB-Typs aufgestellt:

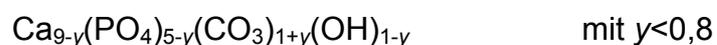


Zunächst zeigt sich tatsächlich bei gefällten Carbonatapatiten ein Steigen der *a*-Achsendimension um ca. 3%, was einem Carbonation auf 2 Einheitszellen entspricht. Mit steigendem Carbonatgehalt werden mehr und mehr die B-Positionen besetzt. Übersteigt der Carbonatgehalt ungefähr 6% (Ein Carbonation pro Einheitszelle) sinkt die *a*-Achse monoton mit steigendem Carbonatgehalt. Die Tatsache, daß ein A-Typ bei diesen geringen Carbonatgehalten vorliegt, läßt sich durch das Auftauchen von IR-Absorptionsbanden bei 882 und 1545 cm^{-1} , welche mit steigendem Carbonatgehalt wieder verschwinden, untermauern [Vignoles et al. 88].

Keines dieser Modelle beschreibt zufriedenstellend die Resultate, die für gefällte Carbonatapatite gefunden wurden. Daher wurde ein weiteres AB-Typmodell eingeführt [Barralet et al. 98]. Hierbei werden zunächst die A- und B-Stellen simultan substituiert:



Da auch bei Carbonatapatiten mit hohem Carbonatgehalt mittels Infrarot-Spektroskopie Hydroxylgruppen beobachtet wurden, wurde postuliert, daß die Substitution der A-Stellen vorher beendet wird. Ab $p=1$ erfolgt die weitere Substitution nach dem Modell von Kühl und Nebergal:



Die Störungen des Kristallgitters wurden in natriumhaltigen Lösungen untersucht. Dabei zeigte sich, daß die OH⁻-Position in der Apatitstruktur signifikant gestört wird. Die Hydroxylgruppe wird mit steigender Na⁺- und CO₃²⁻-Substitution aus der trigonalen Calcium-Ebene hinausgedrängt. Dies wird erwartet, denn der Einfluß von Na⁺ auf die Hydroxylionen ist geringer als der von Ca²⁺. Somit senkt eine Steigerung der Menge an Natrium die Einflüsse der umgebenden Metallionen und die korrespondierenden Abstände steigen. Die Phosphatgruppe wird durch die Carbonatsubstitution stärker gestört. Die P-O Abstände sinken mit steigendem Carbonatgehalt. Weiterhin wird der Tetraederwinkel des PO₄³⁻-Ions geringfügig hin zu kleineren Werten verformt [El Feki et al. 00].

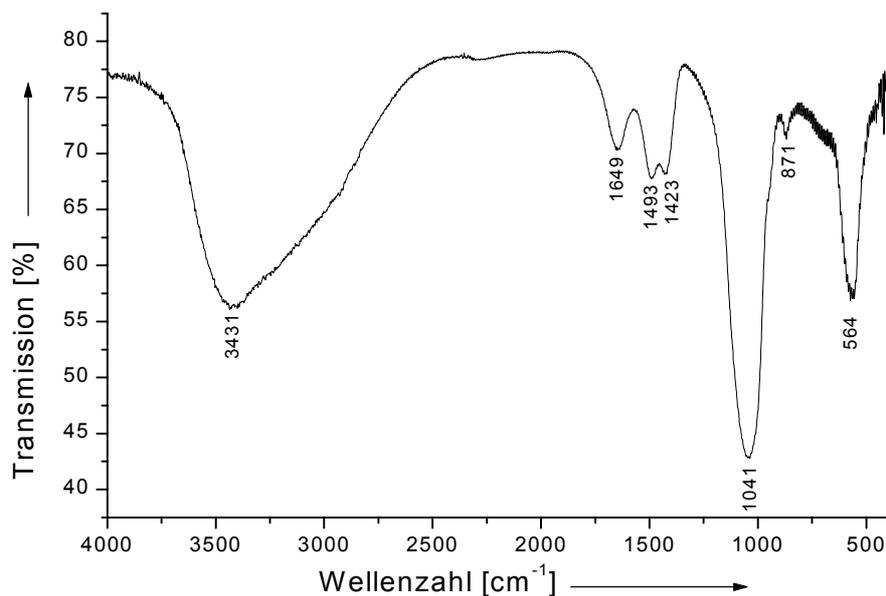


Abb. 3.12: Infrarot-Spektrum eines Carbonatapatits vom B-Typ.

Im Infrarot-Spektrum eines Carbonatapatits sind die C-O Schwingungen deutlich zu erkennen. Neben der starken P-O Streckschwingung bei 1041 cm⁻¹ zeigen sich zwei C-O Streckschwingungen bei 1423 und 1493 cm⁻¹ (ν_3). Bei 871 cm⁻¹ findet man eine C-O Bindungsschwingung (ν_2). Die Tatsache, daß im selben Bereich auch eine P-O(H) Streckschwingung zu finden ist, erschwert die Identifikation von sauren HPO₄²⁻-Gruppen, beispielsweise bei Untersuchungen von Knochenproben, welche ebenfalls aus Carbonatapatit bestehen. Die ν_1 C-O Schwingung ist nicht beobachtbar, da sie von der ν_3 P-O Streckschwingung verdeckt wird [El Feki et al. 00], [LeGeros 68]. Bei Carbonatapatiten mit hohem Carbonatanteil finden sich noch schwache Absorptions-

banden im Bereich von 670 bis 750 cm^{-1} , welche der ν_4 C-O Streckschwingungen zugerechnet werden können [El Feki et al. 91].

Präparativ zeigte sich, daß, wenn bei niedrigen pH-Werten gearbeitet wird, der Wettbewerb zwischen den CO_3^{2-} - und OH^- -Ionen um die „Kanalpositionen“ im Apatitgitter größer ist. In basischem Milieu werden wesentlich mehr OH^- -Ionen eingebaut. Nach dem AB-Modell, welches Vakanzen beinhaltet, konnte unter nahezu pH-statischen Bedingungen (Zugabe von NH_3 während der Reaktion) eine Substitution von PO_4^{3-} durch $[\text{CO}_3^{2-}, \text{OH}^-]$ beobachtet werden. Ließ man den pH-Wert des Reaktionsgemisches dagegen unbeeinflusst von außen, wurden mehr PO_4^{3-} -Positionen durch $[\text{CO}_3^{2-}, \square]$ substituiert. Stellt man Carbonatapatite mit der sogenannten „direkten Methode“ her, d.h. eine Ca^{2+} -Lösung wird langsam in eine $\text{PO}_4^{3-}/\text{CO}_3^{2-}$ -Lösung getropft, entstehen mehr Vakanzen, als wenn man nach der „indirekten Methode“ arbeitet, wobei die $\text{PO}_4^{3-}/\text{CO}_3^{2-}$ -Lösung in die Ca^{2+} -Lösung getropft wird. Dies läßt sich dadurch erklären, daß bei der direkten Herstellungsweise das Fällungsprodukt in einem calciumarmen Milieu entsteht. Entstehen Vakanzen des Typs $[\text{CO}_3^{2-}, \square]$, so entsteht ebenfalls eine Ca^{2+} -Vakanz. In einem Medium, welches wenige Calciumionen beinhaltet, kann man mehr Calcium-Vakanzen erwarten. In einem calciumreichen Medium dagegen ist dies nicht der Fall und somit treten auch weniger Vakanzen bei der Phosphat-Substitution auf [Vignoles et al. 88].

4. Biomineralisation

4.1 Biominerale

Von den 20 bis 25 wesentlichen Elementen, die von lebenden Organismen eingesetzt werden, sind Wasserstoff, Kohlenstoff, Sauerstoff, Magnesium, Silicium, Phosphor, Calcium, Mangan und Eisen diejenigen, die in Biomineralien am häufigsten vorkommen. Die hauptsächlich mineralisierten Gewebe, wie Knochen und Zähne, bestehen aus Calciumphosphaten oder Calciumcarbonaten in Kombination mit einer äußerst komplexen organischen makromolekularen Matrix aus Proteinen, Polysacchariden und Lipiden. Einfache Überlegungen bezüglich Ionenladung, Größe und Kugelpackung und deren Effekte auf Hydratation und Gitterenergien können die thermodynamische Stabilität dieser Mineralien in biologischer Umgebung erklären. Diese starke thermodynamische Triebkraft fordert eine effektive Kontrolle der Ionenkonzentrationen in biologischen Medien (Homöostase und Detoxifikation), jedoch können auch ungewollte Formen der Biomineralbildung auftreten (z.B. Zahnsteinbildung, Calcifikation in Weichgeweben oder Blutgefäßen).

Biologische Systeme haben hochentwickelte Strategien, um diese thermodynamischen Grenzen auszunutzen. Sie haben im Lauf der Evolution Materialien mit spezifischer Größe, Form, Orientierung, Textur und Organisation synthetisiert und für die jeweilige Anforderung funktionalisiert [Mann 96].

Tabelle 1 zeigt eine kleine Auswahl der Mineralien, die sich die Natur zunutze gemacht hat [Mann 96]. Die Dominanz der Calcium-Mineralie (ca. 50%) läßt sich mit den niedrigen Löslichkeitsprodukten der Carbonate, Phosphate und Pyrophosphate und den relativ hohen Ionenkonzentrationen von Calcium in extrazellulären Fluiden (10^{-3} M) erklären. Magnesiumsalze sind generell leichter löslich; durch seine bekannte Wirkung als Inhibitor spielt Mg eine wichtige Rolle bei der Beeinflussung der Struktur von Calciumcarbonaten und Calciumphosphaten [Salimi et al. 84]. Andere Ionen können beispielsweise die Löslichkeit von Hydroxylapatit stark beeinflussen (siehe Kapitel 3).

Bei näherer Betrachtungsweise der bekannten biogenen Materialien zeigt sich weiterhin, daß etwa 20% davon amorph sind (unter "amorph" werden all die Mineralien

bezeichnet, die kein differenzierbares Röntgenbeugungsmuster ergeben und die breite Infrarot-Absorptionsbanden aufweisen). Es ist anzunehmen, daß diverse amorphe Mineralien aus diesen meßtechnischen Gründen noch nicht detektiert worden sind. Weiterhin fällt auf, daß ca. 60% aller bekannten biogenen Mineralien Hydroxylgruppen und/oder gebundene Wassermoleküle beinhalten. Dies rührt daher, daß viele Organismen die Möglichkeit entwickelt haben, relativ leicht lösliche Phasen zu bilden, die mit geringem Energieaufwand wieder gelöst werden können [Lowenstam & Weiner 89].

<i>Formel</i>	<i>Mineral</i>	<i>Organismus</i>	<i>Stelle/Funktion</i>
CaCO ₃	Calcit ¹	Algen	Exoskelett
		Vögel	Eierschale
		Trilobiten ²	Augenlinse
	Aragonit	Mollusken ³	Exoskelett
		Fische	Gleichgewichtssensor
	Vaterit	Gastropoden ⁴	Muschel, Exoskelett
Amorph	Pflanzen	Ca-Speicher in Blättern	
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Hydroxylapatit	Säugetiere	Knochen, Endoskelett, Zähne
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ F ₂	Fluorapatit	Haie	Zähne
Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆	Octacalciumphosphat	Säugetiere	Knochen, Zähne, Precursor-Phase ?
		Gastropoden	Magenplatten, Zermalmung
?	Amorphes Calciumphosphat	Säugetiere	Precursor-Phase in Knochen ?
SiO ₂ · n H ₂ O	Kieselsäure	Algen	Exoskelett
Fe ₃ O ₄	Magnetit	Bakterien	Magnetotaktik ⁵

Tabelle 3.1: Arten und Funktionen einiger Biominerale. ¹Eine Reihe von Mg-substituierten Calciten sind ebenfalls bekannt. ²Trilobiten (griechisch "Dreilapper"), ausgestorbene meeresbewohnende, krebbsartige Gliederfüßler. ³Mollusken=Weichtiere. ⁴Gastropoden=Schnecken. ⁵Magnetotaktische Bakterien orientieren sich nach dem Erdmagnetfeld

Ca. 25% aller bekannten biogenen Mineralien beinhalten Phosphate. Das apatitische Kristallgitter ist zum einen sehr variationsreich, zum anderen sind die Calciumphosphate Fremddionen sehr leicht zugänglich. So bilden Calciumphosphate mit einer großen Anzahl von Fremddionen wie Na⁺, F⁻, CO₃²⁻ Defekt- und Mischstrukturen, so daß der Ausdruck "Hydroxylapatit" für ein biogenes Calciumphosphatmineral nicht mehr sein kann als ein verallgemeinernder Begriff. Er beschreibt lediglich das apatitische Röntgenpulverdiffraktogramm, berücksichtigt aber nicht, ob vielleicht auch partiell

Carbonat (Carbonatapatit, Dahllit) oder Fluorid (Fluorapatit) in das Gitter inkorporiert sind (siehe Kapitel 3).

4.2 Stufen der Biomineralisation

Keimbildung und Kristallwachstum sind Vorgänge, die in einem übersättigten Medium auftreten und die bei einem gezielten Mineralisationsprozeß kontrolliert werden müssen. Diese Voraussetzungen können im Organismus durch Transportmechanismen sowie durch Beeinflussung der Oberflächenreaktivität geschaffen werden [Kaim & Schwederski 91].

Zellulär läßt sich der Vorgang der Biomineralisation folgendermaßen beschreiben [Volkmer 99]: Im äußeren Medium gelöste anorganische Komponenten werden über Membranpumpen in das Zellinnere transportiert. Um eine spontane Kristallisation zu verhindern, werden die Mineralbildner zunächst räumlich getrennt angereichert (Speichervesikel) und/oder über die Bindung an Proteine maskiert. Parallel zur Anreicherung der anorganischen Komponente beginnt die Biosynthese der organischen Mineralisationsmatrix, die aus Makromolekülen (Polypeptide, Polysaccharide) aufgebaut ist. Die Mineralisationsmatrix und die anorganischen Komponenten werden in einem weiteren Schritt in einem speziellen Mineralisationskompartiment (Vesikel, deren grenzflächenaktive Bestandteile mit dem anorganischen Mineral wechselwirken können) synthetisiert. Die Organisationsstrukturen der Biomineralisation, die bei der Formgebung und der Ausbildung hochgeordneter Strukturen eine Rolle spielen, lassen sich grob in vier Stufen unterteilen [Mann 96]:

1. Supramolekulare Vororganisation

Vor der eigentlichen Mineralisation wird eine organische Matrix konstruiert, wodurch der Ort und der Größenbereich der Mineralisation festgelegt wird. An die Matrix, die meist aus hydrophoben Makromolekülen (Proteinen und Lipiden) besteht, lagern sich hochgeladene hydrophile Proteine an. Die Mineralisation findet dann an der Grenzfläche Proteine/Lipide und der wässrigen Umgebung (intra- oder extrazellulär) statt.

2. Molekulare Erkennung

In dieser Stufe wird von den hochmolekularen Strukturen der ersten Stufe ein Netzwerk für das selbstorganisierende Ansammeln der anorganischen Phase geschaffen. Diese vororganisierte Architektur dient dann als "Blaupause" für eine ortsgerichtete anorganische Keimbildung. Es wird allgemein vermutet, daß das Anlagern der Kristallkeime durch elektrostatische, strukturelle und stereochemische Faktoren beeinflusst wird. Die organische Oberfläche kann beispielsweise durch Epitaxieeffekte (geometrische Ähnlichkeit zwischen dem Abstand der funktionellen Gruppen und den Kationen im Kristall) den Kristall in eine Modifikation zwingen. Muschelproteine sind reich an sauren Aspartat-Resten und es zeigt sich eine hohe geometrische Übereinstimmung zwischen den Aspartat-Resten entlang der β -Faltblatt-Struktur und den Ca-Ca-Abständen der (001)-Oberfläche von Aragonit [Mann 95]. So konnte auch gezeigt werden, daß auf Gold beschichtete, regelmäßig angeordnete selbstorganisierte Monoschichten (SAM = "*self assembled monolayers*") von organischen Substanzen mit funktionellen Carboxylat-Endgruppen je nach Orientierung und Habitus der Monolage die Kristallisation von Calciumcarbonat zu Calcit oder Aragonit dirigieren können. Dabei wurde gezeigt, daß die Ähnlichkeit der gemessenen Abstände zwischen den funktionellen Endgruppen der Monolage und den Ca-Ca-Abständen in der jeweiligen Calciumcarbonat- und Calciumphosphat-Phase eine gewichtige Rolle spielen [Küther et al. 98] [Küther et al. 98-2] [Küther et al. 98-3].

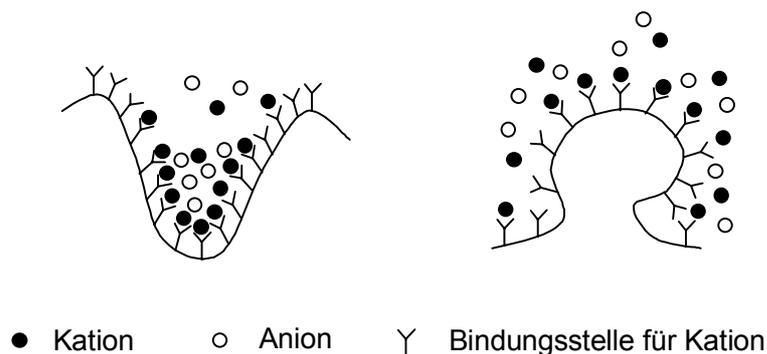


Abb. 4.1: Anordnung von funktionellen Gruppen auf zwei Matrices, die organische Blaupausen bilden, die sich in ihrer Topographie unterscheiden.

Das spezifische Senken der Keimbildungsenergie zeigt den Bedarf nach strukturellen und stereochemischen Ähnlichkeiten zwischen der anorganischen und organischen Oberfläche.

3. Vektorielle Regulation

Ohne weitere Einwirkung der Biomoleküle wachsen die Kristalle entsprechend kristallographischen Gesetzen. Dabei wird ihre Form und Größe nur begrenzt durch den zur Verfügung stehenden Raum und das Angebot an Ionen, die zur Kristallisation notwendig sind. Jeder Kristall hat Vorzugsrichtungen, an denen er schneller wächst als an anderen (siehe Abb. 2.3). Ein Organismus hat mehrere Möglichkeiten, dieses Richtungswachstum zu beeinflussen. So beeinflussen bereits recht einfache Chemikalien im Wachstumsmedium die Struktur der entstehenden Minerale. So unterdrückt z.B. die Zugabe von Magnesium die Bildung von Calcit, so daß sich das thermodynamisch weniger stabile Aragonit bilden kann [Addadi & Weiner 92]. Andere lösliche Proteine, die in Austern gefunden wurden, dirigieren das Calcit- oder Aragonitwachstum [Smith 98]. Diskutiert wird auch die Möglichkeit, daß der Ionenfluß nur an ganz spezifischen Stellen stattfindet (gesteuert beispielsweise durch die Änderung der Viskosität des Mediums [Mann 97]), so daß nur diese Stellen des Kristalls weiter wachsen können [Mann 95] [Volkmer 99]. Zu diesem Thema siehe auch Kapitel 2.8 (Inhibition).

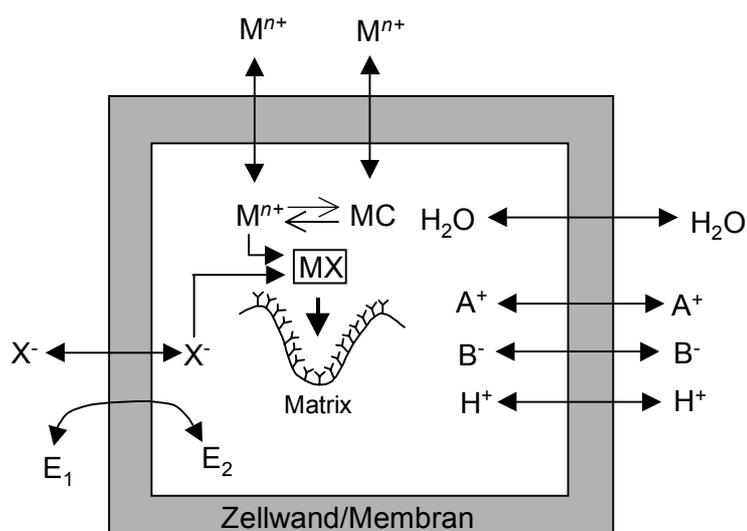


Abb. 4.2 Generelle Vorgehensweise zur Kontrolle der Übersättigung in Biomineralisationsvorgängen. Die Mechanismen können direkt (Membranpumpen, Komplexbildung, enzymatische Regulation) oder indirekt (Wasser-, Protonen-, Ionenfluß) wirken. M^{n+} - Metallkationen; X^- - Anionen; MC - Kationkomplexe; E_1 , E_2 - Enzyme; MX - Biomaterial; A^+ , B^- - andere Ionen.

Als weitere Kontrollmechanismen gelten außerdem Änderung des pH-Werts, Komplexierungsreaktionen und enzymatische Aktivität. Die Veränderung des Habitus und der physikalischen Eigenschaften vieler Biominerale resultiert aus der kontrollierten Einlagerung bestimmter Makromoleküle durch Adsorption an bestimmten Kristallflächen, welches das Kristallwachstum der anderen Kristallflächen begünstigt (siehe auch Kap. 2.8.1.2). Die eingelagerten Makromoleküle können auch überwachsen werden und somit die Bindungsenergie erhöhen. Dabei wird der Zusammenhalt der anorganischen Schichten in dieser Richtung erhöht und somit die Bruchfestigkeit gesteigert. Die geeignete räumliche Anordnung von Ionenpumpen kann ebenfalls zur Wachstumssteuerung eingesetzt werden [Busch 98].

4. Ausbildung hochgeordneter Strukturen

Makroskopisch organisierte Architekturen, wie Knochen, Schalen und Zähne sind mit ausgedehnten Zellsystemen verbunden und ihre hierarchischen Strukturen produzieren Kompositmaterialien, welche im Beispiel des Knochens durch aktive Zellprozesse, initiiert durch mechanische Beanspruchung, umgebaut (*remodelt*) werden (als "*remodeling*" bezeichnet man den Umbau des Knochengerüsts).

Bei der Ausbildung von Calcit-Einkristallen in Größe einiger Zentimeter, wie beim Seeigelstachel beobachtet, handelt es sich um die Zellwandfusion vieler Zellen, wobei dann ein sehr großer Vesikel gebildet wird, in dessen Innenraum ein einzelner Calcitkristall heranwächst. Das Koppeln der Biomineralisation mit intrazellulärer Kommunikation führt also zur Organisation und Funktionalisierung im makroskopischen Bereich.

4.3 Aufbau von Knochen

Knochen ist der bei Säugetieren am weitesten verbreitete Kompositwerkstoff. Das Skelettsystem dient nicht nur der Stützung des Körpers, sondern auch als ein Ionenreservoir. Knochen besteht allgemein aus ca. 70% Mineralphase (Calciumphosphate), welche für die Härte und Bruchfestigkeit des Materials verantwortlich ist, und zu 30% aus organischen Bestandteilen, wobei vor allem das Kollagen zu nennen

ist. Diese organische Komponente zeigt sich verantwortlich für die Zug- und Biegefestigkeit des Kompositwerkstoffs. Gemessen an dem Materialbedarf, dem Gewicht und den resultierenden mechanischen Eigenschaften, handelt es sich um ein hochgradig optimiertes Material. Um den Aufbau des Knochens zu verstehen, bietet sich ein hierarchisches Modell mit verschiedenen Organisationsstufen an. Der unterste Grad der Organisation beinhaltet den Aufbau des Kollagens und des Knochenminerals sowie die Interaktion zwischen beiden.

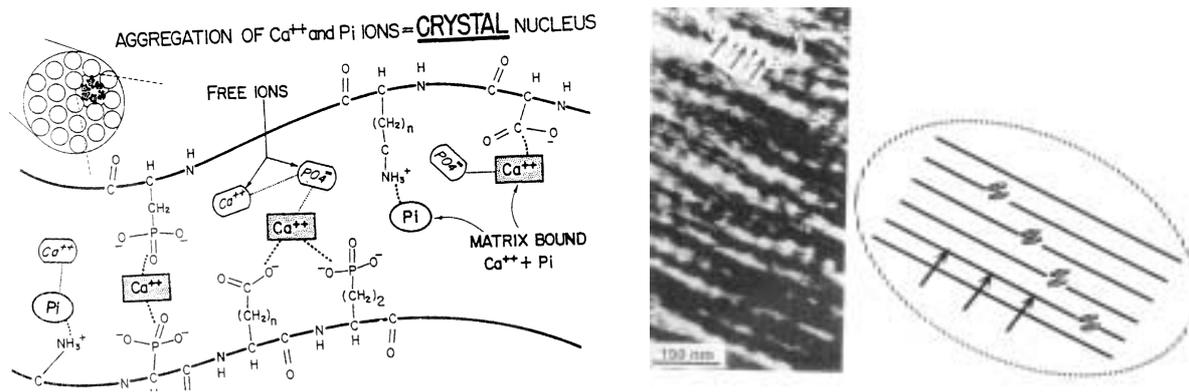


Abb. 4.3: Die Kollagenfibrillen sind zu größeren Einheiten geordnet. Innerhalb einer Fibrille sind die Apatitkristalle an funktionelle Endgruppen des Kollagens gebunden (links). Insgesamt bildet die Grenzschicht Kollagen-Apatit eine hochgeordnete Einheit (rechts) aus [Mann 96].

Wie in Abbildung 4.1 aufgezeigt, bildet die organische Matrix das Mineralisationskompartiment für die Biomminerale. Gebunden an saure Phosphat- und Carboxylat-

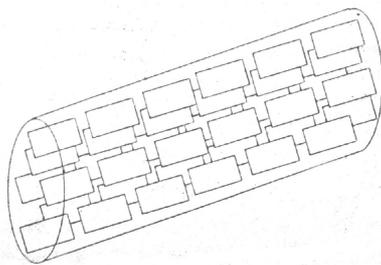


Abb. 4.4: Anordnung der Mineralpartikel in den Kollagenfibrillen. Aus [Weiner et al. 97]

Endgruppen (Abb. 4.3 links) ist das Calciumphosphat im Knochen blättchenförmig auskristallisiert. Die Kristalle wachsen so, daß die kristallographische c-Achse parallel mit der Fibrillenachse verläuft. Die Mineralpartikel sind in den 40 nm breiten Zwischenräumen (den „gaps“) zwischen den Kollagenfibrillen hochorganisiert angeordnet (Abb. 4.4). Die Kristalle sind nur wenige Elementarzellen groß und somit die kleinsten biologisch gebildeten Kristalle, die bekannt sind [Weiner & Addadi 97].

Eine einzelne Kollagenfibrille (Kollagen Typ I) hat einen Durchmesser von ungefähr 1.5 nm, eine Länge von 300 nm und besteht aus drei Polypeptidketten, die etwa 1000 Aminosäureeinheiten lang sind. Diese sind in einer Tripelhelix gewunden

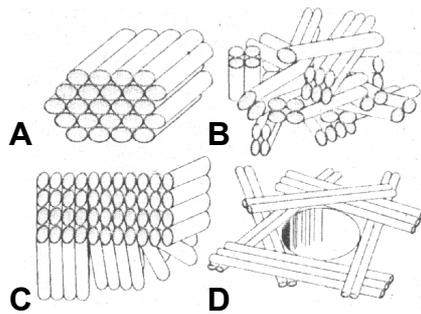


Abb. 4.5: Anordnungen der Kollagenfibrillen im nächsthöheren Organisationslevel. A: parallel, B: Callusknochenstruktur, C: Sperrholzstruktur, D: radiale Anordnung. Aus [Weiner & Wagner 98]

[Weiner & Wagner 98]. In der nächsthöheren Stufe wird Fernordnung (Zehntelmilimeter-Bereiche) der einzelnen mineralisierten Kollagenfibrillen beschrieben (Abb. 4.3 links oben, Abb. 4.5). Die einzelnen Fibrillen ordnen sich zu Segmenten höherer Ordnung zusammen, wobei die „gaps“ gegeneinander versetzt angeordnet sind. In *Callusknochen* (engl. *woven bone*, neugebildeter, wachsender Knochen, z.B. nach einem Knochenbruch) zeigen die Kollagenfibrillen eine geringe Ordnung und zufällige Verteilung. In *lamellaren Knochen* sind die Kollagenfibrillen über große Distanzen flächenförmig angeordnet. Diese können (beispielsweise in der Tibia, nahe zur Knochenhaut, dem *Periost*) parallel entlang der Längsachse des Knochens angeordnet sein (engl. *parallel fibered bone*). Oder diese Flächen mit einer durchschnittlichen Dicke von 3 μm sind um 90° gegeneinander versetzt. Gleichzeitig sind auch die Mineralpartikel um die Fibrillenachse verdreht. Daraus resultiert eine Struktur, wie sie bei Sperrholz zugrundegelegt ist (daher englisch: *plywood structure*). Dies führt zu einer guten Stabilität des Materials. Die Grenzstruktur zwischen den Lamellen ist noch nicht aufgeklärt [Ziv et al. 96]. Die Bereiche paralleler Kollagenfibrillen können auch in regelmäßigen Winkeln (30°) gegeneinander verdreht auftreten. Diese Struktur wird, im Gegensatz zur orthogonalen Sperrholz-Struktur als „verdrehte Sperrholz-Struktur“ (*rotated plywood structure*) bezeichnet [Weiner et al. 97].

Die nächste Stufe der Organisation umfaßt die Strukturen, die in Bereichen von Millimetern angeordnet sind. Hierbei werden weitere vier Bereiche unterschieden. *Haversische Systeme* sind Folge der Eigenschaft des Knochengewebes, sich vollständig zu regenerieren. Sie entstehen erst, nachdem sich der eigentliche Knochen vollständig gebildet hat. Osteoklasten (Knochenfresszellen) resorbieren den Knochen lokal, so daß neue Blutgefäße einwachsen können (Haverssche Kanäle). In einer zellulären Folgereaktion wird von Osteoblasten (knochenbildende Zellen) schichtweise wieder neuer, lamellarer Knochen gebildet, der konzentrisch um das Blutgefäß angeordnet ist. Es entsteht ein sogenanntes *sekundäres Osteon* [Lowenstam & Weiner 89]. Weiterhin wird zwischen vernetzten, lamellaren und fibrolamellaren Struktu-

ren (lamellarer Knochen, der auf eine Schicht paralleler Knochenfasern aufgewachsen ist) unterschieden.

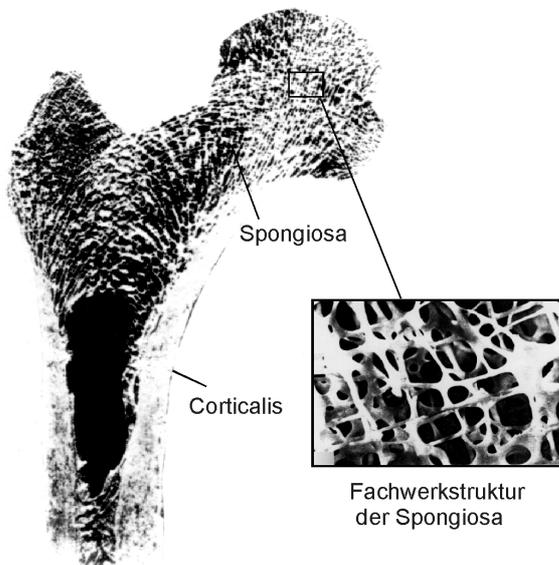


Abb. 4.6: Querschnitt durch einen Femurkopf (Oberschenkelknochen). Aus: [Nackenhorst & Schröder 96]

Die vierte Stufe beinhaltet die makroskopisch sichtbaren Überstrukturen im Zentimeterbereich. Hierbei wird unterschieden zwischen der *Corticalis* (kompakter Röhrenknochen außen, auch *Compacta* genannt) und der *Spongiosa* (schwammartiger Knochen in der Innenseite eines Knochens). Es ist zwischen beiden kein Übergang erkennbar (Abb. 4.6). Außen ist der Knochen umgeben von der Knochenhaut, dem *Periost*.

4.4 Zusammensetzung des Knochenminerals

Die Mineralphase von Knochen und Zähnen besteht aus Carbonatapatit, dem Dahllit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_2$). Zur Problematik der Stöchiometrie des Carbonatapatits siehe Kapitel 3.3.4). Der Carbonatgehalt beträgt ca. 4-6%, weitere Inhaltsstoffe sind Citrat (0,9%), Mg^{2+} (0,5%), Na^+ (0,7%) und Spuren von F^- , K^+ , Sr^{2+} und anderer Metallionen [Posner & Betts 75]. Apatit ist vielfach substituierbar (siehe Kapitel 3); wenn Fluorid anwesend ist, so wird das Mineral Francolit genannt. Die Kristalle sind schmal, blättchenförmig und unregelmäßig ausgebildet; ihre Ausmaße betragen $500 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA} \times 50 \text{ \AA}$. Die geringe Größe und das Fehlen der Perfektion der kristallinen und chemischen Zusammensetzung machen es schwierig, das Mineral eingehend zu untersuchen. Die Löslichkeit ist ebenfalls durch das Vorliegen des nanokristallinen Defektapatites erhöht. Durch Reaktion mit Wasser steigt langsam die Kristallitgröße an und die stöchiometrische Perfektion nimmt zu (Ostwald-Reifung) [Posner 85]. Aus frühen Röntgenbeugungsuntersuchungen wurde interpretiert, daß das Knochenmineral aus zwei Phasen zusammengesetzt sei, wobei eine Phase aus kleinen HA-ähnlichen Kristallen und die zweite Phase aus amorphem Material bestehen sollte [Blumenthal et al. 75]. Solch eine amorphe Phase wurde als

Intermediat bei der HAP-Fällung aus hochübersättigten Calciumphosphat-Lösungen erkannt. Untersuchungen an Carbonatapatiten ergaben jedoch, daß mit steigendem Carbonatgehalt die Kristallinität sinkt und die Partikelgröße abnimmt [LeGeros 68]. Spätere Untersuchungen ergaben keinen Anhaltspunkt für die Existenz einer amorphen Phase [Grynypas et al. 84]. Das Knochenmineral unterscheidet sich also vom reinen HAP in Zusammensetzung, Kristallitgröße und Stöchiometrie.

Knochenproben verschiedenen Alters zeigen unterschiedlich scharfe Röntgenbeugungsreflexe. Auch nimmt das Ca/P-Verhältnis mit zunehmendem Alter zu: von ca. 1,3 bis ca. 1,66. Das Ca/P-Verhältnis und die Kristallinität wird durch den Carbonatgehalt beeinflusst. Dieser steigt mit dem Alter des Gewebes in dem Maße an, wie die Menge saurer Phosphatgruppen (HPO_4^{2-}) abnimmt [Grynypas 93]. Der Defektapatit, wie er in biologischen Systemen vorliegt, läßt sich verallgemeinernd am ehesten mit der Formel $(\text{Ca,Na,Mg,K,X})_{10}(\text{PO}_4,\text{CO}_3,\text{HPO}_4)_6(\text{OH,Cl,F})_2$ ausdrücken. X steht hier für alle Spurenelemente, deren Gehalt unter 0.1 Gew.-% liegt. Untersuchungen an corticalem Knochen von Ratten und Rindern unterschiedlichen Alters ergaben für beide Spezies die Formel $\text{Ca}_{8,3}(\text{PO}_4)_{4,3}(\text{CO}_3)_x(\text{HPO}_4)_y(\text{OH})_{0,3}$, wobei mit zunehmendem Alter y sinkt und x steigt. Die Summe $(x+y)$ bleibt konstant bei ca. 1.7 [Legros et al. 87]. Wenn synthetischer Carbonatapatit auf 900°C erhitzt wird, so entsteht kristallines HAP und CaO. Werden biologische Apatite auf 900°C erhitzt, so entstehen HAP und β -TCP. Dies beweist die Tatsache, daß saure HPO_4^{3-} -Ionen in das biologische Apatitgitter inkorporiert sind (zur Problematik dieser Interpretation siehe auch Kapitel 7.2.1.3).

Die Gehalte an „Fremdionen“ sind verantwortlich für die Stabilität der biologischen Apatite. Fluorid beispielsweise substituiert die Hydroxylgruppe im Apatitgitter, erhöht dadurch die Stabilität und senkt die Löslichkeit [Grynypas & Cheng 88]. Gleichzeitig senkt Fluorid im Knochenmineral den Citratgehalt und hat weiterhin Auswirkungen auf den Gehalt an Magnesium und Carbonat [Gron et al. 66], [LeGeros 94]. Strontium erhöht die Knochenmasse, da die Kristallitgröße abnimmt. Proportional zum steigenden Strontiumgehalt sinkt der Carbonatgehalt [Grynypas 93]. Als Vorstufen der Knochenminerale wurden außer ACP auch DCPD ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und OCP ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) vermutet [Posner 85], jedoch konnte Artefaktbildung bei der Präparation des Knochenminerals nicht ausgeschlossen werden [Legros et al. 87]. Weiterhin werden die Röntgenbeugungsreflexe bei Knochenproben höheren Alters schärfer, was auf eine langsame Reifung der Kristallite hinweist [Lowenstam &

Weiner 89]. Daraus wurde geschlossen, daß die Kristalle, wie die Konversion von ACP in wäßriger Lösung, durch Kontakt mit der Körperflüssigkeit altern (Kapitel 3.3.3) und dabei die Kristallitgröße und Perfektion ansteigt [Blumenthal et al. 81].

Röntgenkleinwinkelmessungen an jungen Knochen von Ratten und Mäusen wurden dahingehend interpretiert, daß die Knochenkristalle schon in den ersten Stufen der Mineralisation elongiert vorliegen. Im frühen Stadium sollen Monolagen von Apatitkristallen innerhalb der Hohlräume zwischen den Kollagenfibrillen einkristallisieren. Erst wenn diese nanokristallinen Verbindungen vollständig elongiert sind, reifen die Kristalle bezüglich Breite und Höhe aus. Da in den Röntgenkleinwinkelstreuungen keine Überstrukturen gefunden wurden, gehen die Autoren von einer eher zufälligen Verteilung des Knochenminerals im frühen Mineralisierungsstadium aus [Fratzl et al. 91].

FTIR-spektroskopische Beobachtungen zeigten eine ortsgebundene Abhängigkeit der Kristallinität und der Mineralisierung. Bei ortsaufgelösten Messungen von Osteonen zeigte sich eine erhöhte Mineralisierung im Inneren des Osteons. Die erhöhte Mineralisierung geht dabei mit einer niedrigeren Kristallinität und einem erhöhten Carbonatgehalt einher [Paschalis et al. 96]. Eigene Messungen an verschiedenen humanen Knochenproben bestätigten die erhöhte Mineralisierung und den erhöhten Carbonatgehalt von jungem Callusknochen (Siehe Kapitel 6) [Peters et al. 00].

Osteoporotischer Knochen enthält im wesentlichen nur „älteres“ Mineral, die Kristallinität ist in diesem Material signifikant erhöht. Als Grund ist anzunehmen, daß bei Osteoporose zwar der Knochenabbau beschleunigt ist, jedoch kein sichtbarer Knochenaufbau stattfindet, so daß „junger“, wachsender Knochen praktisch nicht vorhanden ist [Paschalis et al. 97].

4.5 Zelluläre Vorgänge beim Knochenwachstum

Knochen wird durch Zellaktivität ständig umgebaut. Dieser Prozeß wird *remodeling* genannt. Etwa alle 20 Jahre wird das Skelett einmal komplett umgebaut. Daran beteiligt sind die Knochenwachstumzellen, die *Osteoblasten* und die Knochenfreßzellen, die *Osteoklasten*. Auf eine noch unbekannte Art kommunizieren diese beiden Zellen miteinander. Knochenauf- und abbau ist ein diffiziles Gleichgewicht, die Stö-

rung führt zu Krankheiten, wie beispielsweise der Osteoporose, bei der sowohl erhöhte Osteoklastenaktivität als auch verminderte Osteoblastenaktivität den Knochenschwund verursachen. Zur Knochenresorption bedient sich der Osteoklast dabei seiner gewellten Unterseite (*ruffled border*), an der ein saures Milieu mit pH-Werten um 4,5 herrscht [Teitelbaum et al. 97]. Osteoblasten bilden neuen Knochen und mineralisieren die Kollagenfasern. Die Funktion der Mineralisierung verläuft dabei über Matrixvesikel [Plate et al. 96]. Es wird vermutet, daß die Feststoffkonzentration des ACPs in den Matrixvesikeln variabel ist, wodurch die Stöchiometrie des Knochenapatits beeinflusst werden kann (s. Kapitel 3.3.3) [Blumenthal et al. 81]. Ein weiterer Zelltyp, der *Osteozyt* entsteht, wenn ein Osteoblast von Knochen umbaut worden ist. Neuere Vermutungen gehen davon aus, daß der Osteozyt bei mechanischer Beanspruchung stimulierende Proteinkaskaden in Gang setzt, die das Knochenwachstum, also die Osteoblastenaktivität, anregen. Dadurch wird erreicht, daß an Stellen höherer Beanspruchung mehr Knochen wächst.

5. Verwendete spezielle Untersuchungsmethoden

5.1 Infrarot-Spektroskopie

Die Infrarot-spektroskopischen Messungen wurden an KBr-Preßlingen mit einem FT-IR Spektrometer PE 1720 der Firma Perkin-Elmer in einem Wellenlängenbereich von $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ und einer Aufsummierung von 4 Scans durchgeführt.

Aus den IR-Spektren wurden Informationen über die vorliegende Verbindung, den Fremdionengehalt (Carbonat, Wasser) und die Kristallinität der Substanz gewonnen.

5.2 Röntgenpulverdiffraktometrie

Die Röntgenpulverdiffraktogramme wurden an einem D8 Advance-Röntgenpulverdiffraktometer von Bruker mit einer Seifert SF 60 Röntgenröhre bei einer Wellenlänge von $1,541\text{ \AA}$ ($\text{Cu K}\alpha$ -Linie) mit einer Datenverarbeitungssoftware von Siemens aufgenommen. Dabei wurde hauptsächlich der Winkelbereich von $10\text{-}40^\circ 2\theta$ mit einer Geschwindigkeit von $1^\circ 2\theta/\text{min}$ vermessen. Dabei wurde die gemörsernte Probe auf einem Plexiglasträger vermessen. Bei geringen Substanzmengen, wie sie beispielsweise bei der Untersuchung der Chondrocalcinose anfielen, wurde ein Silicium (711)-Träger verwendet.

Um hochauflösende Messungen zu erhalten, wurden einige mg der Proben gemör-

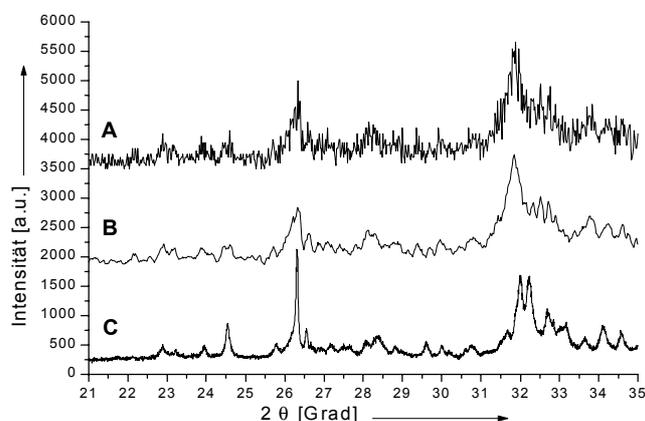


Abb. 5.1: Vergleich der Auflösung von Röntgenpulverdiffraktogrammen derselben Probe. A: Laborgerätmessung, B: Laborgerätmessung mathematisch geglättet, C: HASYLAB Strahl B2

sert und in eine 1 mm dicke Quarzkapillare gegeben. Diese wurde an der Beamline B2 im HASYLAB (Hamburger Synchrotronstrahlungslabor) des DESY (Deutsches Elektronen Synchrotron) in Transmission mit einem Analysator (Sekundärmono-

chromator) vermessen. Die erheblichen Unterschiede der Auflösung sind in Abbildung 5.1 erkennbar. Um eine gute Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden die HASYLAB-Messungen auf Cu K_{α} -Wellenlänge umgerechnet.

Aus den Röntgenbeugungsdaten wurden Informationen über die vorliegende Phase, mögliche Vorzugsorientierungen und die Kristallinität der Substanz gewonnen.

Um Kristallitgrößen aus den Beugungsmessungen zu berechnen, wurden einige spezifische Reflexe einem Lorenz-Fit unterzogen und aus der Halbwertsbreite mittels der Scherrer-Formel berechnet [Krischner 90]:

$$\beta_{1/2} = \frac{K \cdot \lambda \cdot 57.3}{D \cos \theta} \quad (\text{Gl. 5.1})$$

$\beta_{1/2}$ - Halbwertsbreite

K - Konstante (gewöhnlich $K=1$)

λ - Wellenlänge der Röntgenstrahlung in Å

D - durchschnittliche Kristallitgröße

θ - Beugungswinkel des Reflexes

5.3 Thermogravimetrie mit Quadrupol-Massenspektroskopie und Differenz-Thermoanalyse (TG-DTA-MS)

Bei der Thermogravimetrie wird der Gewichtsverlust einer Probe in Abhängigkeit von der Temperatur gemessen. Ein oben an der Thermowaage angeschlossenes Quadrupol-Massenspektrometer erlaubte es, gleichzeitig die Gasphase über der Probe zu detektieren. Weiterhin lassen sich exotherme und endotherme Ereignisse mittels der Differenz-Thermoanalyse (DTA) ermitteln [Cammenga & Eppele 95].

Aus den TG-DTA-MS-Messungen wurden Informationen über die thermodynamische Stabilität, die Reaktionsfähigkeit der Substanz unter Hitzeeinwirkung, den Wassergehalt sowie den Fremdionengehalt (Carbonat) gewonnen.

Die Messungen wurden an einer Thermowaage der Firma Netzsch STA 409/C, gekoppelt mit einem Quadrupol-MS MG 421 und einer Steuereinheit TASC 414/12 durchgeführt. Gemessen wurde im offenen Aluminiumoxidtiegel mit einer Heizrate von 5 K min^{-1} und einer Preßluftdurchflußrate von 50 ml min^{-1} .

5.4 Rasterelektronenmikroskopie mit energiedispersiver Röntgen-Spektroskopie (REM-EDX)

Mit der Rasterelektronenmikroskopie wurden die entstandenen Morphologien der kristallinen Phasen betrachtet und Abschätzungen bezüglich Kristallit- und Korngröße getroffen. Mittels EDX wurde festgestellt, welche Phase sich gerade im Focus des Rasterelektronenmikroskops befand. Die Werte (insbesondere die Ca/P-Verhältnisse) waren dabei, da sie zu ungenau waren, nur zur subjektiven Abschätzung geeignet.

Rasterelektronenmikroskopie mit energiedispersiver Röntgen-Spektroskopie von goldbedampften Proben wurden mit einem Philips SEM 515 D 806 V in Kombination mit einer EDAX 9900 durchgeführt.

5.5 pH-Wert-Messungen

Zeitaufgelöste pH-Wert-Messungen wurden mittels zweier WTW 340 pH-Meter, über die RS 232-Schnittstelle an einen Computer (AMD K6-200) angeschlossen, durchgeführt. Das Programm mit dem die Messungen ausgeführt wurden, war VISIDAQ von Advantech mit einer Programmprozedur (*strategy*) „pH MESS“. Im Anhang ist das Programm und Durchführungsanweisungen ausführlich beschrieben.

5.6 Atomabsorptionsspektroskopie

Um Aufschluß über den Calcium-Gehalt eines Festkörpers oder einer Lösung zu erhalten, wurden Untersuchungen mit einem Atomabsorptionsspektrometer 5000 AAS der Firma Perkin Elmer im Flammphotometer-Modus angestellt. Dazu wurden wäßrige Lösungen hergestellt, die maximal 5 mg/l Ca^{2+} enthalten sollten und diese mit wenig HNO_3 p.a. (65%) angesäuert.

Insgesamt 10 Blindproben, die unter die anderen Meßlösungen gemischt wurden, ergaben einen Meßfehler von 10%.

5.7 Photometrie

Der Phosphat-Gehalt einer Lösung wurde mit einem HACH DR/2000 Spectrophotometer mit der Molybdovanadat-Methode bei 430 nm ermittelt. Das Photometer erlaubte es, durch eine einprogrammierte Sequenz den Phosphat-Gehalt einer Lösung direkt in mg/l abzulesen. Die Herstellung der Molybdovanadat-Reagenz und die Durchführung einer Photometrie-Messung sind im präparativen Teil verzeichnet. Der Meßfehler, der durch die Messung von Referenzsubstanzen und Referenzlösungen bestimmt wurde, betrug 5%. Daher diente die Methode nur zur Ermittlung von Anhaltspunkten und nicht für genaue Daten.

5.8 Messung mechanischer Eigenschaften

Zur Testung der Bruchfestigkeit wurden Formkörper mit einer Länge L , dem Durchmesser D und der Fläche A in eine statische Prüfmaschine für quasistatische Prüfungen von Zwick (Zwick 1475) eingespannt. Entlang dieses Körpers wirkte eine Kraft F , wodurch der Körper in Längsrichtung zunächst gestaucht wurde, bevor er schließlich brach. Daraus konnte dann die maximale Spannung σ_{max} , die Stauchung ε und der Elastizitätsmodul E nach folgenden Formeln berechnet werden:

$$E = \frac{F \cdot L}{A} \quad (\text{Gl. 5.2})$$

$$\varepsilon = \frac{dL}{L} \quad (\text{Gl. 5.3})$$

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (\text{Gl. 5.4})$$

5.9 Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS)

5.9.1 Grundlagen

Die Röntgenabsorptionsspektroskopie (*Extended X-ray Absorption Fine Structure* - EXAFS) untersucht Wechselwirkungen von Röntgenstrahlen mit Materie. Beim

Durchgang durch eine Probe verliert Röntgenstrahlung an Intensität. Für die Absorption gilt:

$$\mu(E) \cdot d = \ln\left(\frac{I_0}{I_1}\right) \quad (\text{Gl. 5.5})$$

Darin sind I_0 und I_1 die Intensitäten vor und hinter der Probe, d die Schichtdicke und $\mu(E)$ der lineare Absorptionskoeffizient der Probe. Im allgemeinen nimmt die Absorption mit zunehmender Energie ab, d.h. die Probe wird für energiereichere Röntgenstrahlung transparenter.

Diesem Verlauf überlagert sind die *Absorptionskanten*, die auf inneren Ionisationen beruhen und die immer dann auftreten, wenn die Energie der Röntgenstrahlung ausreicht, ein Elektron aus einer inneren Elektronenschale herauszulösen. Entsprechend der Hauptquantenzahl der Elektronen bezeichnet man die Absorptionskanten mit K, L, M, usw. Dieses Photoelektron wechselwirkt mit seiner atomaren Umgebung.

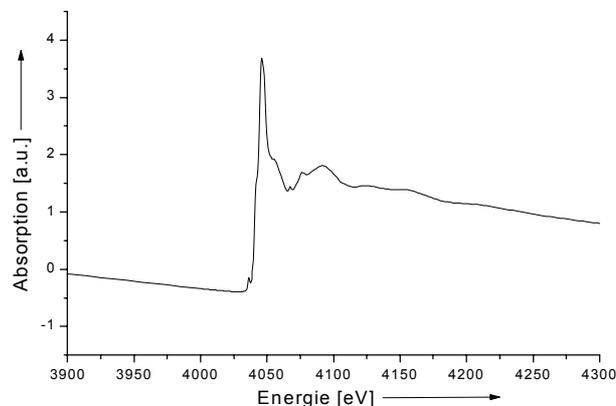


Abb. 5.2: Ca-K Röntgenabsorptionsspektrum eines Calciumphosphats. Deutlich ist die Absorptionskante bei ca. 4042 eV sichtbar. Die Oszillationen nach der Absorptionskante stammen von inneratomaren Übergängen, Mehrfachstreuungen durch die Nachbaratome und Interferenzen.

Der EXAFS-Bereich ist charakterisiert durch langwellige Oszillationen des Absorptionskoeffizienten. Ausgehende und von einem Nachbaratom zurückgestreute Photoelektronenwellen interferieren abhängig von ihrer Wellenlänge positiv bzw. negativ. Die resultierenden periodischen Schwankungen des Absorptionskoeffizienten enthalten damit Information über Art, Anzahl, Abstand und die Geometrie benachbarter Atome [Ebbinghaus 98].

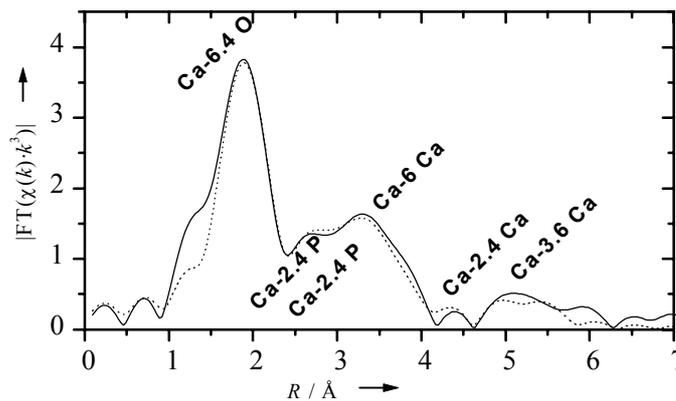


Abb. 5.3: Fourier-transformierte EXAFS-Funktion (Ca-K-Kante) eines apatitischen Calciumphosphats aufgetragen gegen den Abstand vom Ca-Zentralatom in Ångström. Im Diagramm bezeichnet sind die einzelnen Schalen in der Funktion.

5.9.2 Durchführung der Messungen

Die Röntgenabsorptionsspektren wurden am Strahl E 4 (EXAFS II) des Hamburger Synchrotronstrahlungslabors (HASYLAB) des Deutschen Elektronen-Synchrotron (DESY) aufgenommen. Die Messungen wurden mittels eines Nickelspiegels und eines Si(111)-Doppelkristallmonochromators durchgeführt. Dieser Meßaufbau bewirkt, daß durchschnittlich 10^{10} Photonen $s^{-1} mm^{-1}$ auf die Probe auftreffen. Die zu messende Substanz wurde pulverisiert auf TESA-Band aufgetragen und auf dem Probenhalter aufgebracht, daraufhin wurde die Messungen an der Calcium-K-Kante (~ 4042 eV) in Transmission bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Auswertprogramme wurden die Programme AUTOBK, FEFFIT [Stern et al. 95] und FEFF [Rehr et al. 92] der Universität von Washington verwendet.

Für die hexagonale Struktur von Hydroxylapatit, welches zwei kristallographisch unabhängige Ca-Atome besitzt (die erste Position Ca_1 ist von vier, die zweite Position Ca_2 von 6 Calcium-Atomen pro Einheitszelle umgeben) zeigt sich im EXAFS-Spektrum das gewichtete Mittel beider kristallographischer Positionen ($0.4 Ca_1 + 0.6 Ca_2$), da die Umgebung beider Calcium-Atome gleichzeitig detektiert wird und in einer EXAFS-Funktion sowie der Fourier-transformierten Kurve auftaucht.

6. Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmittel sind *Biomaterialien*. Biomaterialien werden definiert als nicht-körpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren Funktionen ersetzen. Zunächst müssen die Anforderungen an Knochenersatzmaterialien definiert werden, bevor ein Überblick über die gängigen Knochenersatzmaterialien gegeben werden kann.

6.1 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Die Ziele, die mit Biomaterialien für den Knochenersatz erreicht werden sollen, können mit folgenden Punkten dargelegt werden:

Ein Knochenersatzmaterial sollte hauptsächlich *biokompatibel* sein, also keine Abwehrreaktionen des Körpers hervorrufen. Die *Bioresorbierbarkeit*, d.h. die Resorption des Materials bzw. das Remodeling (Umbau zu körpereigenem Knochen) des Materials oder Teilen des Materials ist ein wünschenswerter Effekt. Um diese Resorption hervorzurufen, sollte das Material *osteinduktiv* wirken, also die Knochenneubildung anregen. *Osteokonduktivität* ist die Eigenschaft, daß im Sinne eines Leitschienenefekts das Knochenwachstum entlang des Defektes gesteuert wird. Menge und Qualität des neugebildeten Knochens sollen positiv beeinflusst werden und die Zeiteinheit, in der Knochenneubildung und Knochenheilung stattfindet, sollte beschleunigt werden. Gleichzeitig sollte das Implantat mechanisch gut belastbar sein [Rueger 98].

Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, müssen die Materialien diverse Eigenschaften erfüllen. Dazu gehören für Implantate im Allgemeinen:

- a. Die Porosität des Implantatmaterials. Interkonnektierende Porensysteme in der Größe von ca. 200-400 μm fördern die Migration von Osteoblasten und Osteoklasten in das Implantatlager. Kleinere Poren fördern die Vaskularisierung und Versorgung der Zellen.

- b. Die Löslichkeit des Materials. Eine höhere Löslichkeit fördert auch das Remodeling, senkt aber gleichzeitig die mechanische Stabilität [Törmälä & Rokkanen 95].
- c. Die Struktur und Beschaffenheit der Oberfläche. Bei Kultivierung von Osteoblasten auf nanokristallinen Al_2O_3 - und TiO_2 -Oberflächen wurde eine verstärkte Adhäsion im Vergleich mit mikrokristallinen Substraten beobachtet [Webster et al. 99]. Allerdings zeigten Versuche mit HAP-Partikeln in Kombination mit Myoblasten (Muskelgewebszellen) und Fibroblasten (Bindegewebszellen) einen gegenteiligen Effekt: Je kleiner die Partikel, desto weniger Zellen wurden gezählt, was auf den direkten Kontakt zwischen Zellen und Partikeln zurückgeführt wurde und dadurch Membranschäden verursachen soll [Sun et al. 97].
- d. der entstehende pH-Wert nach der Implantation in das biologische Milieu. Zellen, insbesondere Osteoblasten und Osteoklasten, reagieren sehr empfindlich auf Abweichungen vom physiologischen pH-Milieu (pH 7.4).

Für Materialien mit oder aus Calciumphosphaten gilt im Besonderen:

- a. Die chemische Zusammensetzung des Materials: Welche Calciumphosphatphase ist vorhanden (HAP, TCP), Einphasigkeit, Mehrphasigkeit, das Ca/P-Verhältnis, vorhandene Restmengen der Ausgangsmaterialien.
- b. Die Kristallinität des Materials. Einer niedrigeren Kristallinität folgt geringere thermodynamische Stabilität. Daraus folgt eine höhere Löslichkeit und damit bessere Resorption durch Osteoklasten und somit ein besseres Remodeling [DeBruijn et al. 94].

Die exakten Mechanismen, durch die manche Materialien Knochenbildung erzeugen und somit bioaktiv wirken, sind nicht geklärt. Die knochenähnliche Oberfläche solcher Materialien, in Kombination mit möglichen lösungs- oder substratspezifischen lokalen chemischen Bedingungen, könnte ein wichtiger Vermittler für die Bioaktivität solcher Materialien sein [Dee & Bizios 95].

6.2 Gängige Knochenersatzmaterialien

Wenn heute ein Knochendefekt in der Klinik aufgefüllt werden muß, so stehen dem Chirurgen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Neben dem *autogenen* (körpereigenen), *allogenen* (humaner Knochen aus Knochenbanken) oder *xenogenen* (tierischen) Knochen sind dabei die synthetischen Produkte, wie Titanimplantate, Calciumphosphatkeramiken, biologisch abbaubare Kunststoffe sowie Kompositwerkstoffe (Mischungen aus verschiedenen Materialien, beispielsweise Calciumphosphatkeramik und biologisch abbaubarer Kunststoff) zu nennen. Autogene Spongiosa bezeichnet man –auch in Anbetracht einer fehlenden Alternative– als den „goldenen Standard“. Jedoch ist die Entnahme (meist Stücke vom Beckenkamm) und ihre Transplantation mit Nachteilen behaftet [Wippermann 96]:

- a. der Vorrat an autogener Spongiosa ist begrenzt
- b. die Entnahmestelle wird mechanisch geschwächt
- c. der operative Zweiteingriff erhöht die Möglichkeit von Komplikationen
- d. die verlängerte Operationsdauer
- e. die Möglichkeit des Nichtanwachsens des Transplantates

Allogener und xenogener Knochen bergen dagegen folgende Nachteile:

- a. Möglichkeit der Übertragung von Krankheiten (z.B. HIV, BSE)
- b. hohes Entzündungsrisiko
- c. Mangelnde Resorption und auch Abstoßungsreaktionen
- d. aufwendige Vorbehandlung (Proteinextraktion, Sterilisation)

Die Tatsache, daß der größte Teil der Eingriffe mit Defektauffüllung bis heute mit körpereigenem Knochengewebe durchgeführt wird, zeigt deutlich den Handlungsbedarf zur Entwicklung eines synthetischen, unbegrenzt verfügbaren und voll integrierbaren Materials. Nach J. M. Rueger werden Knochenersatzmaterialien in vier Klassen eingeteilt [Rueger 98]:

1. Biologisch-organische Substanzen. Dazu gehören mineralisierte oder demineralisierte Knochenmatrices, wie der nachstehend untersuchte „Kieler Knochenspan“.

Weiterhin werden Knochenmatrixextrakte und Knochenwachstumsfaktoren in dieser Klasse genannt. Knochenmorphogenetische Proteine (englisch *bone morphogenetic proteins, BMP*) gehören zu einer Familie von bisher 14 bekannten Knochenwachstumsfaktoren, die sehr ähnlich strukturiert sind. Diese BMPs sind osteoinduktive Substanzen und es ist wahrscheinlich, daß nicht nur ein Protein, das BMP-2, für die Steuerung des Knochenwachstums und der Knochenheilung zuständig ist, sondern daß diese Prozesse von zahlreichen verschiedenen Faktoren kontrolliert werden. Man beginnt erst zu verstehen, welche Bedeutung die BMPs unter physiologischen Bedingungen haben. Diverse Versuche mit BMPs an Tibiadefekten zeigten eine verstärkte Knochenneubildung im Vergleich zu Kontrollgruppen [Yaszemski et al. 96]. BMPs können auch Knochenbildung in vaskularisierten Muskelgewebe induzieren; die Form des Hohlraumes im Muskelgewebe bestimmt dabei die Form des entstehenden Knochens [Reddi 97].

2. Synthetische, anorganische Materialien. Dazu gehören Keramiken aller Art, Gläser und Calciumphosphatkeramiken. Weiterhin können dies auch Implantate aus körperfremden, jedoch bioresorbierbaren einphasigen Keramiken sein. Dazu lassen sich beispielsweise koralline Calciumcarbonatprodukte aus Aragonit zählen, die im Vergleich mit HAP-Keramiken eine höhere Löslichkeit und somit eine bessere Fähigkeit zum *Remodeling* zeigten [Vuola et al. 96]. In einer Übergangsperiode erfolgt eine Coexistenz beider Materialien [Westbroek & Marin 98]. Ebenso sind die Metallimplantate (Marknägel, Metallschrauben, meist aus Titan) an dieser Stelle zu nennen. Die Calciumphosphatkeramiken lassen sich wiederum in verschiedene Untergruppen unterteilen:
 - a. Monophasische, synthetische Verbindungen, wie HAP- oder TCP-Keramiken. Diese werden allgemein als osteoinduktiv und biokompatibel angesehen. Während die Hydroxylapatitkeramiken *in vivo* kaum Anzeichen für eine Bioresorption zeigen, wird diese Eigenschaft Implantaten aus β -TCP zugeschrieben [Klein et al. 89]. Jedoch ist für klinische Anwendungen dieser Abbau zu schnell, und sämtliche Implantate dieser Machart sind außerdem auf eine zusätzliche, abstützende Osteosynthese (z.B. Titanplatten) angewiesen [Rueger 98].
 - b. Hydrothermal aus Korallen bzw. Algen über einen Umwandlungsprozeß produzierte Hydroxylapatitkeramiken. Diese Produkte sind *phykogenen* (pflanzli-

chen) Ursprungs. Die poröse Struktur der Alge oder Koralle dient dabei als formgebender Faktor. Dazu gehört beispielsweise das nachstehend untersuchte Algipore[®] der Firma Friadent oder das Hydrothermalprodukt Biocoral[®] der Firma Interpore international.

- c. Aus bovinen Knochen durch einen thermischen Sinterungsprozeß gewonnene Hydroxylapatitkeramiken, wie das nachstehend untersuchte Endobon[®] der Firma Merck. Die geometrische Struktur ist der des Knochens verständlicherweise sehr ähnlich und in Tierversuchen zeigte sich eine deutlich verbesserte Biointegration.
 - d. Mehrphasige Calciumphosphatkeramiken und Biogläser.
 - e. Calciumphosphathaltige Knochenzemente. Dabei kommen beispielsweise Mischungen aus MCPM, TCP und CaCO₃ zum Einsatz, die mit Wasser angeteigt werden. Durch ein geeignetes Mischungsverhältnis wird erreicht, daß ein fester Zement entsteht, der der Mineralphase des Knochens bezüglich Zusammensetzung (carbonathaltiger Hydroxylapatit vom B-Typ Dahllit) und Kristallinität sehr ähnlich ist [Constantz et al. 95].
3. Synthetische, organische Verbindungen. Dazu gehören einerseits die PMMA-Zemente, zum anderen auch Schrauben und Platten aus Polymeren. An erster Stelle seien hier die biodegradablen, hydrophilen Polyester genannt. Als Hauptverbindungen lassen sich dabei Polyglycolid (PGA, Polyester der Glycolsäure) und Polylactid (sowohl Poly-L-lactid [PLLA] als auch Poly-DL-lactid [PDLLA], Polyester der Milchsäure) und deren Copolymere nennen. Diese Polyester werden im Körper biologisch zu niedermolekularen Fragmenten, später zu Monomereinheiten abgebaut, verlieren dabei aber auch ihre mechanische Stabilität. Somit ist die Fixation durch einfache Polyesterschrauben nicht vorstellbar [Hofmann 97].

Durch eine spezielle Webetechnik wurde aus Polyesterfasern eine selbstverstärkende (*SR = self reinforced*) Struktur geschaffen, wodurch aus den Polyestern auch belastbare Schrauben herstellbar sind. SR-PGA-Schrauben verlieren ungefähr 7 Wochen nach subkutaner Implantation bei Kaninchen ihre Stabilität, während Schrauben aus SR-PLLA noch nach 36 Wochen ungefähr 10 % ihrer ursprünglichen Festigkeit besitzen [Törmälä & Rokkanen 95]. Weiterhin lassen sich, beispielsweise durch Aufschäumen, poröse Formkörper aus Polymeren herstel-

len. Bei PLLA-Körpern wurde beobachtet, daß mit steigender Porosität die Menge des eingewachsenen Gewebes steigt, da mit höherer Porosität die Vaskularisierung und die Zellversorgung gefördert werden. Auch die Kristallinität des Polymers ist ein wichtiger Faktor: Ein wesentlich schnelleres Einwachsen des Gewebes war bei amorphen PLLA-Proben beobachtbar [Mikos et al. 93]. Ein weiteres Problem ist der lokal abfallende pH-Wert bei der Degradation der Polyester. Durch das Entstehen von Hydroxycarbonsäure-Monomereinheiten übersäuert das Gewebe um das Implantat. Dies kann zur Acidose führen und somit wiederum zur Auflösung des Knochengewebes im Bereich des Implantates.

4. Kompositmaterialien. Das können Mischungen aus all den oben genannten Materialien sein. Dabei gilt es beispielsweise, die osteoinduktive Wirkung von HAP mit der Stabilität eines Metallimplantats zu vereinen. Dies führt zu Titan-Implantaten, welche mit verschiedenen Techniken mit HAP beschichtet werden können. Die gängigste Methode dabei ist das Plasma-Spray-Verfahren welches zu einer sehr regelmäßigen und glatten HAP-Schicht mit einer Dicke von 15-50 μm führt [Hemmerle et al. 97]. Weiterhin wird noch Laserbeschichtung eingesetzt, welche stabilere, rauhere und nanokristallinere Schichten ergibt [García-Sanz 97] sowie Sol-Gel-Techniken [Weng & Baptista 98]. Vergleichsuntersuchungen mit Röntgenbeugung der Knochenbildung direkt auf der Implantatoberfläche zwischen beschichteten und unbeschichteten Titan-Implantaten zeigten bei beschichteten Implantaten mehr und qualitativ „besseren“ Knochen als bei unbeschichteten Oberflächen [Savarino et al. 98].

Die Kompositmaterialien aus Polyestern und Calciumphosphaten nehmen ebenfalls einen großen Stellenwert ein. Die Osteoinduktivität der Calciumphosphate soll dabei ebenso ausgenutzt werden wie das Polymer den Keramiken Stabilität verleihen soll. Weiterhin sollen die sauren Abbauprodukte durch die Calciumphosphate abgepuffert werden. Außerdem will man so dem Körper ein Calcium-Depot zum *remodeling* zur Verfügung stellen, während der Polyester langsam abgebaut wird. Das Ziel ist ein Implantat, welches in einem kurzen Zeitraum durch stabilen Knochen ersetzt wird. In Kapitel 10 wird noch von der Entwicklung eines Kompositmaterials aus Polyestern und Calciumphosphat die Rede sein. Im weiteren seien noch Kompositverbindungen zwischen biodegradierbaren Polyestern und BMPs genannt, die im Sinne des *controlled drug release* (kontrollierte Wirk-

stofffreisetzung) während der Degradation über einen langen Zeitraum BMPs in die Umgebung freigegeben sollen, um so das Knochenwachstum zu steuern.

6.3. Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien

Klinische Ergebnisse des Einsatzes von gängigen Knochenersatzmaterialien der Klasse 2 zeigen, daß die Materialien zwar Osteoinduktivität aufweisen, jedoch ein *remodeling* nur begrenzt stattfindet. So ist beispielsweise Endobon[®] ein Material, welches die Forderung der Porosität sehr gut erfüllt, jedoch ist das Material auch Jahre nach der Operation nahezu unverändert nachweisbar [Linhart et al. 00]. Um qualitative Aussagen treffen zu können, wurde die Mineralphase der Knochen untereinander sowie mit einigen Knochenersatzmaterialien verglichen. Weiterhin sollte mit dem Einsatz moderner festkörperchemischer Methoden aufgeklärt werden, ob und wie sich die Mineralphase diverser unterschiedlicher Knochen unterscheidet und somit, ob für unterschiedliche Knochen unterschiedliche Knochenersatzmaterialien zur Regeneration eingesetzt werden sollten. Es sollten also Aussagen über die Biokompatibilität, Bioresorbierbarkeit und Osteokonduktivität der Knochenersatzmaterialien gewonnen werden.

Die Proben waren im einzelnen:

- Gesunde Spongiosa aus dem distalen Femur (Fall 988/98 Osteopathologie Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, weiblich, Alter 66 Jahre). Nachfolgend „Spongiosa A“ genannt.
- Gesunde Spongiosa aus dem distalen Femur (Fall Osteopathologie 1462/98, männlich, 12 Jahre). Nachfolgend „Spongiosa B“ genannt.
- Neu gebildeter Callusknochen nach einer Fraktur aus dem distalen Femur (Fall Osteopathologie 1462/98).
- Spongiosa mit osteoblastischen Osteosarkom aus dem distalen Femur des Falles 1462/98. Tumorknochen hat sich zwischen den Trabekeln der Spongiosa gebildet. Nachfolgend „Tumorknochen“ genannt.

- „Kieler Knochenspan“, ein älteres Knochenersatzmaterial bovinen Ursprungs der Klasse 1, welches zunächst mechanisch von Knochenmark gereinigt wurde, danach mit $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ extrahiert und später mit H_2O_2 behandelt wurde [Boyde & Jones 96].
- Endobon[®] von MERCK Biomaterialien GmbH, ein Knochenersatzmaterial bovinen Ursprungs der Klasse 2, welches in einem zwei-Stufen-Prozeß calciniert wurde (1. Stufe: $>700^\circ\text{C}$, 2. Stufe: $>1000^\circ\text{C}$).
- Algipore[®] der FRIADENT GmbH, ein Knochenersatzmaterial, in diesem Fall eine Algenart, welche hydrothermal in Apatit überführt wurde. Die poröse Struktur der Alge diente dabei als formgebender Faktor.
- Hydroxylapatit (HAP) für Biomaterialien von MERCK, hergestellt durch Fällung. Dieses Calciumphosphat wurde als Referenzsubstanz herangezogen.

Da unbekannt ist, inwieweit chemische und mechanische Behandlungsmethoden die Struktur des Knochenminerals verändern, wurde hier bewußt darauf verzichtet und somit native Proben nach geringfügiger Behandlung mit zerstörungsfreien Methoden untersucht [Peters et al. 00].

6.3.1. Infrarot-Spektroskopie

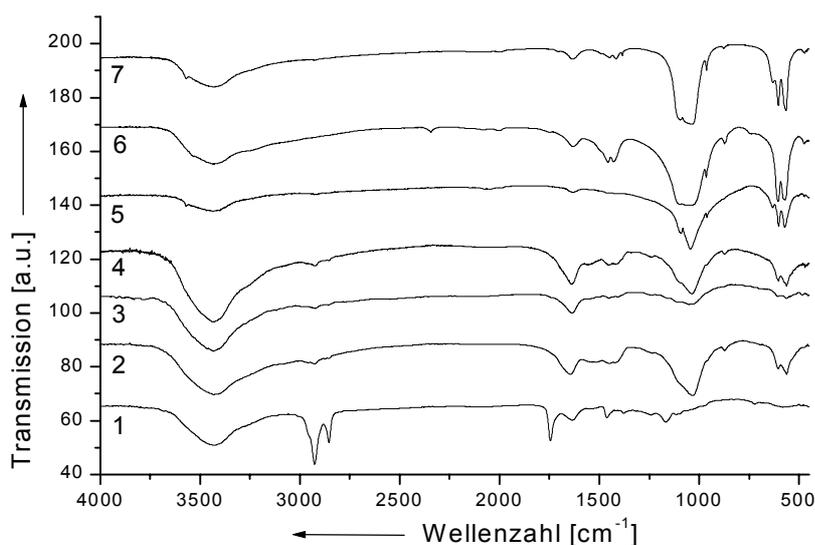


Abb. 6.1: FT-Infrarotspektren der Knochenproben und Knochenersatzmaterialien. 1. Spongiosa B, 2. Tumorknochen, 3. Callusknochen, 4. „Kieler Knochenspan“, 5. Endobon[®], 6. Algipore[®], 7. Hydroxylapatit von Merck.

Die Infrarot-Spektren der Knochenproben und der Knochenersatzmaterialien im Vergleich zeigen unterschiedliche Kristallinitäten und Carbonatgehalte. Auffällig ist, daß in der Probe der Spongiosa B die apatitischen Schwingungsbanden fast völlig unsichtbar sind (vgl. Tabelle 3.4) und anstelle dessen mehr Banden sichtbar sind, die auf organische Bestandteile (Kollagen, Fettgewebe) schließen lassen. Mehrere Spektren verschiedener Proben auch der Spongiosa A zeigten dieses IR-Spektrum. Die Proben wurden aus einem repräsentativen Bereich entnommen, so daß sowohl Weich- als auch Hartgewebe gleichermaßen vorhanden war.

Tumorknochen, Callusknochen und "Kieler Knochenspan" enthalten Apatit mit mittlerer Kristallinität. Die Aufspaltung bei 550 cm^{-1} ist bei beiden ähnlich, auch die Schärfe der P-O Schwingungsbande bei $\sim 1038\text{ cm}^{-1}$ zeigt kaum Unterschiede (vgl. Abb. 3.11). Der Kallusknochen enthält laut diesen Messungen am wenigsten apatitisches Knochenmineral. Ansteigend in der Reihe der Kristallinität zeigen Hydroxylapatit von MERCK und Algipore[®] ähnliche Aufspaltungen und Bandenschärfen. Endobon[®] ist durch seine thermische Behandlung bei der Herstellung sehr kristallin (scharfe Bande bei 1038 cm^{-1} , Aufspaltung in zwei Banden bei 550 und 603 cm^{-1}).

Nach qualitativer Abschätzung der P-O Schwingungsbande bei 1030 cm^{-1} im Vergleich zu den C-O Schwingungsbanden (ν_3) bei 1423 und 1493 cm^{-1} (vgl. Abb. 3.12) erscheint der Carbonatgehalt im "Kieler Knochenspan" und im Tumorknochen ähnlich. HAP Merck weist einen geringen, mit der Thermowaage nicht meßbaren Carbonatgehalt auf, der auf die Herstellung durch Fällung an Luft zurückgeführt werden kann.

Auch Algipore[®] enthält einen nicht unerheblichen Anteil Carbonat. Dadurch, daß die C-O–Streckschwingung und die P-O(H) – Streckschwingung von HPO_4^{2-} (ν_5) im selben Wellenzahlenbereich auftreten, ist nicht feststellbar, ob Anteile von HPO_4^{2-} , gebunden als Brushit, vorliegen. Im Bereich von $2000\text{-}2400\text{ cm}^{-1}$ sind im IR-Spektrum des Algipore[®] Banden zu erkennen, die von einer Fremdphase stammen müssen. Ein Calciumphosphat weist in diesem Bereich keine Banden auf, es muß sich also um eine Fremdphase handeln. Hochauflösende Spektren und die IR-Spektren nach Erhitzen des Knochenersatzmaterials in der Thermowaage (Kapitel 6.3.4) sollen Aufschluß über die Natur dieser Banden geben. Erst nach Erhitzen auf 1200°C zeigt sich im IR-Spektrum des Algipore[®] eine erhöhte Kristallinität (Abb.6.2). Weder die Aufspaltung bei 550 cm^{-1} noch die Schärfe der Bande bei 1030 cm^{-1} nehmen vorher

meßbar zu. Die Carbonatbande ($1384\text{--}1448\text{ cm}^{-1}$) weist immer noch das gleiche Verhältnis zur ν_3 -Phosphat-Streckschwingung auf wie Alqipore bei Raumtemperatur. Der Wassergehalt ist gesunken.

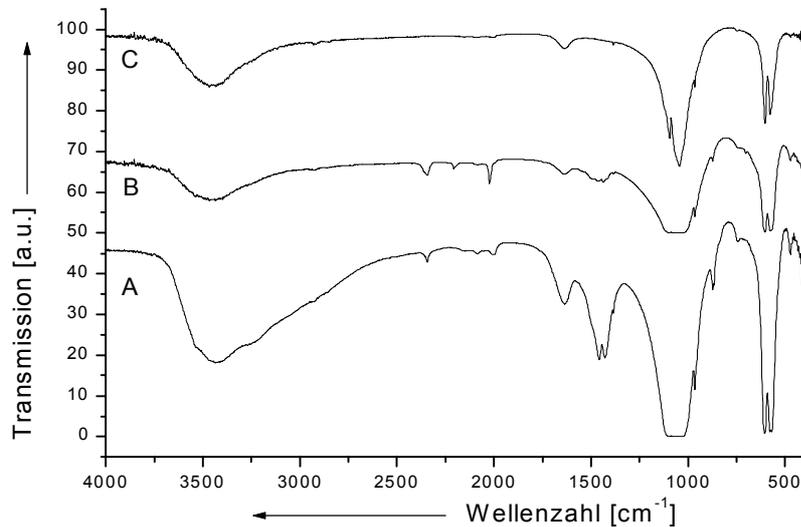


Abb. 6.2: Infrarot-Spektren von Alqipore®. A: bei Raumtemperatur, B: nach Erhitzen auf 800°C , C: nach Erhitzen auf 1200°C in der Thermowaage.

Die unbekanntenen Banden bei $2000\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ sind erst nach 1200°C nicht mehr zu sehen. Um diese unbekanntene Phase näher zu untersuchen, wurde eine hochauflösende Messung angefertigt (Auflösung 1 cm^{-1} , 10 Scans, Abb. 6.3).

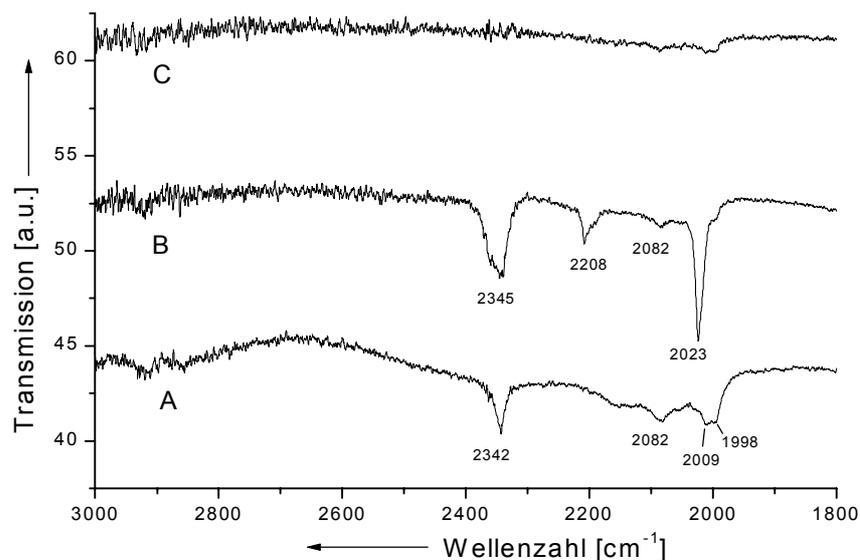


Abb. 6.3: Hochauflösende IR-Messung von Alqipore® im Bereich von $1800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$. A: Raumtemperatur, B: nach Erhitzen auf 800°C , C: nach Erhitzen auf 1200°C .

Die Banden der unbekannt Phase werden beim Erhitzen auf 800°C schärfer und ausgeprägter. Nach dem Erhitzen auf 1200°C sind sie nicht mehr vorhanden. Es kann sich laut Literatur um Aminogruppen (NH^+ , NH_2^+ , 2300–2800 cm^{-1} mittelstark ausgeprägt) oder um gebundenes CO_2 ($\sim 2350 \text{ cm}^{-1}$ scharf) handeln. Die scharfe Bande bei 2023 cm^{-1} kann auf in einer Kohlenstoffkette gebundenen Stickstoff (Ketenimine $>\text{C}=\text{C}=\text{N}-$, 2000 cm^{-1} , scharf) hinweisen. Diese IR-Daten deuten darauf hin, daß Algipore in seinem Herstellungsprozeß mit Ammoniumsalzen in Berührung gekommen sein kann. Carbonathaltige Apatite des B-Typs, die unter Verwendung von Ammoniumsalzen hergestellt wurden, zeigen nach dem Erhitzen die Bildung von Cyanat (NCO^-) und Cyanamid (NCN^{2-}) aus Ammoniumgruppen und CO_2 [Dowker & Elliott 79], [Vignoles et al. 87].

6.3.2 Hochauflösende Röntgenbeugung am HASYLAB

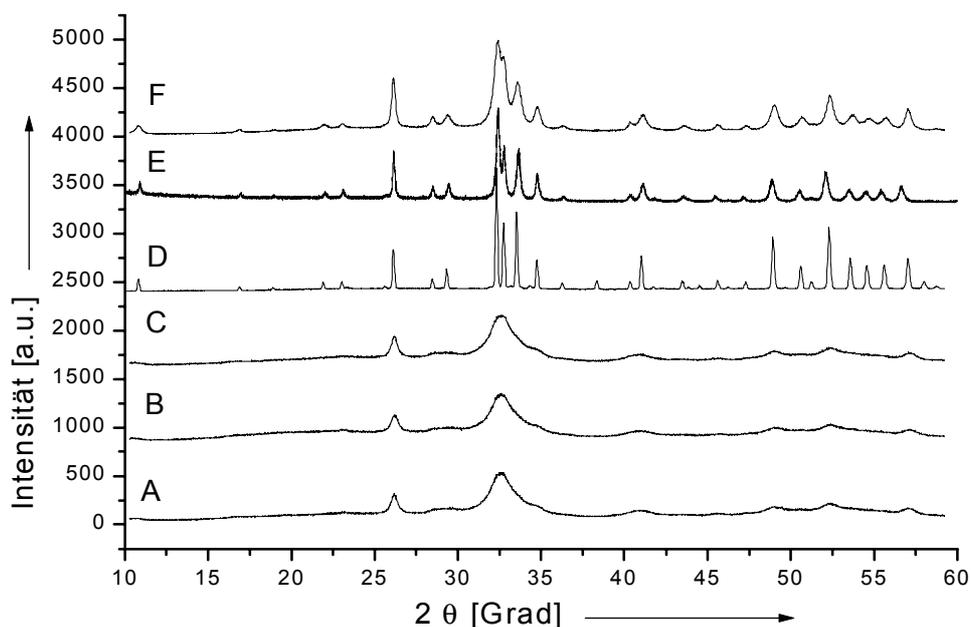


Abb. 6.4: Hochauflösende Röntgenpulverdiffraktogramme von A: Spongiosa mit Osteosarkom, B: Callusknochen, C: "Kieler Knochenspan", D: Endobon[®], E: Algipore[®], F: Hydroxylapatit Merck.

Callusknochen, Spongiosa mit Osteosarkom und "Kieler Knochenspan" zeigen sehr ähnliche Röntgenbeugungsmessungen. Breite, diffuse Reflexe deuten auf kleine Kri-

stallite hin. Sie weisen somit eine ähnliche niedrige Kristallinität mit nanometergroßen Calciumphosphat-Partikeln auf.

Hydroxylapatit von Merck zeigt schmalere, besser differenzierbare Reflexe, hat somit größere Kristallite. Die Kristallitgröße von Algipore[®] liegt zwischen der von Hydroxylapatit von Merck und Endobon[®]. Durch das Sintern bei 1100°C entstehen größere Kristalle. Weiterhin ist bei Endobon eine weitere Phase zu erkennen, die als Calciumoxid identifiziert werden konnte. Formuliert man den Carbonatapatit als $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot x \text{CaCO}_3$, so führt der Sintervorgang dazu, daß aus dem Carbonathaltigen Knochenapatit das Carbonat als CO_2 ausgetrieben wird [Peters et al 00]:



Im direkten Vergleich der Röntgenbeugungsmessungen der beiden noch gängigen Knochenersatzmaterialien Endobon[®] und Algipore[®] zeigen sich die IR-Daten bestätigt. Endobon[®] ist ein hochkristallines, sehr geordnetes, und somit thermodynamisch stabileres Material als Algipore[®]. Die in den anderen Proben nicht vorkommenden Reflexe (38.4, 41.8, 51.2, 58° 2θ) sind Calciumoxid (CaO) zuzuordnen.

Miller-Indices	(1 1 1)	(0 0 2)	(2 1 0)/ (1 2 0)	(1 3 0)/ (3 1 0)	(1 1 3)	(2 2 2)	(2 1 3)/ (1 2 3)	(0 0 4)
Beugungswinkel 2 θ [°]	17,8	20,1	22,4	30,8	33,9	36,0	37,0	40,9
Callusknochen	196	211	105	87	244	179	136	219
Tumorknochen	235	223	121	92	201	184	136	223
"Kieler Knochenspan"	192	236	95	83	231	186	153	253
HAP Merck	304	376	251	292	396	265	333	421
Algipore [®]	587	653	450	396	290	442	382	359
Endobon [®]	>710	>640	>670	>630	>640	>620	>640	>640

Tabelle 6.1: Durchschnittliche Kristallitgröße in Ångström aus den Halbwertsbreiten der Röntgenbeugungsreflexe in Abb. 6.4 berechnet.

Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung (Gl. 5.1) wurde aus der Halbwertsbreite der Reflexe die Kristallitgröße berechnet (Tabelle 6.1). Es fällt auf, daß alle drei künstlichen Materialien kaum Unterschiede in ihrer Ausdehnung in Richtung verschiedener Kristallgitterebenen zeigen. Weiterhin zeigt sich, daß die Knochenproben wie auch der "Kieler Knochenspan" sehr ähnliche Ausdehnungen aufweisen. Die Kristallite des

Knochenapatits sind flach, in Richtung der kristallographischen c-Achse elongiert und blättchenförmig. Für die Messung von Endobon[®] weist die Meßgeometrie eine zu niedrige Auflösung bezüglich der Reflexbreite auf, so daß in diesem Fall nur von Mindestgrößen der Kristallite gesprochen werden kann.

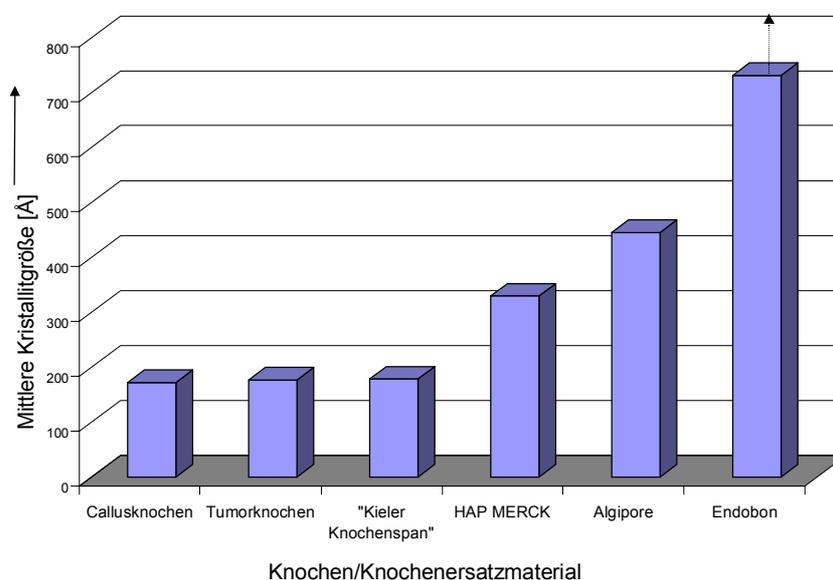


Abb. 6.5: Durchschnittliche Kristallitgrößen der Knochenproben und Knochenersatzmaterialien, gemittelt über alle Raumrichtungen.

Zur Verdeutlichung sei hier noch eine Balkendarstellung der durchschnittlichen Kristallitgrößen in Ångström der Knochen und Knochenersatzmaterialien abgebildet (Abb. 6.5). Auch hier zeigt sich, daß beide Knochenproben, wie auch der "Kieler Knochenspan" ähnliche Kristalldimensionen aufweisen. Hydroxylapatit von Merck hat gemessen an den Knochenproben nahezu die doppelte Kristallausdehnung, Algipore[®] steht zwischen HAP und Endobon[®] mit einer durchschnittlichen Ausdehnung von ca. 400 Ångström. Da die Messung der Kristallitgrößen von Endobon[®] durch die Meßgeometrie begrenzt war, ist hier durch einen Pfeil symbolisiert, daß die Kristallite durchaus größer sein können.

Betrachtet man die Röntgenpulverdiffraktogramme von Algipore[®] nach thermischer Behandlung analog der IR-Spektren (Abb. 2.3 und Abb. 2.4), so erkennt man, daß nach dem Erhitzen auf 800°C nur unwesentliche Änderungen eingetreten sind. Beim Erhitzen auf 1200°C läßt sich eine Fremdphase detektieren, die auf Tricalciumphosphat ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) sowie Tetracalciumphosphat ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$) hindeutet (Pfeile im Röntgenpulverdiffraktogramm).

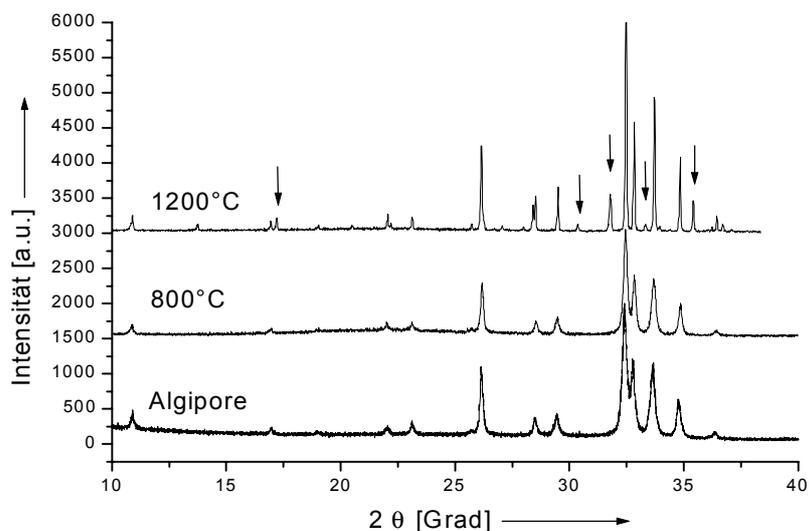


Abb. 6.6: Röntgenpulverdiffraktogramme von Algipore[®] nach unterschiedlicher Temperaturbehandlung.

Apatite, die HPO_4^{2-} -Gruppen enthalten, bilden beim Erhitzen Pyrophosphat. In Algipore[®] kann also die Anwesenheit solcher saurer Hydrogenphosphat-Gruppen ausgeschlossen werden (zur kritischen Betrachtung der Analyse saurer Hydrogenphosphat-Gruppen in carbonathaltigen Apatiten vgl. auch Kapitel 7.2.1.3). Höher kristalline Carbonatapatite bilden beim Erhitzen Tricalciumphosphat und Tetracalciumphosphat.

6.3.3 Röntgenabsorptionsspektroskopische Ergebnisse

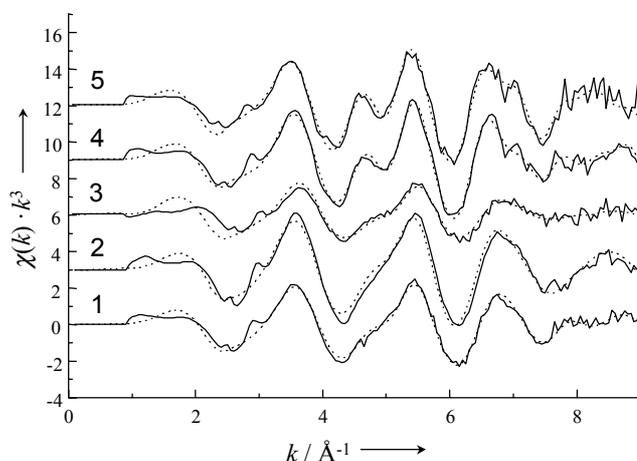


Abb. 6.7 EXAFS-Funktion $\chi(k)$ von 1 Tumorknochen, 2 Callusknochen, 3 „Kieler Knochenspan“, 4 Endobon[®] und 5 HAP von Merck. Durchgezogene Linien: Experimentelle Daten, gestrichelte Linien: Berechnete Kurven.

Mittels EXAFS werden quantitative Informationen im Nahbereich (bis zu 8 Å Entfernung zum Calcium-Atom) gewonnen. Die hauptsächlichen Schwingungen in der EXAFS-Funktion $\chi(k)$, die die Ca-O Umgebung beschreiben (Abb. 6.7), zeigen ähnliche Ergebnisse bei den synthetischen und biologischen Proben. Eine feinere Struktur bei höheren Schalen zeigt sich bei den synthetischen Apatitproben.

Die Fourier-transformierten Funktionen (Abb. 6.8) beschreiben den Nahbereich um ein einzelnes Calcium-Atom. Quantitative Fits zeigen, daß die biologischen Proben aus ungeordnetem Hydroxylapatit bestehen, da alle Apatitschalen sehr gut angepaßt werden können. EXAFS-Messungen an Mäuseknochen [Harries et al. 88] und EXAFS-Studien an ACP zeigen ähnliche Schalen [Harries et al. 87], [Taylor et al. 98]. Es zeigen sich keine Anzeichen für eine weitere Calciumphosphat-Phase. Die erste Schale (Sauerstoff bei ca. 2 Å) ist in allen Fällen vergleichbar. Die größten Unterschiede sind in den höheren Schalen (2.5-4.5 Å) zu finden. Die biologischen Proben zeigen dort eine sehr hohe Unordnung. Dies zeigt deutlich der direkte Vergleich zwischen Callusknochen und synthetischen HAP in Abbildung 6.8 rechts oben. Die Distanz zwischen Calcium und seinen Nachbarn ist in den Knochenproben konstant, jedoch ist der Debye-Waller Faktor σ^2 in den Knochenproben höher, was auf eine höhere Unordnung hinweist. Die berechneten Werte für σ^2 beinhalten aber sowohl dynamische als auch statische Störungen. Nur der zweite Effekt hängt mit den Kristalldefekten und der Kristallitgröße zusammen.

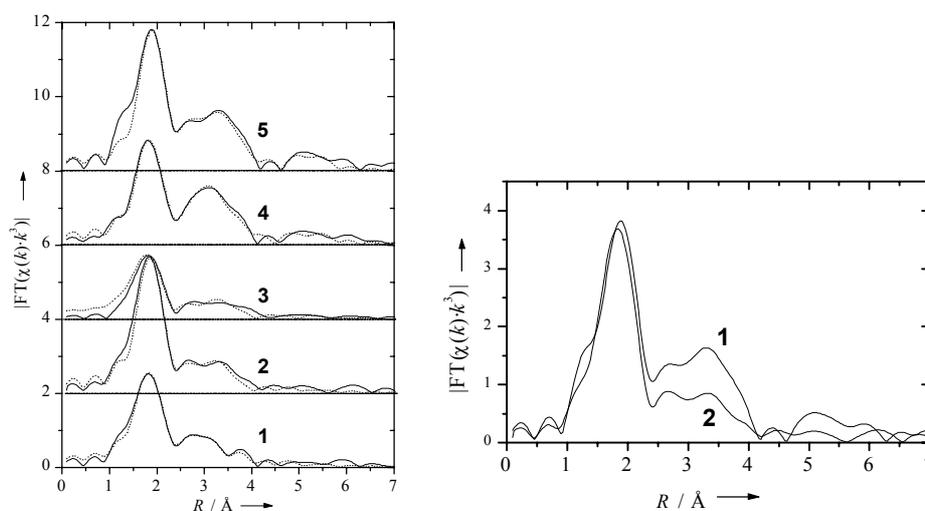


Abb. 6.8: Links: Fourier-transformierte EXAFS-Funktion (Ca-K-Kante) von 1. Tumorknochen; 2. Callusknochen; 3. „Kieler Knochenspan“; 4. Endobon® und 5. HAP Merck. Durchgezogene Linie: Experimentelle Daten; gestrichelte Linie: Theoretischer Fit an die Meßdaten. Rechts: Direkter Vergleich zwischen 1 HAP und 2 Callusknochen.

Schale	Ca-6 O	Ca-2.4 P	Ca-2.4 P	Ca-6 Ca	Ca- 2.4 Ca	Ca-3.6 Ca
HAP Kristallographische Werte ¹	2.32-2.41	3.03-3.36	3.46-3.67	3.99-4.08	4.17	5.45-5.84
HAP Merck	2.42/10	3.16/10	3.65/32	4.05/8	4.26/3	5.86/7
„Kieler Knochenspan“	2.40/20	3.16/20	3.66/40	3.92/23	4.17/14	5.68/36
Callusknochen	2.41/19	3.18/14	3.64/16	3.91/50	4.15/13	5.81/19
Tumorknochen	2.41/14	3.18/15	3.65/18	3.94/30	4.18/13	5.80/24
Endobon [®]	2.41/12	3.19/12	3.66/10	4.00/20	4.17/6	5.85/7

Tabelle 6.2: Quantitative Auswertung der EXAFS-Werte. Für jede Schale sind sowohl der Abstand zum Ca-Zentralatom [\AA] als auch der Debye-Weller Faktor $\sigma^2 \times 1000$ [\AA^2] angegeben. ¹ Kristallographische Werte aus [Posner & Diorio 58].

6.3.4 Ergebnisse der Thermoanalyse

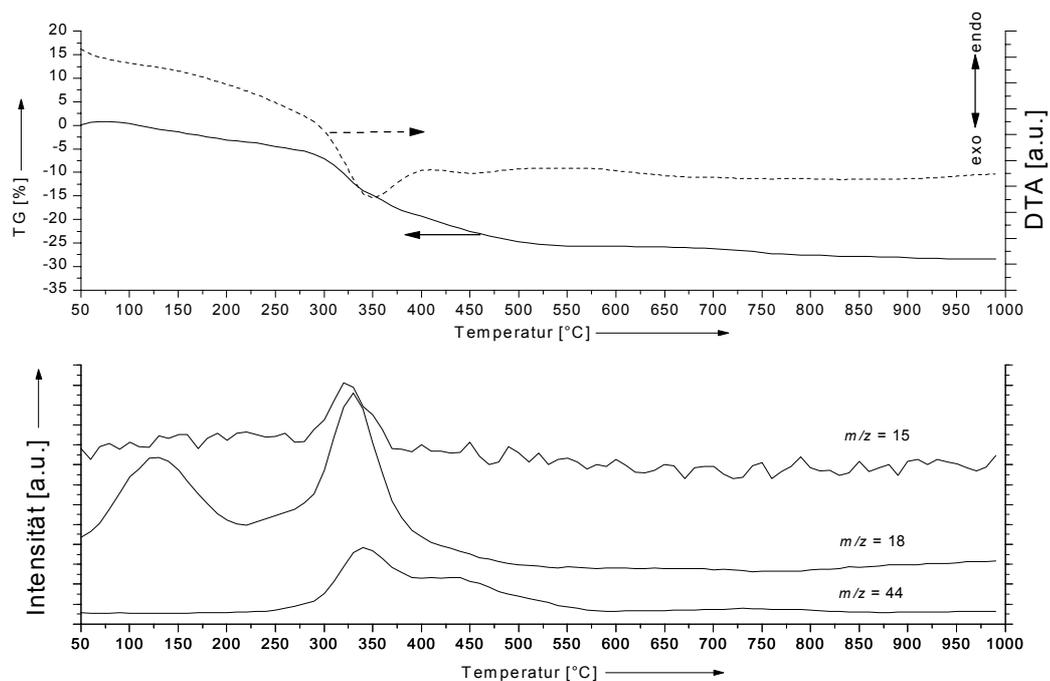


Abb. 6.9: Kombinierte Thermogravimetrie-Differenz Thermoanalyse-Massenspektrometrie (TG-DTA-MS) von Tumorknochen unter dynamischer Luftatmosphäre. Der Gewichtsverlust der Probe vollzieht sich in drei Schritten: 50-260°C (Wasser, $m/z = 18$); 260-600°C (Verbrennung der organischen Matrix, $m/z = 15, 18, 44$ und andere); und 650-850°C (Decarboxylierung des Carbonatapatits, $m/z = 44$). Durchgezogene Linie: relativer Massenverlust, gestrichelte Linie: DTA Signal.

Um die Gesamtzusammensetzung der Knochenproben und Knochenersatzmaterialien zu untersuchen, wurden thermoanalytische Messungen durchgeführt. Der Massenabgang vollzieht sich in drei unter Abbildung 6.9 beschriebenen Schritten. Nach Verbrennung der organischen Matrix verbleibt von 600-650°C die Carbonatapatit-

phase, welche ab 650°C einer Decarboxylierung unterworfen ist. Die Zusammensetzungen der vier Knochenproben und der Knochenersatzmaterialien sind sehr unterschiedlich. Wie schon aus den Histologien erwartet wurde und auch in den IR-Messungen ersichtlich, ist Tumorknochen wesentlich höher mineralisiert als Spongiosa. Callusknochen und „Kieler Knochenspan“ befinden sich vom Mineralisationsgrad her zwischen diesen beiden. Der Wassergehalt der Proben ist nahezu gleich, außer in den beiden gängigen Knochenersatzmaterialien Endobon® und Algipore®. Wenn man $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 \cdot x \text{CaCO}_3$ als vereinfachte Formel des Carbonatapatits annimmt, so läßt sich das Verhältnis von Calciumphosphat zu Calciumcarbonat gemäß folgender Formel aus dem Gewichtsverlust Δm zwischen 650 und 1000°C berechnen:

$$w(\text{CaCO}_3) = \frac{\Delta m \cdot M(\text{CaCO}_3)}{M(\text{CO}_2)} = \Delta m \cdot \frac{100,1}{44,0} = \Delta m \cdot 2,275 \quad (\text{Gl. 6.1})$$

Knochenprobe	H ₂ O [Gew-%]	Weichgewebe [Gew-%]	Mineralphase [Gew-%]	Carbonat [Gew-%]	Apatitgehalt [Gew-%]	Verhältnis Apatit: CaCO ₃ [w:w]
Callusknochen	6,9	47,7	45,4	1,4	44,0	31
Tumorknochen	5,7	21,2	73,1	5,2	67,9	13
Spongiosa A	5,7	57,9	36,4	2,4	34,0	14
Spongiosa B	5,4	68,4	26,3	0,6	25,7	37
"Kieler Knochenspan"	7,8	28,7	63,5	3,7	59,8	16
Endobon	0,0	0	100,0	0,0	100,0	∞
Algipore	0,3	(2,5)	97,2	1,0	96,2	96

Tabelle 6.3: Zusammensetzung der Knochenproben und Knochenersatzmaterialien nach Thermogravimetrie-Ergebnissen

Aus der Tabelle ergibt sich folgendes Bild: Der Carbonatgehalt im Knochen schwankt, je nach Alter, zwischen 2 und 6%. Literaturdaten gehen von einem Carbonatgehalt ab 3% aus, welcher auf bis zu 8% steigen kann [Posner & Betts 75], [Posner 85], [LeGeros 94]. Junger Knochen wie Callusknochen hat einen niedrigeren Carbonatgehalt. Der Anteil an Carbonat steigt mit dem Alter des Gewebes in dem Maße an, wie die Menge saurer Hydrogenphosphatgruppen abnimmt [Grynepas 93]. Ein DTA-Signal das die Bildung von Pyrophosphaten aus den aciden Hydrogen-

phosphat-Gruppen gemäß der Reaktionsgleichung [3.2] bei ca. 600°C anzeigt, konnte nicht detektiert werden [Greenfield et al. 74]. Der Mineralgehalt ist bei dem Tumorknochen am höchsten. Hier scheint die Aktivität der Herstellung von Knochenmineral vergrößert zu sein. Die Aussagekraft dieser Probenmenge ist jedoch sehr begrenzt. Im Vergleich der Knochen mit den Knochenersatzmaterialien ist der "Kieler Knochenspan" von seinen TG-Ergebnissen her den nativen Knochenproben am ähnlichsten, Endobon ist reiner hochgeglühter Hydroxylapatit, Algipore enthält ca. 1,0 Gew-% Carbonat und ca. 2,5% (stickstoff- und sauerstoffhaltige?) Fremdphase, die im Massenspektrometer nicht detektiert werden konnte. Literaturangaben besagen, daß diese Fremdphase, die auch nicht kristallin vorliegt aus im Mineral verbliebenen Ammoniumsalzen stammen kann [Dowker & Elliott 79], [Vignoles et al. 87].

Im direkten Vergleich zeigt Algipore[®] auch von den TG-Ergebnissen her unter den beiden artifiziellen im Gebrauch befindlichen Knochenersatzmaterialien die größte Ähnlichkeit mit den Knochenproben. Algipore[®] ist eindeutig thermodynamisch instabiler, enthält Carbonat und sollte somit höher löslich sein. Dies sollte sich nach physikalisch-chemischen und thermodynamischen Gesichtspunkten positiv auf die Resorbierbarkeit und den *remodeling*-Prozeß auswirken.

6.3.5 Rasterelektronenmikroskopische Ergebnisse

Die Knochen und Knochenersatzmaterialien wurden unter dem Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Abb. 6.10 A zeigt als Beispiel für native Knochenproben eine Aufnahme des Callusknochens (adhärentes Wasser wurde durch Trocknen *in vacuo* entfernt). Knochen besteht aus einer Struktur von Kollagenfibrillen, die, abhängig von der Art des Knochens und der Geometrie der Bruchstelle, regulär angeordnet ist. In dieser niedrigen Vergrößerung (97X) ist es nicht möglich, zwischen Hartgewebe ("Knochen") und Weichgewebe (Knochenmark, Fettgewebe) zu unterscheiden. Die Kristallite im Knochen sind, wie in den Röntgenbeugungsmessungen gesehen, sehr klein. In starker Vergrößerung lassen sich bei den nativen Knochenproben einzelne Kollagenfibrillen (Abb. 6.10 B) erkennen. Der Durchmesser einer solchen Fibrille beträgt ca. 100 bis 200 nm, und die Apatitkristalle sind innerhalb dieser Fibrillen angeordnet.

Nach Calcinieren auf 1000°C bleibt nur das Hartgewebe (Calciumphosphat) zurück, und die Struktur der anorganischen Phase wird sichtbar.

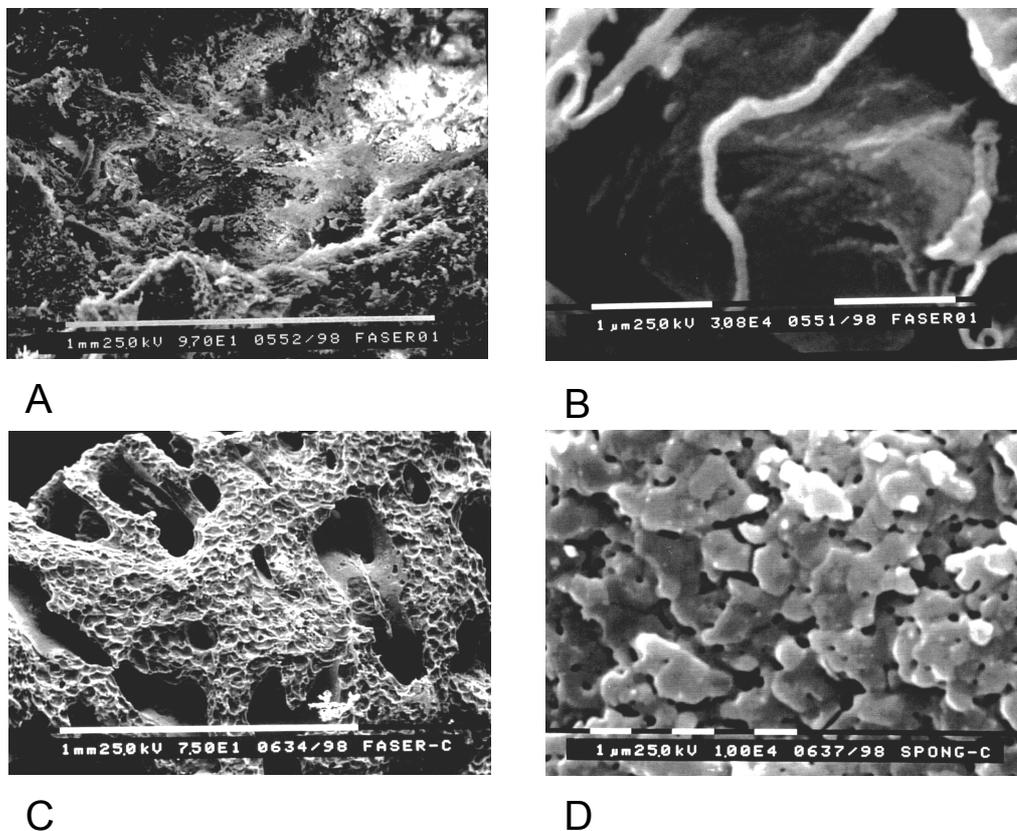


Abb. 6.10: REM-Aufnahmen von A: nativem Callusknochen (Vergrößerung 97X); B: einzelner Kollagenfaden im Callusknochen (30.000X); C: Calcinierter Callusknochen (75X); D: Calcinierte Spongiosa (10.000X).

Das gesamte organische Material wurde durch das Erhitzen entfernt, so daß die sichtbare Struktur nun aus gesinterten Apatitkristalliten besteht. Diese Strukturen, bestehend aus blättchenförmigen Apatitkristallen mit einem Durchmesser von 2-3 µm wurden in allen Knochenproben gefunden.

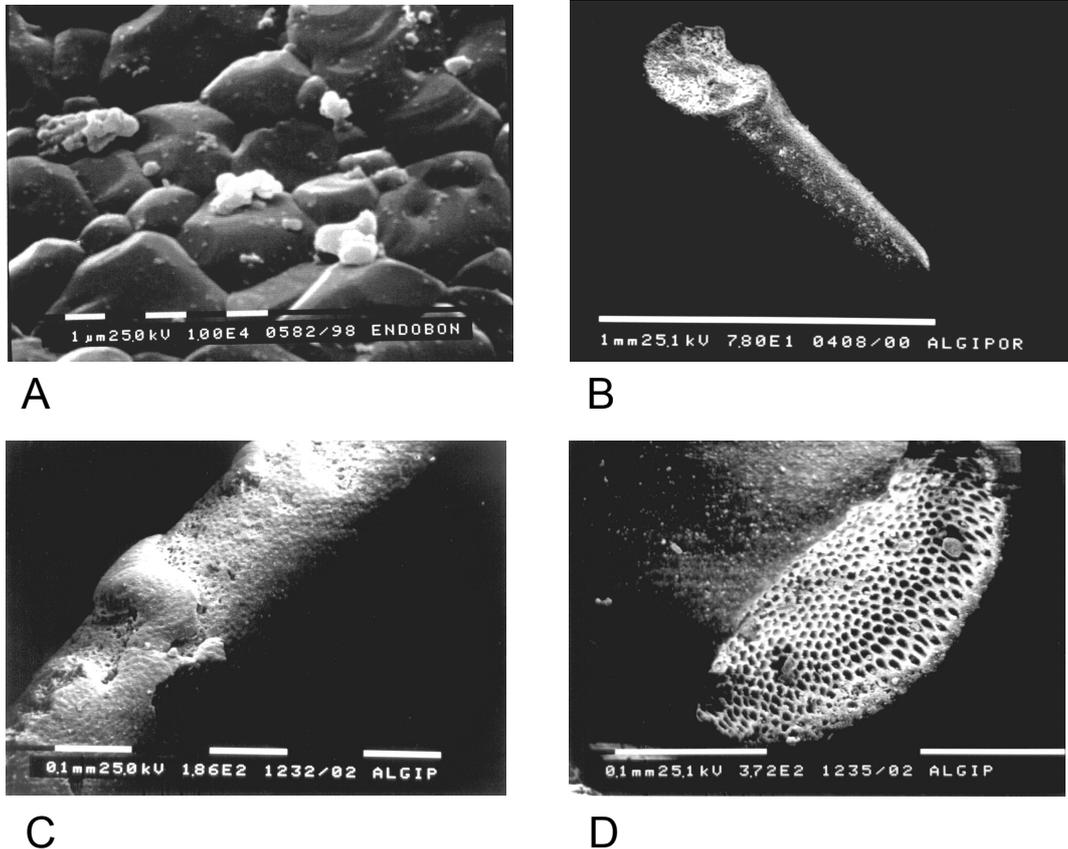


Abb. 6.11: A: Oberfläche von Endobon® (10.000X); B: Übersicht über ein Algipore®-Partikel (78X); C: Aufsicht auf die Oberfläche eines Algipore®-Partikels (186X); D: Einsicht in die poröse Struktur im Inneren von Algipore® (372X).

In Endobon® wurden ebenfalls kompakte, gesinterte Apatitkristalle mit einem Durchmesser von 3-6 µm Durchmesser gefunden. Die hohe Sintertemperatur führte zu größeren Kristalliten mit höherer Ordnung. Der Durchmesser der Aggregate in Endobon® ist ungefähr 100 mal größer als der von Apatitkristallen in nativem Knochen.

Die Struktur von Algipore® ist porös, die äußere Morphologie der Alge ist noch erkennbar. Kristallite sind auf der Oberfläche und in der Bruchfläche nicht differenzierbar. Die Struktur besteht aus vielen kleineren Partikeln, die in eine Überstruktur, vorgegeben durch die Alge, eingefügt sind. Die Oberfläche eines Algipore®-Partikels ist sehr glatt, mit vereinzelt, teilweise regelmäßig auftretenden Poren mit einem Durchmesser von ca. 0,5-1 µm. An den Bruchflächen ist das Innere des Partikels

erkennbar. Hier treten größere (5-10 μ m) und sehr regelmäßig angeordnete, teils wabenförmige, Poren mit dünnen Zwischenwänden auf.

6.3.6 pH-Verläufe in Wasser

Da Osteoblasten und vor allem Osteoklasten gegenüber pH-Schwankungen außerhalb des physiologischen Bereichs sehr empfindlich sind, wurde ein *in vitro* pH-Verlaufs-Test konzipiert. Dabei wurden jeweils 200 mg zermörserte Substanz der Knochenersatzmaterialien Algipore[®] und Endobon[®] sowie HAP von Merck in 100 ml doppelt destilliertem Wasser bei 37°C über 6 Wochen gerührt. In regelmäßigen Zeitabständen wurde der pH-Wert gemessen.

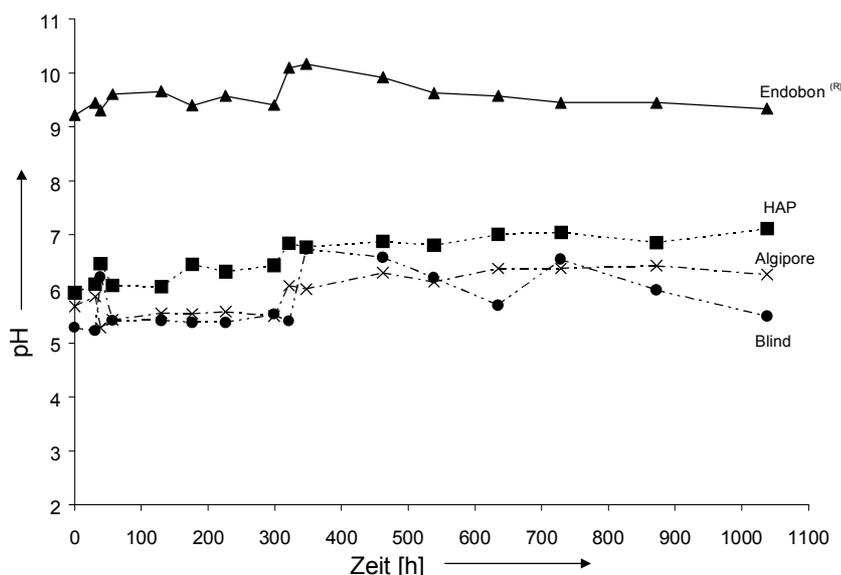


Abb. 6.12: pH-Verläufe der Knochenersatzmaterialien Endobon[®] (▲) und Algipore[®] (X), HAP von Merck (■) und einem Blindwert (●) in doppelt destilliertem Wasser über einen Zeitraum von 6 Wochen bei 37°C. Weitere pH-Verläufe aus dieser Serie sind in Abb. 10.4 aufgezeichnet.

In Abbildung 6.12 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Durch den Calciumoxid-Anteil im Endobon[®] steigt der pH-Wert gleich zu Beginn in alkalische Bereiche. Da sich das Material im thermodynamisch günstigsten Zustand befindet, erfolgt keine Umkristallisation bzw. Konversion in ein pH-neutraleres Material. Dieser pH-Bereich kann als zelltoxisch eingestuft werden. HAP von Merck bewegt sich mit der Zeit immer weiter in physiologisches Milieu, eine Tatsache, die mehrfach beobachtet wurde. Algipore[®] reagiert leicht sauer, bewegt sich aber im allgemeinen parallel zum Blind-

wert, was für ein relativ inertes Material spricht, welches den pH-Wert seiner Umgebung nicht beeinflusst.

6.3.7 Zusammenfassung

Sämtliche Apatite der Knochenproben sind sich bezüglich Kristallitgröße und Ausdehnung sehr ähnlich. Egal, ob es sich um einen Callusknochen ("junger", in einer Bruchstelle neu gewachsener Knochen), oder um Spongiosa handelt, sind die Dimensionen immer ähnlich. Es findet also keine Reifung zu größeren Kristalliten statt. Der schnelle *remodeling*-Prozeß in lebendigem Knochen wird durch die sehr kleinen, ungeordneten, carbonathaltigen und weit vom thermodynamischen Gleichgewicht entfernten Apatitkristallen unterstützt [Jemal & Khattech 89], [LeGeros 94].

Die Messungen zeigen, daß keines der hier untersuchten Knochenersatzmaterialien in Kristallitgröße, Carbonatgehalt oder thermodynamischer Stabilität den Werten des Knochenapatits ähnlich ist. "Kieler Knochenpan", ein älteres Knochenersatzmaterial, dessen Apatitphase bei der Herstellung aus Rinderknochen (Extraktion der Organischen Bestandteile [Collagen, Proteine] mittels halogenierter Kohlenwasserstoffe) nicht verändert wurde, zeigte in der klinischen Anwendung eine Immunabwehrreaktion des Körpers, da die Proteinbestandteile nicht quantitativ entfernt werden konnten [Boyde & Jones 96]. Durch das hohe Erhitzen des Endobon[®] (Herstellung aus Rinderknochen in einem zwei-Stufen-Erhitzungsprozeß: 1. Stufe 700°C, 2. Stufe 1100°C) ist das Material zum einen steril, zum anderen sind die organischen Bestandteile vollkommen entfernt. Der Knochenapatit wird durch diese Behandlung stark gesintert und das Carbonat wird entfernt, so daß zwar ein poröses und optisch knochenähnliches, jedoch hochkristallines, thermodynamisch sehr stabiles Material entsteht, welches gegen *remodeling*, ausgelöst durch Zellen (Osteoklasten) relativ resistent ist [deBrujin et al. 94].

Algipore[®] weist durch seine schonendere Herstellungsweise einen niedriger kristallinen, thermodynamisch instabileren, carbonathaltigen Hydroxylapatit auf. Die niedrigere Kristallinität, wie auch der Carbonatgehalt bewirken eine höhere Löslichkeit des Materials und sollten somit ein einfacheres remodeling ermöglichen. Die Existenz einer Fremdphase konnte nicht hinreichend geklärt werden; es weisen aber einige Fakten darauf hin, daß Reste von Ammoniumsalzen im Algipore[®] vorliegen, die

durch die thermische Behandlung mit dem Carbonat im Kristallgitter zu Cyanamiden reagieren. Die Literatur weist darauf hin, daß solche Vorgänge dann auftreten, wenn Aminogruppen mit Kohlendioxid in der Hitze reagieren [Vignoles et al. 87]. Ob Reste der Alge im Material vorhanden sind, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden. Die Entstehung von Tricalciumphosphat und Tetracalciumphosphat beim Erhitzen von Algipore® deutet auf einen kristallinen, nahezu stöchiometrisch aufgebauten Apatit hin [LeGeros 94].

Die niedrigste Kristallinität aller hier untersuchten artifiziellen Materialien wies Hydroxylapatit (für Biomaterialien) von Merck auf, welches offensichtlich durch Fällung an Luft hergestellt wurde. Hier fehlt jedoch eine strukturgebende Komponente (Porosität, Form), um es pur als Knochenersatzmaterial einzusetzen. Dieses Calciumphosphat ist nur für Compositmaterialien geeignet. Ebenso sind hier die Kristallinität und somit die thermodynamische Stabilität noch wesentlich höher als bei den Knochenproben. Der sehr geringe, mit guten Thermowaagen nicht meßbare Carbonatgehalt dürfte dagegen in der Praxis die Löslichkeit des Apatits nicht merklich erhöhen [Elliott 94].

Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen die morphologische Ähnlichkeit von „Kieler Knochenspan“ und Endobon® mit nativem Knochen. Es zeigte sich, daß interkonnektierende Porensysteme in der Größe von ca. 200-400 µm die Migration von Osteoblasten und Osteoklasten in das Implantat fördern [Rueger et al. 98]. Kleinere Poren fördern die Versorgung der Knochenzellen. Daher können sich die glatte Oberfläche sowie die kleineren Poren des Algipore® nachteilig auf die Resorption auswirken, da zwar die Versorgung und Vaskularisation, nicht jedoch das Eindringen von Knochenzellen in das Knochenersatzmaterial gefördert wird.

Die pH-Verläufe zeigen für Endobon® eine erwartungsgemäß alkalische Reaktion, da durch den Sinterungsprozeß CaO entstanden ist. Dies kann zum Zelltod führen [Chou et al. 99]. *In vitro*-Experimente mit Osteoblastenkulturen an nicht optimal pH-neutralem Material bestätigten diese Annahme (siehe Kapitel 10). HAP von Merck, welches oft als Beimischung von Compositmaterialien verwendet wird, zeigt bei den pH-Versuchen einen Verlauf hin in den neutralen Bereich, während sich Algipore® nahezu pH-inert verhält. Dies kann als vorteilhaft für die zelluläre Umgebung *in vivo* gewertet werden.

7. Pathologische Biomineralisationsvorgänge - Untersuchung der Chondrocalcinose

7.1 Pathologische Kristallisation

Neben den gewollten Biomineralisationsvorgängen im menschlichen Körper, wie das Knochen- und Zahnwachstum, erfolgen auch diverse ungewollte Mineralisationsvorgänge, wie beispielsweise die Bildung von Nierensteinen, Gallensteinen, Harnsteinen, Zahnstein, das weite Feld der kardiovaskulären Calcifikationsvorgänge und Verkalkungen von Implantaten (Katheter und Prothesen) sowie die Calcifizierung von Gelenken. Diese Mineralisationsvorgänge nennt man *pathologische* oder *ektopische* Mineralisation oder Calcifikation. Während die Ablagerung von Calciumphosphaten sowohl physiologischen als auch pathologischen Ursprung haben kann, ist die Ablagerung von Calciumoxalat ausschließlich pathologischer Natur. Es existieren große Ähnlichkeiten zwischen beiden Mineralisationsvorgängen, beispielsweise erfordern beide Vorgänge eine lokale Übersättigung, alle treten auf in der Gegenwart von keimbildenden Substraten (Oberflächen) und werden, positiv wie negativ, durch eine Anzahl von Modulatoren (Inhibitoren oder Promotoren) beeinflusst. Beispielsweise ist menschlicher Speichel 2- bis 5-fach bezüglich Calcit übersättigt, die Kristallisation von Zahnstein und die Verkalkung der Speicheldrüsen wird hauptsächlich durch zwei spezifische Speichelproteine (Statherin, ein Phosphoprotein und die sauren Prolinreichen Proteine (PRP)) inhibiert [Hay et al. 86]. Eine der wichtigsten Gemeinsamkeiten scheint zu sein, daß beide Formen der Kristallisation Membranen einbeziehen, deren Phospholipide eine wichtige Rolle beim Beginn der Mineralisation spielen. Der Beginn der Mineralisation ist nur eine Stufe der dreiphasigen Bildung von Mineralablagerungen. Erst die Akkumulation (Phase 2) und das Ausreifen (Wachsen) der akkumulierten Kristallite (Phase 3) führen zu Beschwerden [Khan & Hackett 94].

Cardiovaskuläre Calcifikation bezeichnet die gemeinhin als „Arterienverkalkung“ beschriebenen Vorgänge, die zu einer lebensgefährdenden Krankheit, der *Artherosklerose* führen kann. Auch die Calcifizierung von Implantaten im Vaskularbereich (z.B. künstliche Herzklappen) wird in diesem Rahmen untersucht. Das humane Blutserum ist bezüglich DCPD untersättigt, bezüglich OCP leicht und bezüglich HAP stark übersättigt [Eidelman et al. 87]. Der Bildung von Calciumphosphatablagerungen in den

Blutgefäßen geht die Ablagerung von Cholesterin, die Bildung von *Plaque*, voraus. Nichtkollagene Matrixproteine werden als die Stelle der Bildung von Gewebe- Ca^{2+} -Komplexen postuliert, welche dann in dem oben beschriebenen Drei-Phasen-Mechanismus zur Verkalkung führen kann. Die Plaquebildung an den Arterienwänden nimmt mit zunehmendem Alter an Dicke und Dichte zu. Die am dichtesten calcifizierten Plaquebereiche wurden in pathologischen Untersuchungen an Stellen beobachtet, an denen ein verheilter Riß im Plaque aufgetreten war. Erosionen an der Plaqueoberfläche wiesen nur gering calcifizierte Bereiche auf [Burke et al. 2000]. Die Mineralablagerungen sowohl in den Blutgefäßen als auch an den Prothesen bestehen aus einem Na und Mg-haltigen Carbonatapatit folgender Formel [Tomazic 94]:



Im Sinne der Konversion von ACP zu nanokristallinen und nichtstöchiometrischen HAP (siehe Kapitel 3.3.3) wurde ein Konversionsmodell von ACP über OCP zu dem mit obiger Formel beschriebenen apatitischen Produkt vorgeschlagen [Tomazic 94]. Die Bildung von Ablagerungen erfolgt zunächst intrazellulär; diese werden beim Zelltod freigesetzt. Die extrazellulären Partikel kombinieren und wachsen zu größeren Strukturen heran, bis, bei Erwachsenen nach der vierten Lebensdekade, ein Umbau in, bzw. eine Bildung von Knochen als letzter Schritt auftritt (*Knöcherner Metaplasie*) [Stary 00]. Die Bildung von Carbonatapatiten auf implantierten Calciumphosphat-Keramiken *in vivo* wurde als Heterogenkeimbildungsmechanismus im Sinne eines Auflösungs-Rekristallisationsprozesses des Calciumphosphats beschrieben [Daculsi et al. 90], aber auch *Osteoinduktion* (Stimulierung der Knochenbildung) als Folge der subkutanen Implantation (unter die Haut) von Apatitkeramiken wurde beobachtet [Yuan et al. 99]. Die Kristallisation von Calciumsalzen *in vivo* aus übersättigtem Medium sei hiermit als *passive Mineralisation*, die Knochenbildung, die gemäß oben genannter Mechanismen der passiven Kristallisation nachfolgt, als *aktive Mineralisation* bezeichnet [Schinke et al.99].

7.2 Chondrocalcinose der Kniegelenksmenisken

Das Kniegelenk ist das größte Gelenk des menschlichen Körpers. Es ist ein zusammengesetztes Gelenk, in dem *Femur* (Oberschenkelknochen), *Tibia* (Schienbeinknochen) und *Patella* (Kniescheibe) sowie zwei *Faserknorpelringe* (*Menisken*) miteinander in gelenkiger Verbindung stehen. Durch die beiden aus Knorpelgewebe bestehenden Menisken (*medialer* und *lateral* Meniskus) werden die Gelenkflächen von Femur und Tibia einander angepaßt und die kraftaufnehmende Fläche wird vergrößert (Abb. 7.1).

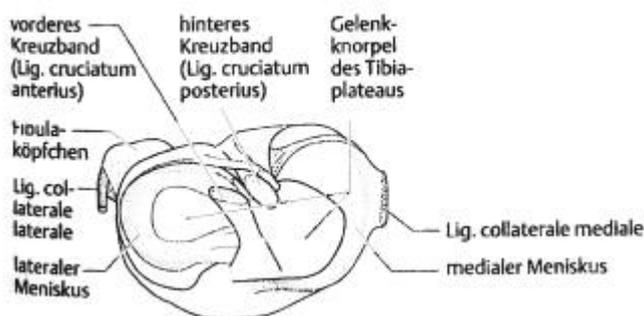


Abb. 7.1 Bandapparat eines rechten Kniegelenks. Aufsicht auf das Tibiaplateau (Femur entfernt und Bandapparat durchtrennt). Aus [Faller 99].

Bei Beugung im Kniegelenk führt der Femur eine kombinierte Gleit- und Rollbewegung auf der tibialen Gelenkfläche durch, wodurch die Menisken mit zunehmender Beugung nach hinten verlagert werden.

Pathologische Mineralisationsphänomene im Kniegelenksbereich werden als *Chondrocalcinose* bezeichnet. Dabei können im *Synovialfluid* (Kniegelenksflüssigkeit) durch Polarisationslichtmikroskopie Calciumpyrophosphat-dihydrat- (CPPD-) Kristalle durch die Doppelbrechung nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Tatsache wird das Leiden auch als *CPPD-disease* (CPPD-Krankheit) bezeichnet. Die Chondrocalcinose führt zur akuten und chronischen *Arthritis* (Gelenkentzündung), welche auch als *Pseudogicht* bezeichnet wird. Nicht nur das Synovialfluid, sondern auch das Meniskusgewebe zeigt Kristallablagerungen, deren Ausmaß mit höherem Lebensalter zunehmen [Maddison et al. 98]. Die arthritischen Symptome werden vor allem durch den Übertritt der Kristalle in die Gelenkhöhle erklärt, was zu einer *Kristallsynovialitis* führen kann [Brandes & Müller 95]. Zum Teil wurde die Chondrocalcinose als eigenständiges Krankheitsbild oder als Folge allgemeiner, mit dem Alter fortschreitender degenerativer Meniskusveränderungen angesehen. Diverse Autoren be-

schreiben die Chondrocalcinose als Folge einer früheren Verletzung bzw. eines Risses im Meniskusgewebe durch operative Eingriffe oder Traumata [Fisseler-Eckhoff et al. 89], [Hough & Webber 90]. Durch Verletzungen im Gelenkbereich werden große Mengen an Proteoglycanen ausgeschüttet, die offensichtlich die Kristallisation von Calciumpyrophosphat fördern können. Die Proteoglycan-Mengen bei arthritischen bzw. chondrocalcinotischen Patienten sind ähnlich denen bei Verletzungen [Lohmander et al. 89].

Zumeist wird jedoch die Chondrocalcinose als lokale Stoffwechselstörung und nicht als Traumafolge aufgefaßt [McCarty et al. 66]. Oft tritt die Chondrocalcinose beispielsweise im Zusammenhang mit Fehlfunktionen der Schilddrüse auf [Hough & Webber 90]. Anorganisches Pyrophosphat ist eines der Hauptzwischenprodukte des menschlichen Energiestoffwechsels (ATP/ADP-Synthese) und wird im Laufe der meisten biosynthetischen Reaktionen in Verbindung mit Makromolekülsynthesen (Protein-, Lipid-, Proteoglycansynthese etc.) gebildet. Es konnte gezeigt werden, daß *Chondrozyten* (Knorpelzellen) ein hohes Konzentrationsniveau an Pyrophosphat besitzen. Wenn Chondrozyten also bei Reparaturvorgängen nach einer Verletzung intensive Makromolekülsynthese betreiben, so wird auch verstärkt Pyrophosphat gebildet. Das so in der Zelle entstehende Pyrophosphat wird normalerweise in der Zelle durch verschiedene Enzyme (z. B. Pyrophosphatase in den Mitochondrien, vgl. auch Kapitel 3.1.1) abgebaut. Es kann aber auch durch Ausschleusung bei der Sekretion von z.B. Proteoglycanen durch die Zellmembran in den Extrazellulärraum gelangen. Quantitativ bedeutender dürfte allerdings die Pyrophosphatausschüttung durch Zelltod oder Zellschädigung sein. Das extrazellulär angefallene Pyrophosphat kann durch die alkalische Phosphatase zu zwei Molekülen Orthophosphat abgebaut werden oder aber mit ebenfalls dort befindlichem Calcium zu CPPD auskristallisieren. Zunächst soll dabei die instabilere aber kinetisch begünstigte monokline Zwischenform auskristallisieren, welche dann langsam zu der thermodynamisch stabileren triklinen Endform umkristallisiert. Welcher Weg letztlich eingeschlagen wird, hängt von der Calciumkonzentration und der jeweiligen Enzymaktivität ab. Bei Patienten mit Chondrocalcinose ist im Synovialfluid die Enzymaktivität vermindert und die Calciumkonzentration erhöht.

Wegen des Austritts von Pyrophosphat aus den (geschädigten) Zellen sind die Kristallablagerungen in Nachbarschaft zu den Knorpelzellen am höchsten [Fisseler-Eckhoff et al. 89]

Neben CPPD soll auch sogenanntes BCP (basisches Calciumphosphat), welches, je nach Autor, aus HAP und DCPD [Hough & Webber 90], carbonathaltigem HAP, OCP und wenig TCP [Halverson et al. 90], oder aus HAP, OCP und TCP bestehen soll [Maddison et al. 98], in den Kristallablagerungen des chondrocalcinotischen Kniegelenks vorkommen. In anderen Untersuchungen mit röntgenpulverdiffraktometrischen Techniken zeigte sich neben CPPD auch TCP in chondrocalcinotischen Zwischenwirbelscheiben, weiterhin konnten in zwei Fällen chondrocalcinotischer Menisken diverse, diffuse Reflexe nicht zugeordnet werden [Mohr et al. 74], [Mohr et al. 79]. Tricalciumphosphat wurde als Vorstufe biologischer Apatite vermutet, konnte jedoch nie direkt nachgewiesen werden. In Reinform ist es nur in der Hitze herstellbar und existiert nicht in wäßrigen Systemen [LeGeros 94], [Elliott 94].

Topographisch sind die Innenmenisken (mediale) häufiger von der Kristallablagerung betroffen als die Außenmenisken (laterale) [Fissler-Eckhoff 89].

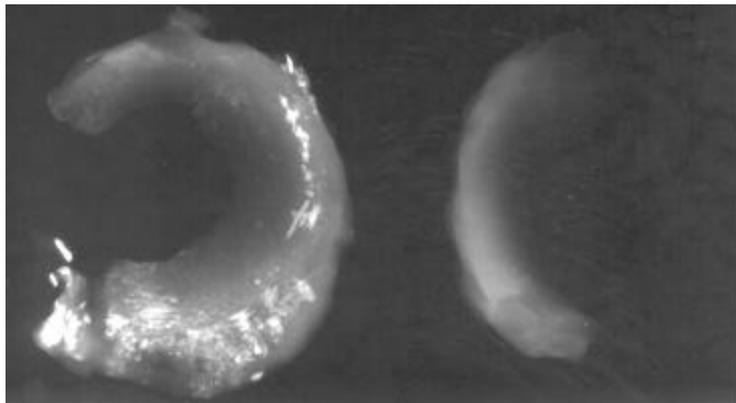


Abb. 7.2: Röntgenaufnahme (Originalgröße) eines gesunden (rechts) und eines calcifizierten (chondrocalcinotischen) Meniskus (links).

Röntgenologisch zeigt sich bei degenerativ veränderten Menisken eine unruhigere, durch deutliche Kontrastunterschiede geprägte Struktur. Die Menisken sind streifig und fleckig verkalkt (Abb. 7.2). Es handelt sich dabei um fleckige oder zottige, teils zu Streifen zusammenfließende, röntgendichte Herde, die sich oft an der Faserstruktur der längsgerichteten Meniskusfasern orientieren und parallel zu diesen angeordnet sind. Im Gegensatz dazu zeigt ein Röntgenbild eines „gesunden“ (uncalcifizierten) Meniskus eine homogene Verteilung.

7.2.1 Untersuchung der Kristallablagerungen in chondrocalcinotischen Menisken

Die medizinische Diagnostik stützt sich auf Tatsachen, die oft auf Erfahrungswerten beruhen. Dabei sei beispielsweise die Diagnose der Chondrocalcinose durch im polarisierten Licht doppelbrechende Kristalle genannt. Die Diagnostik ist sicherlich richtig, jedoch zeigt auch das Literaturstudium, daß nicht klar ist, ob und wann welche Calciumphosphatphasen auftreten. Daher wurden in dieser Arbeit zwei Chargen calcifizierter Menisken mit verschiedenen Methoden präpariert und mittels moderner festkörperchemischer Methoden untersucht.

7.2.1.1 Untersuchungen an frischem Meniskusgewebe

In einer ersten Untersuchungsreihe wurden vier röntgenologisch als chondrocalcinotisch identifizierte Menisken und ein gesunder Meniskus (siehe Tabelle 7.1) untersucht. Die explantierten Menisken wurden zuvor röntgenographisch wie in Abb. 7.2 dargestellt untersucht und aufgrund dieser Befunde in „stark mineralisiert“, „schwach mineralisiert“ und „keine feststellbare Mineralisation“ unterklassifiziert. Außerdem wurden zur Untersuchung nur besonders „röntgendichte“ Bereiche herangezogen. Zunächst wurde Wert darauf gelegt, möglichst frisches Gewebe zu untersuchen, da keine der normalerweise verwendeten Methoden (Verbrennung der organischen Phase oder Deproteinierung mittels Hydrazin oder hypochloriger Säure) mit Sicherheit gewährleistet, daß die kristalline Phase unverändert bleibt. Außerdem sollte bei den angewendeten empfindlichen Meßverfahren auch ein Überschuß an Knorpelgewebe, Wasser und Lipiden nur geringen Einfluß auf die Charakterisierbarkeit der kristallinen Fremdphase haben.

	<i>Geschlecht</i>	<i>Alter [Jahre]</i>	<i>Röntgenbefund</i>
M 1	w	65	stark mineralisiert ¹
M 2	m	k. A. ¹	stark mineralisiert
M 3	w	78	schwach mineralisiert
M 4	w	k. A.	nichts feststellbar
M 5	m	66	schwach mineralisiert

Tabelle 7.1: Charakterisierung und röntgenologischer Befund der ersten Charge Menisken. ¹k.A.-keine Angaben vorhanden.

Die Meniskenstücke wurden daher über Nacht in Formalin eingelegt, am nächsten Tag trocken getupft und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die gefrorenen Stücke wurden mittels eines elektrischen Mörsers pulverisiert. Das so gewonnene Pulver wurde mittels Synchrotronstrahlungsmethoden und FTIR vermessen.

Die Infrarot-Spektren zeigen im Vergleich zu Hydroxylapatit von MERCK als Referenzsubstanz nur geringe Anzeichen für die Existenz von Calciumphosphaten. Eine breite Bande bei 1035 cm^{-1} deutet auf die P-O Streckschwingung von Apatiten hin (siehe Abb. 3.9 und Tabelle 3.4), jedoch fehlen die Streckschwingungsbanden bei $560\text{-}605\text{ cm}^{-1}$ völlig. Außerdem ist die Bande bei 1035 cm^{-1} auch bei dem röntgenologisch als calciumsalzfrei identifizierten Meniskenstück M 4 sichtbar.

IR Wellenzahlen [cm^{-1}]	Schwingungen
1035	P-O Streckschwingung aus Calciumphosphaten, C-OH, P-O-Alkyl
1242	P=O Valenzschwingung aus organischen Phosphaten, Esterschwingung
1337	Esterschwingung, O-H Deformationsschwingung aus Wasser
1450	C-O Streckschwingung aus Carbonat, C-H Deformationsschwingung aus Alkylen
1640	H-O-H Bindungs- und Rotationsschwingungen von freiem Wasser
2930	C-H Valenzschwingungen aus Alkylen
3432	O-H Streckschwingung von freien Wassermolekülen

Tabelle 7.2: Infrarot-Banden der Meniskenstücke und ihre Zuordnung nach [Hesse et al. 95].

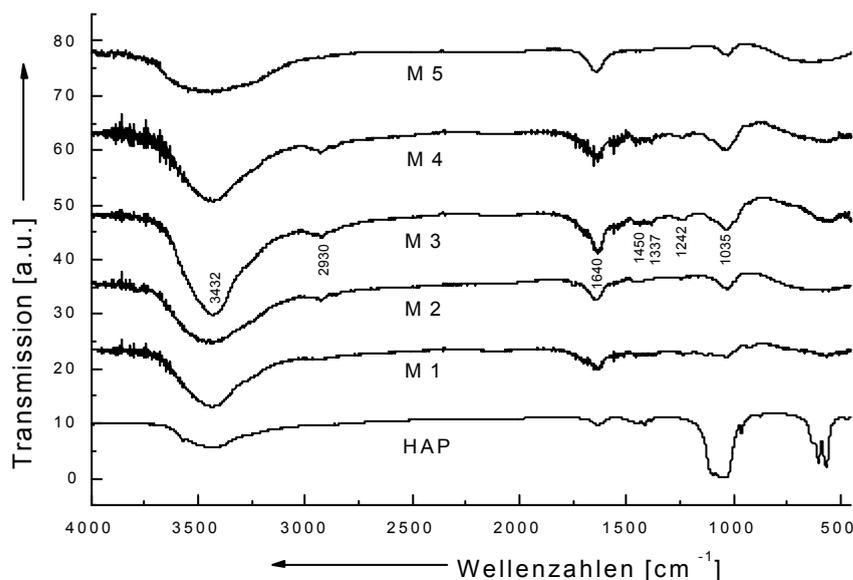


Abb. 7.3: FTIR-Messungen der Menisken M1 bis M5 sowie HAP von MERCK als Referenzsubstanz. Beim Meniskenstück M3 sind die Banden mit den Wellenzahlen bezeichnet.

Aus Tabelle 7.2 folgt, daß die IR-Messungen hauptsächlich auf organische Bestandteile des Knorpelgewebes hinweisen. Neben Alkylen und Estern sind auch Phosphorsäureester sowie eine große Menge Wasser erkennbar. Trotz der Empfindlichkeit dieser Methode führten infrarotspektroskopische Untersuchungen in diesem Fall nicht zum gewünschten Ergebnis.

Die pulverisierten Proben wurden weiterhin mittels Röntgenpulverdiffraktometrie am Strahl B2 des HASYLAB in Transmission auf einem Kapton-Folienträger mit Sollerblende vermessen.

In Abbildung 7.4 ist erkennbar, daß außer einem amorphen Halo im Bereich von $15-22^\circ 2\theta$, der von der Kapton-Folie herrührt, keine Reflexe differenzierbar sind. Trotz der hohen Empfindlichkeit auch dieser Methode ist kein Hinweis auf CPPD oder ein anderes Calciumphosphat zu finden. Dies kann ein Hinweis auf die amorphe Natur der Calciumsalz-Partikel in den Meniskenstücken sein. Amorphe Salze könnten auch durch ihre geringe Korngröße in medizinischen Röntgenuntersuchungen besonders „röntgendicht“ erscheinen. Jedoch widerspricht das der Tatsache, daß bei Chondrocalcinose unter dem Lichtmikroskop doppelbrechende Kristalle erkennbar sein sollen.

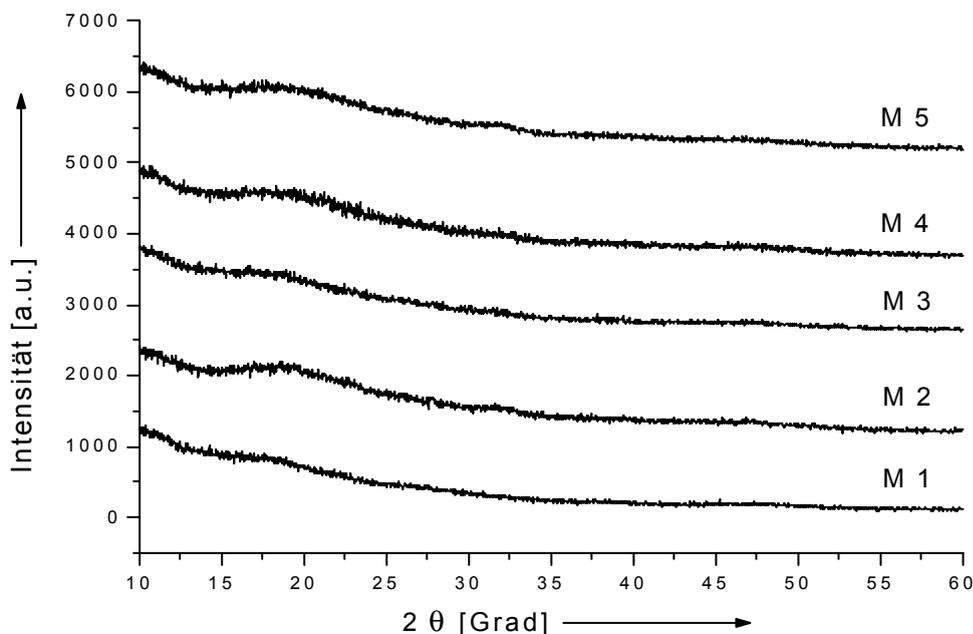


Abb. 7.4: Röntgenpulverdiffraktometrie der Meniskenstücke der ersten Versuchsreihe am Strahl B2 des HASYLAB.

Die EXAFS-Messungen zeigen erstmals in dieser Reihe eine Calcium-Absorption an der Ca-K-Kante. Die gewonnenen Daten stimmen mit den radiologischen Befunden überein: stärker calcifizierte Gewebe zeigen eine stärkere Absorptionskante. Der Meniskus M4, der laut Röntgenbefund calciumfrei sein soll, zeigt tatsächlich keine Calcium-Absorption (Abb. 7.5). Die Menge an Calciumsalz ist sehr gering, so daß die Spektren schwierig auszuwerten waren.

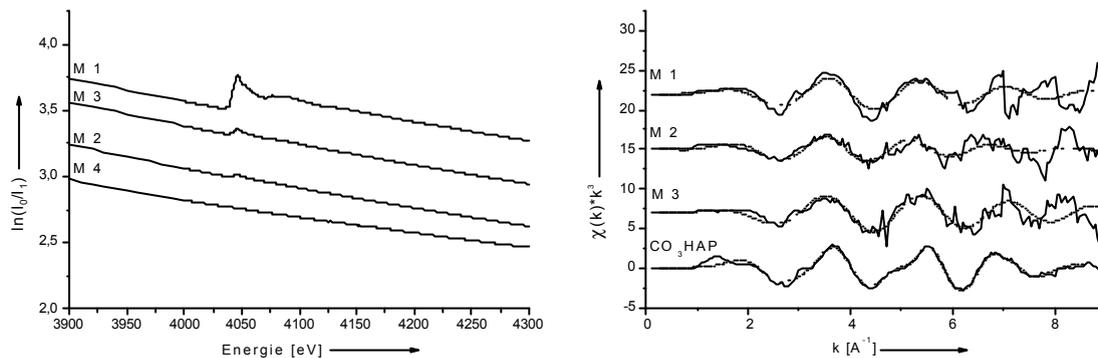


Abb. 7.5: Links: Ca-K-EXAFS-Spektrum der Meniskenproben. Aufgetragen ist die Absorption gegen die Energie. Deutlich zu sehen ist die Ca-K-Absorptionskante bei den chondrocalcinotischen Menisken. Rechts: $\chi(k)$ -Auftragung der Messungen. Als Vergleichssubstanz hinzugefügt ist auch eine Messung von carbonathaltigem Apatit.

Der Fourier-transformierte Plot gegen den Abstand in Ångström ausgedrückt zeigt ein apatitisches Gitter, wobei das Spektrum bis maximal zur dritten Schale auswertbar ist. Das Spektrum ist hier noch zum Vergleich mit einem amorphen carbonathaltigen Calciumphosphat, welches mit dem stöchiometrischen C/P-Verhältnis in Lösung von C/P=0.1 gefällt wurde, und mit Hydroxylapatit von MERCK aufgetragen.

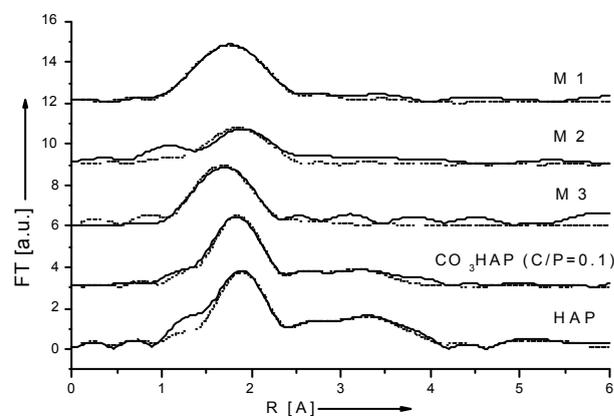


Abb. 7.6: Fourier-Transformiertes EXAFS-Spektrum. Als Vergleichsspektren sind hier noch HAP von MERCK und ein carbonathaltiger Hydroxylapatit vom B-Typ mit einem molaren C/P-Verhältnis in Lösung von C/P=0.1 gefällt angegeben. Durchgezogene Linie: experimentelle Ergebnisse, gestrichelte Linie: Theoretische Fitfunktion.

Das Fourier-transformierte Spektrum (Abb. 7.6) zeigt, daß die erste Schale um Calcium in einem vergleichbaren Abstand (ca. 2 Å) liegt. Größere Unterschiede zeigen sich in den ferneren Schalen (2,5-5 Å), wo größere Unordnung in den biologischen Proben einen akzeptablen Fit verhindert. Somit konnte bei diversen Messungen nur die erste Schale verlässlich angepaßt werden (siehe Tabelle 7.3). Es zeigt sich eine große Ähnlichkeit zwischen der Mineralphase im calcifizierten Meniskus und der Messung von carbonathaltigen Hydroxylapatit, dessen Gitter durch den Einbau von Carbonat in die Phosphat-Positionen Störungen aufweist (siehe Kapitel 3.3.4).

Mathematisch konnten die Fourier-transformierten Funktionen bis maximal zur dritten Schale berechnet werden. Die hohen Werte der Debye-Weller-Faktoren (Tabelle 7.3) zeigen, hauptsächlich bei dem Meniskus M2 (der auch in Abbildung 7.5. links den geringsten Kantenhub aufweist), daß die theoretischen Fitfunktionen ein hohes Maß an Unordnung aufweisen.

Schale	Ca-6 O	Ca-2.4 P	Ca-3 P	Ca-6 Ca	Ca-2.4 Ca	Ca-3.6 Ca
HAP synthetisch	2.42/8	3.17/9	3.63/18	4.06/9	4.26/3	5.85/7
Carbonathaltiger Apatit C/P=0.1	2.41/11	3.17/15	3.68/23	4.00/27	4.18/15	5.82/22
Meniskus M1	2.35/10	3.23/13	3.49/8	-- ¹	--	--
Meniskus M1	2.47/12	3.27/10	3.57/11	--	--	--
Meniskus M2	2.40/23	--	--	--	--	--
Meniskus M2	2.35/26	--	--	--	--	--
Meniskus M2	2.48/21	--	--	--	--	--
Meniskus M3	2.32/10	--	--	--	--	--
Meniskus M3	2.37/23	--	--	--	--	--

Tabelle 7.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der EXAFS-Messungen. Für jede Schale sind sowohl der Abstand zum Ca-Zentralatom [Å] als auch der Debye-Weller-Faktor $\sigma^2 \times 1000$ [Å²] angegeben. Die Koordinationsnummern sind fest.¹ Die gestrichelten Werte deuten darauf hin, daß durch die hohe Unordnung im Kristallgitter und durch die niedrige Güte der Messung kein Fit an die Meßwerte möglich war.

Der geringe Kantenhub der Messungen der Menisken (vgl. Abb. 7.5) erschwerte die Auswertung. Nur beim Meniskus M1 konnten drei Schalen angefitet werden. Zur Verdeutlichung der Streuung sind jeweils mehrere Messungen der calcifizierten Menisken aufgeführt.

7.2.1.2 Untersuchungen an getrockneten und geglühten Menisken

Thermogravimetrische Untersuchungen an den übriggebliebenen Meniskenstücken der ersten Serie zeigten, daß ca. 1-4 % des gesamten Gewebes aus Feststoff besteht, welcher durch Glühen bei einer Temperatur von 1200°C übrigbleibt und u.U. aus der gesuchten Mineralphase bestehen kann. Nur in einem Fall (M5) stand ein nahezu ganzer Meniskus zur Verfügung (2772 mg), wobei 31.3 mg Substanz (entspricht 1.1%) gewonnen werden konnte. Die TG-Messungen zeigten außerdem, daß nach 800°C kein Gewichtsverlust oder ein thermisches Ereignis mehr stattfand.

Aufgrund dieser Tatsache wurden in einer zweiten Serie sieben ganze Menisken nach der Explantation sofort in Formalin eingelegt, danach trockengetupft und eine Woche lang in einem Vakuumexsikkator über P_4O_{10} entwässert. Die entwässerten (mumifizierten) Menisken wurden dann in getrocknete Porzellantiegel überführt und über Nacht bei 800°C geglüht. Durch Ein- und Auswaagen konnte so gravimetrisch der Wassergehalt, der Gehalt an organischer Substanz (Knorpelgewebe, Fettgewebe) und somit der prozentuale Mineraliengehalt ermittelt werden. Anhand des Meniskus M7 kann in Abbildung 7.7 der Schrumpfungsprozeß des frisch explantierten Meniskus (A) nach dem Trocknen im Vakuumexsikkator (B) gezeigt werden. Nach dem Trocknen sind bei allen chondrocalcinotischen Menisken mehr oder weniger deutliche weiße Herde von mineralisierten Bereichen zu erkennen. Dabei sind diese entweder streifig über den ganzen Meniskus entlang der Knorpelfasern orientiert (Abb. 7.7 C) oder die Kristalle bilden punktförmige Agglomerationen, oft senkrecht zur Faserstruktur der Menisken, die zu größeren Herden zusammengelagert sind (Abb. 7.7 D).

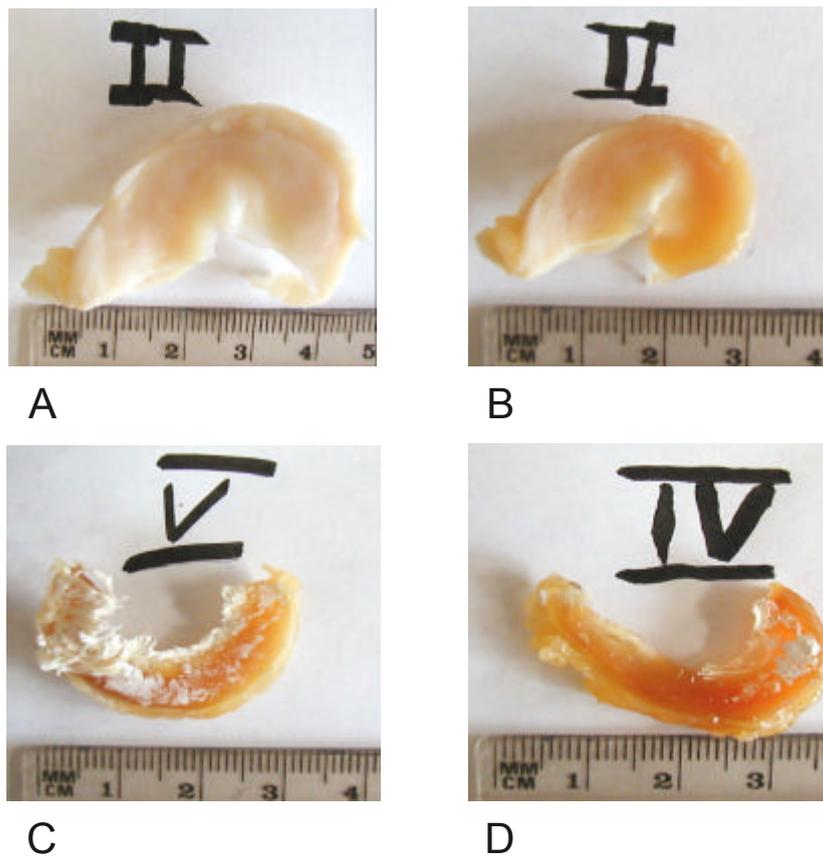


Abb. 7.7: Photos des Meniskus M 7 vor (A) und nach der Trocknung (B) im Vakuumexsikkator. Die entwässerten Menisken C (M10) und D (M9) zeigen schon bei nativer Betrachtung deutliche Kristallherde.

Bezeichnung	Geschlecht	Alter	Charakter	Einwaage [mg]	Wasser [Gew-%]	Mineralphase [Gew-%]	Organische Bestandteile [Gew-%]
M6	w	73	sehr hart	1668	73	0,03	27
M7	m	69	ziemlich hart	3548	50	0,38	49
M8	w	54	gummiartig, innen hart	4418,8	42	0,82	58
M9	m	80	erkennbarer calcifizierter Bereich, dort sehr hart	2638,9	61	0,52	38
M10	w	65	gummiartig	3188,7	65	3,40	32
M11	w	77	innen calcifiziert, gummiartig	1546,7	55	5,76	39
M12	w	66	innen calcifiziert, hart	2248,8	51	11,56	38

Tabelle 7.4: Charakterisierung und gravimetrisch ermittelte Wasser- und Mineraliengehalte der getrockneten und geblühten Meniskenserie.

Schon nach dem Entwässern konnte durch leichte mechanische Beanspruchung mit einer Pinzette aus einzelnen außenstehenden Kristallherden genügend Substanz für röntgenpulverdiffraktometrische Messungen gewonnen werden.

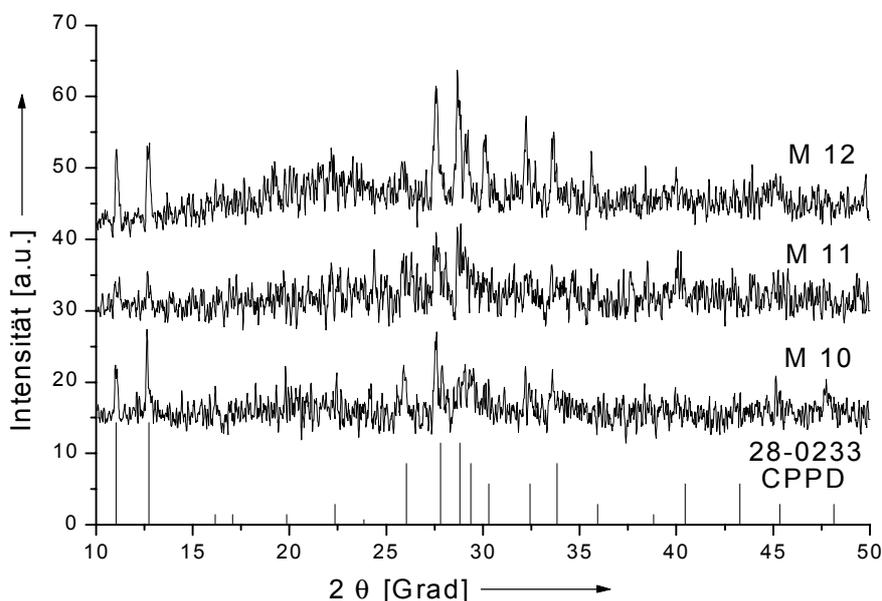


Abb. 7.10: Röntgenpulverdiffraktometrische Messungen von mechanisch entferntem Pulver aus den im Vakuumexsikkator getrockneten Menisken M 10 bis M 12. Zur Identifikation von CPPD sind hier die Beugungsdaten aus der ICDD-Kartei als Balkendiagramm wiedergegeben.

Die Messungen bestätigen die Befunde und die Theorie. Erstmals konnte in den Menisken CPPD nachgewiesen werden. Die Messung des stark chondrocalcinotischen Meniskus M12 zeigt dabei die genauesten Ergebnisse. Bei den Proben M10 und M11 stand weniger Substanzmenge zur Verfügung, so daß schlechtere Resultate der Röntgenbeugungsmessungen zu erwarten waren (siehe Tabelle 7.3).

In den REM-Aufnahmen (Abb. 7.11) ist die Grundstruktur der Menisken erkennbar. Entlang der Schnittfläche, senkrecht zum Meniskus ist die orientierte Faserstruktur des Knorpelgewebes schon bei geringen Vergrößerungen gut sichtbar (A und B). Die Aufsicht auf den am stärksten calcifizierten Meniskus M12 zeigt orientierte Kristallisationen entlang der Knorpelfasern (C). Wurde der Meniskus quer durchtrennt, so zeigten sich bei nativer Betrachtung fadenförmige Herde, die senkrecht zu den Knorpelfasern punktförmig ausgerichtet waren. Bei näherer Betrachtung der Kristallherde fanden sich längliche, blättchenförmige Kristalle von CPPD, die so auch in der routinemäßigen medizinischen Diagnostik lichtmikroskopisch nachweisbar sind [Maddison et al. 98].

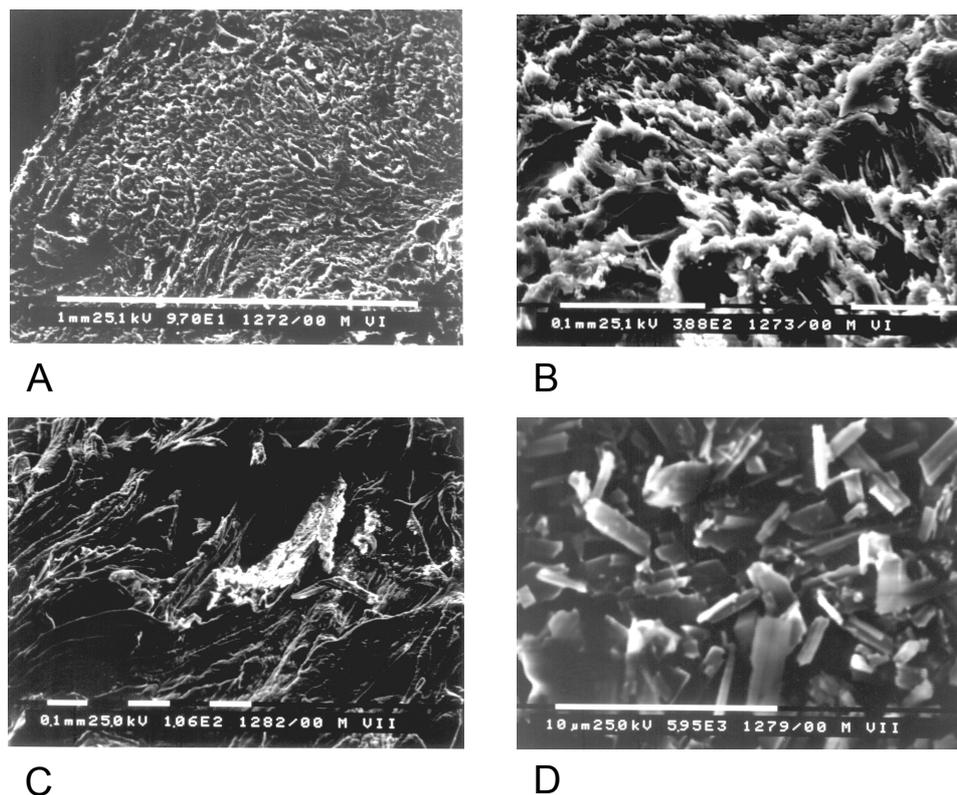


Abb. 7.11: REM-Aufnahmen von vakuumgetrockneten Meniskenstücken und Kristallherden innerhalb dieser. A: Meniskus M11 Aufsicht auf die Schnittfläche. Die Knorpelfasern stehen senkrecht zur Bildebene (Vergrößerung 97X). B: Nahaufnahme des Bereiches von A (300 X). C: Aufsicht auf den Meniskus M12. Der helle Bereich in der Bildmitte ist ein Kristallherd, der entlang der Meniskusfasern orientiert ist (106 X). D: Aufnahme der CPPD-Kristalle innerhalb eines Kristallherdes des Meniskus M12 (5950 X).

Die Röntgenbeugungsmessungen der übrigen Mineralsubstanz der bei 800°C über Nacht geglühten Menisken zeigen nur in den Fällen starker Mineralisierung (vgl. Tabelle 7.3) ein nahezu einheitliches Bild. Die Messungen der Proben M10 bis M12 zeigen nahezu reines β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ (Abb. 7.12). Dieses entsteht durch das Erhitzen von CPPD auf 600°C [Gmelin 61]. Messungen der Proben M6 und M7, bei denen nur wenig Substanz zur Verfügung stand, zeigen andere Diffraktogramme. Die Reflexe sind keiner Calciumpyrophosphat-Phase zuzuordnen, jedoch zeigt sich bei der Probe M6 das Vorhandensein von Tetracalciumphosphat (TTCP, $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$), welches durch Erhitzen aus DCPA und CaCO_3 entstehen kann [Elliott 94]. Die Probe M6 zeigt nur Reflexe des TTCP, während in der Probe M7 auch β -TCP vorhanden ist. Weiterhin lassen sich in allen Proben einzelne Reflexe ausmachen, die von mineralischen Ascheresten stammen können, die beim Erhitzen der Meniskengewebe entstanden sind.

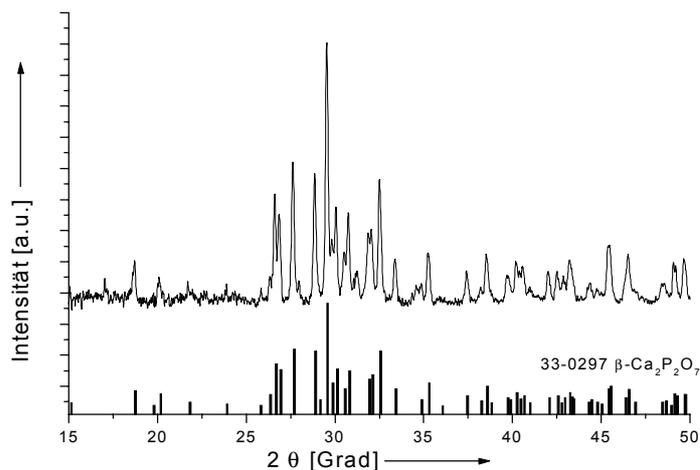


Abb. 7.12: Röntgenpulverdiffraktogramm der Restsubstanz nach dem Glühen des Meniskus M12 bei 800°C über Nacht. Die Proben M10 und M11 zeigen dasselbe Diffraktogramm. Mit abgebildet sind die ICDD-Beugungsdaten für $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$.

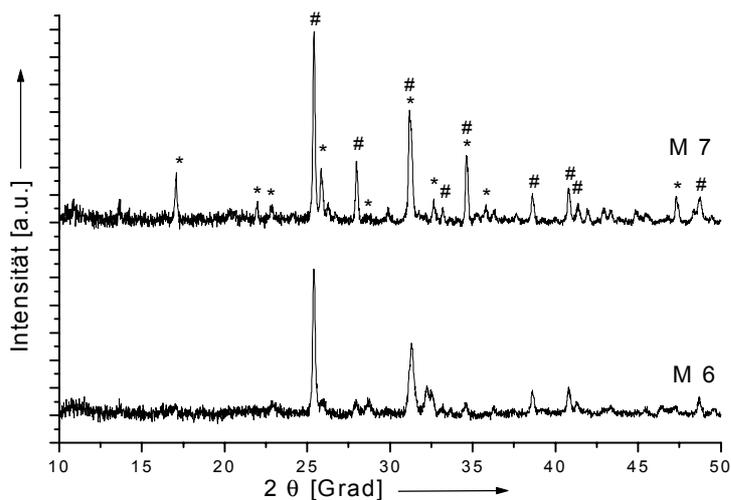


Abb. 7.13: Röntgenpulverdiffraktogramme der Restsubstanz der Menisken M6 und M7 nach dem Glühen auf 800°C. Mit Sternchen (*) sind die Reflexe für $\beta\text{-TCP}$ bezeichnet, mit Raute (#) die Reflexe für TTCP.

Meniskus	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
gefundene Phasen	TTCP	TTCP	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	$\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$
		$\beta\text{-TCP}$					

Tabelle 7.5: Halbquantitative Auswertung der gefundenen Röntgenbeugungsreflexe der übriggebliebenen Substanz der Menisken M6 bis M12 nach Glühen auf 800°C.

7.2.1.3 Zusammenfassung

Die erste Meßreihe, in der nur Meniskenstücke aus stark calcifizierten Bereichen eingesetzt und diese durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff schockgefroren

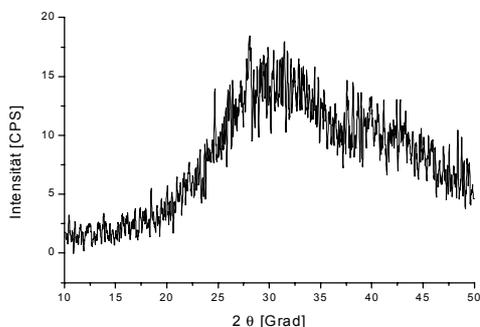
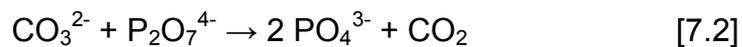
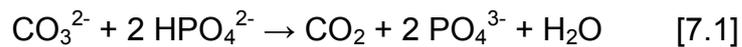


Abb. 7.13: Röntgenpulverdiffraktogramm eines frischen Meniskenstücks der Probe M 12, welches bei nativer Betrachtung calcifizierte Stellen aufweist.

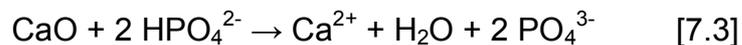
wurden, zeigte weder im Infrarot-Spektrum noch im Röntgenpulverdiffraktogramm Hinweise auf eine kristalline Phase. EXAFS-Messungen an denselben Proben weisen auf eine stark ungeordnete, also röntgenamorphe Phase hin, die Ähnlichkeiten mit carbonathaltigem Hydroxylapatit vom B-Typ aufweist. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei Röntgenbeugungsmessungen der zweiten

Meßreihe, in der die Menisken vakuumgetrocknet eingesetzt wurden, in mehreren Fällen kristalline Phasen, bestehend aus Calciumpyrophosphat-Dihydrat (CPPD). Messungen der mineralischen Überreste nach dem Glühen der Menisken bei 800°C deuten ebenfalls auf CPPD und Tetracalciumphosphat, entstanden durch den Glühvorgang, hin. Die Röntgenbeugungsmessung eines frischen Meniskenstücks der Probe M12 (Laborgerät auf Si(711)-Träger), welche augenscheinlich calcifizierte Bereiche enthielt (ähnliches Aussehen wie in Abbildung 7.7 C und D), zeigt ebenfalls nur einen amorphen Halo. Daraus läßt sich schließen, daß im chondrocalcinotischen Meniskus zunächst eine amorphe Phase vorliegt, welche durch das Knorpelgewebe und die dort vorliegenden organischen Substanzen in Kombination mit Wasser stabilisiert wird. Dies läßt sich auch aus der Tatsache ersehen, daß außerhalb des Meniskusgewebes lichtmikroskopisch Kristalle erkennbar sind. Erst nach dem Entfernen des Wassers kristallisiert die amorphe Substanz zu Calciumpyrophosphatdihydrat aus. Eine Inhibierung ist also durchaus noch vorhanden, jedoch wird nur die Transformation des, thermodynamisch weniger stabilen, amorphen Materials zu der kristallinen CPPD-Phase unterbunden. Amorphe Calciumphosphate können saure Hydrogenphosphat-Gruppen beinhalten (Vgl. Kapitel 3.3.3). Pyrophosphat-Gruppen inhibieren die Kristallisation amorpher Calciumphosphat-Vorstufen zu apatitischen Produkten. Aus schwach alkalischer Lösung gefällte Calciumpyrophosphate sind ebenfalls röntgenamorph und gehen beim Erhitzen auf 700°C in kristallines,

wasserfreies Calciumpyrophosphat über [Gmelin 61]. Die EXAFS-Spektren deuten auf ein nanokristallines, carbonathaltiges apatitisches Produkt hin. Nur die ersten zwei Schalen waren auswertbar und zeigen ähnliche Atomabstände, wie sie auch für ACPs gefunden wurden [Nelson et al. 89]. Beim Erhitzen können Hydrogenphosphat-Gruppen zu Pyrophosphat reagieren (Vgl. Reaktionsgleichung 11.1). Carbonat und Hydrogenphosphat bzw. Pyrophosphat können auch nach folgenden Mechanismen reagieren [Greenfield et al. 74]:



Weiterhin kann auch die Kondensation zu Pyrophosphat mit durch Erhitzen gebildetem Calciumoxid verhindert werden:



Spuren von Calciumoxid konnten aus den Röntgenbeugungsmessungen nicht erfaßt werden. Das Calciumpyrophosphat-dihydrat verliert beim Erhitzen auf 600°C sein Kristallwasser und geht in $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ über. Sowohl die Tatsache, daß neben diesem Pyrophosphat auch β -Tricalciumphosphat und auch TTCP gefunden wurde, welche durch obige Reaktionsmechanismen entstehen können, deutet auf die Anwesenheit einer carbonathaltigen Phase und auf einen der obigen Reaktionsmechanismen hin.

Aus den gravimetrischen Messungen ist zu erkennen, daß sowohl der Wassergehalt (27-39 Gew-%), als auch der Mineralgehalt (0,03-11,6 Gew.-%) große Unterschiede aufweisen kann. Einen erkennbaren Zusammenhang zwischen beiden zeigt sich nicht.

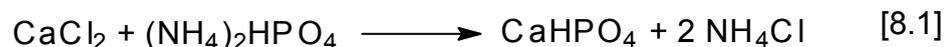
8. Simulation der Biomineralisation

8.1 Fällung aus übersättigtem Medium

Eine Fällung aus übersättigtem Medium bringt, wie im Kapitel „Kristallisation“ beschrieben, eine Reihe von Schwierigkeiten mit sich. Beginnend mit der homogenen Primärkeimbildung erfolgt in einem diskontinuierlichen Batch-Prozeß nach Bildung der ersten Kristalle sowohl Sekundärkeimbildung und Heterogenkeimbildung als auch Kristallwachstum in verschiedenen Stufen mit sich. Diese sind unter anderem von der Oberflächenspannung der Lösung und der Ausdehnung der Oberfläche der Kristalle abhängig. Das Kristallwachstum und die Bildung verschiedener Phasen sind außerdem von der Bildung von Totvolumina, Konzentrationsgradienten und lokal unterschiedlichen pH-Werten abhängig.

In einem komplizierten, von vielen äußeren Faktoren beeinflussbaren System kann dies zur Bildung vieler verschiedener Phasen führen. Am Beispiel der Fällung von DCPA sei hier gezeigt, welche verschiedenen Faktoren einen Einfluß nehmen können [Vasserman & Silant'eva 65]:

Das geforderte Produkt sollte sich durch das Einstellen des Ca/P-Verhältnisses von 1,0 leicht herstellen lassen:

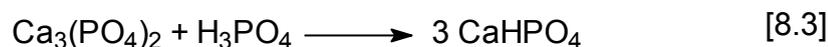


Wird diese Reaktion unterhalb 75°C ausgeführt, so bildet sich DCPD. Zu Beginn der Reaktion kann ein Überschuß an Calcium vorliegen, und das gerade gebildete Calciumhydrogenphosphat mit noch ungeordneter Struktur bietet gute Bedingungen für eine heterogene Sekundärreaktion:



Diese Reaktion ist von äußeren Einflußgrößen abhängig, wie beispielsweise Reaktandenkonzentrationen, dem Ca²⁺-Überschuß, der Struktur des Fällungsprodukts, der Rührgeschwindigkeit und anderen Faktoren.

Die Salzsäure, die sich bei dieser Reaktion bildet, kann mit dem Ammoniumphosphat Phosphorsäure bilden, welche gemäß:



wieder zu Calciumhydrogenphosphat reagiert.

Aus Fällungsversuchen zeigte sich, daß bei erhöhter Acidität der Lösung die Zusammensetzung des Fällungsprodukts unter das stöchiometrische Ca/P-Verhältnis von 1.0 für DCPD fällt. Nicht alle Säure wurde für die Reaktion [8.3] gebraucht. Ein weiterer Effekt der Säurebildung kann auch sein, daß das $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ durch Protonierung zu $(\text{NH}_4)\text{H}_2\text{PO}_4$ führen kann, was zur Bildung von MCPM (Monocalciumphosphat-monohydrat bzw. Calcium-bis-(dihydrogenphosphat), $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, Ca/P=0.5) führen kann:



Eine weitere heterogene Sekundärreaktion bei Phosphatüberschuß kann ebenfalls die Bildung von TCP-Clustern sein:

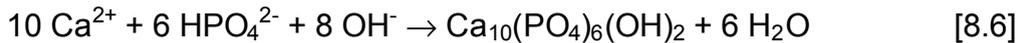


Eine echte kontrollierte Kristallisationsreaktion von Calciumphosphaten kann also nur unter Bedingungen ablaufen, die sowohl reproduzierbar sind als auch eine echte Kontrolle der Kristallisationsbedingungen (pH, Konzentration der Ionen) ermöglichen.

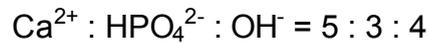
8.2 Kontrollierte Fällung mit der *Constant Composition*-Methode

Tomson und Nancollas führten 1978 die *Constant Composition (CC)*-Methode zur Untersuchung von Kristallisationsvorgängen und zur Simulation von Biomineralbildungen ein [Tomson & Nancollas 78]. Diese beruht auf der Tatsache, daß der pH-Wert beispielsweise bei der Kristallisation von Hydroxylapatit sinkt. Die von ihnen erdachte und mit hoher Reproduzierbarkeit arbeitende Anlage besteht aus zwei ge-

koppelten Büretten, wobei in der einen eine Calcium-Lösung, in der anderen eine Phosphat-Lösung in das Reaktionsgemisch gepumpt werden kann (Abb. 8.1). In einer thermostatisierten Vorlage befindet sich eine überkritisch übersättigte Calciumphosphatlösung. Bei Zugabe von Keimkristallen (z.B. HAP, CaCO_3 , Calciumoxalat, Metalloberflächen) beginnt die Kristallisation sofort, was sich durch das Sinken des pH-Wertes bemerkbar macht. Gemäß der Reaktionsgleichung:



muß zur Aufrechterhaltung der Konzentration in Lösung nach erfolgter Kristallisation ein Verhältnis von:



in die Reaktionslösung zugepumpt werden.

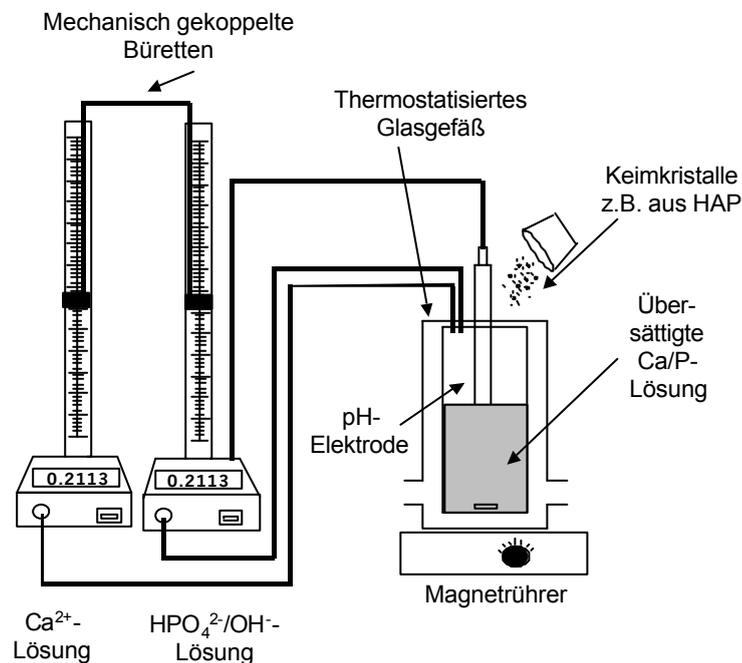


Abb. 8.1: Schemazeichnung der *Constant Composition* Anlage.

Simultane AAS- und Photometrie-Messungen bewiesen die Funktion der Anlage und die Konstanz der Konzentrationen im Reaktionsgefäß. Somit war es möglich, sowohl Inhibitionseffekte von zugesetzten Additiven als auch Epitaxieeffekte von zugesetz-

ten Keimkristallen zu untersuchen und die hohe Reproduzierbarkeit der Methode erlaubte es, die Effekte quantitativ zu erfassen [Umegaki et al. 89], [Zawacki et al. 86], [Nancollas & Zawacki 84] [Iijima et al. 98]. Weitere Gruppen modifizierten diese Methode noch mit dem Einsatz von ionenselektiven Elektroden [Gilman & Hukins 94].

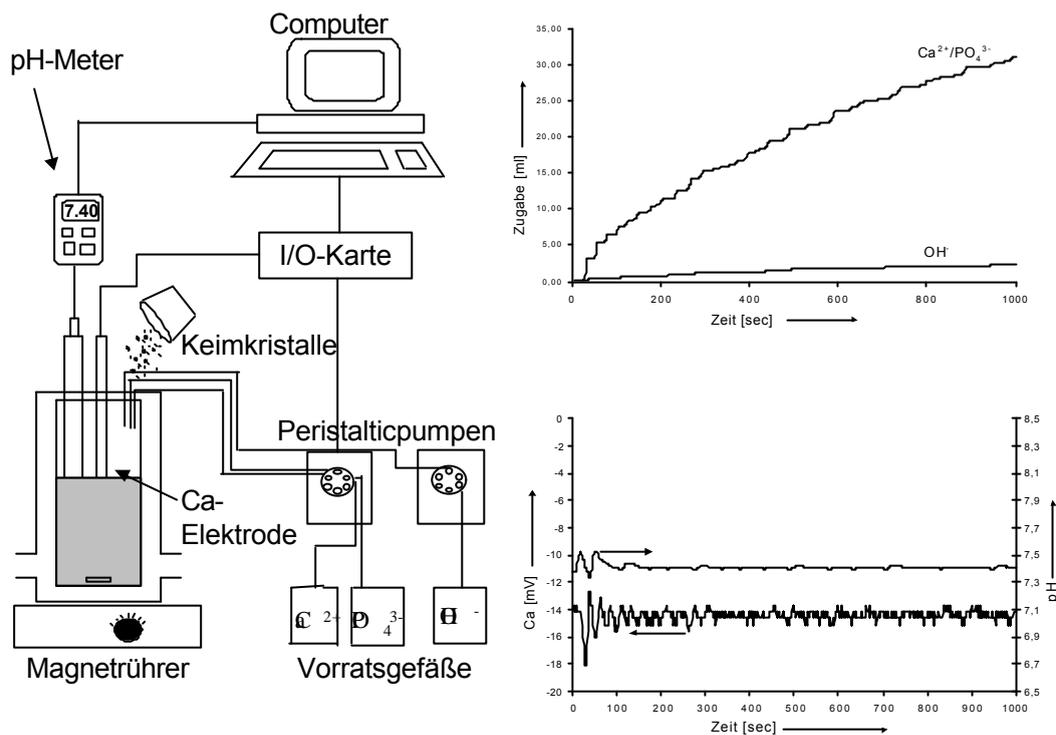


Abb. 8.2: links: Schemazeichnung einer eigenen CC-Anlage mit pH-Meter und Calcium-Elektrode. Rechts oben Zugabe von Calciumphosphat-Lösung in das Reaktionsgefäß bei einem CC-Versuch über 1000 sec unter physiologischen Bedingungen (pH 7.4, 37°C), rechts unten: Konstanz des Calcium-Wertes und des pH-Wertes während des CC-Versuchs.

Abbildung 8.2. zeigt eine eigene gebaute CC-Anlage mit Calcium-Elektrode. Die Konstanz des pH-Werts und des Calcium-Werts sind sehr gut gewährleistet. Deutlich ist auf den Diagrammen das Sinken der Ca-Elektrodenspannung und des pH-Wertes zu erkennen, nachdem die Keimkristalle zugegeben wurden. Die Konzeption dieser Anlage erfolgte mit dem Programm „VISIDAQ“ und einem dazu geschriebenen Unterprogramm namens „CC-HALB“. Die technischen Details und die Programmierung sind im Anhang aufgeführt. Die Herstellung der hier eingesetzten übersättigten Calciumphosphat-Lösung und die Durchführung eines CC-Versuchs sind im präparativen Teil beschrieben.

8.3 Diffusionsmethoden

Bekanntlich spielen in der Biomineralisation Diffusionsvorgänge eine gewichtige Rolle. Durch das Diffundieren der später kristallisierenden Ionen in eine hydrophile Matrix wird erreicht, daß durch die ständig nachfließenden Ionen ein langsames und damit wesentlich regelmäßigeres Kristallwachstum erfolgt. Weiterhin kann so auch der Einfluß der Matrix untersucht werden, in die das Kristallisat eindiffundiert.

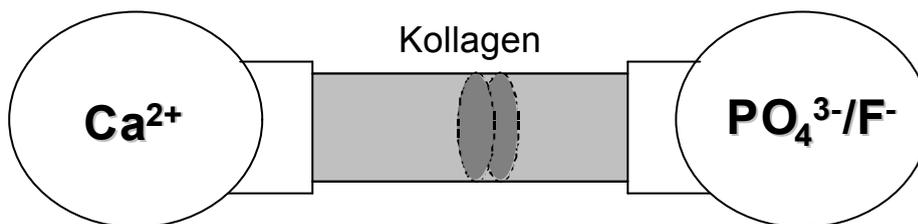


Abb. 8.3: Schematische Darstellung der Diffusionsexperimente von Fluorapatit in Kollagen [Busch 98].

Diffusionsversuche von Fluorapatit in eine Matrix aus Kollagen (Abb. 8.3) ergaben ein ungewöhnliches Kristallwachstum ähnlich dem der Kristalle in Abbildung 8.9: Ausgehend von einem elongierten, hexagonalen Keimkristall, der je nach Reaktionsbedingungen eine Länge von 1-30 μm erreicht, erfolgt ab einem Verhältnis von Länge zu Durchmesser von ca. 5:1 ein regelmäßiges und symmetrisches Ausfächern an beiden Seiten des Keimkristalls in Gestalt von kleineren nadelförmigen Kristallen im Winkel von maximal 48° , so daß hantelförmige Gebilde entstehen. Dieses hantelförmige Aggregat schließt sich im weiteren Wachstum nach ca. 10 Generationen nach denselben Wachstumsprinzipien zu einem kugelförmigen Gebilde zusammen [Kniep & Busch 96].

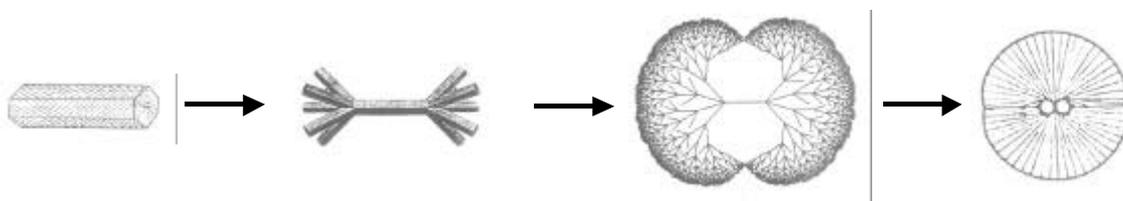


Abb. 8.4: Selbstorganisiertes Wachstum der FAP-Kugeln aus einem hexagonalen Keimkristall über die Hantelaggregate. Aus: [Busch 98].

Es handelt sich hierbei um ein selbstorganisiertes Wachstum, dessen Morphologie nach Meinung der Autoren durch die komplexen Wechselwirkungen der organischen Matrix und der anorganischen Salze bestimmt wird [Busch 98]. Dieses Wachstumsmuster wird in der Natur beispielsweise bei Schneckenschalen aus Aragonit

(CaCO₃-Modifikation) beobachtet [Blackwelder & Watabe 77]. Ein intrinsisches Dipolmoment wurde aus theoretischen Berechnungen sowie durch Diffusionsversuche unter dem Einfluß eines äußeren elektrischen Feldes ebenfalls als Ursache für dieses fraktale Kristallwachstum ausgemacht [Busch et al. 99]. In gemischten Fluorhydroxylapatiten mit regelmäßiger Ausbildung von Wasserstoffbrücken wäre solch ein Dipolmoment denkbar (siehe Kapitel 3.3.2).

Interdiffusionsversuche von Fluorapatit in aus Festkörperreaktion hergestelltes poröses Polyglycolid (Abb. 8.5) führten zu einem ähnlichen Ergebnis. Das poröse Polyglycolid wird durch 2-4-stündiges Erhitzen von Natriumchloracetat bei 160 bis 180°C hergestellt. Dabei entsteht durch eine Festkörperreaktion Polyglycolid (*Polyglycolic acid*, PGA) und als Nebenprodukt Natriumchlorid (Abb. 8.5).

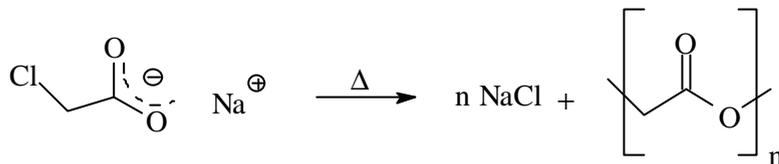


Abb. 8.5: Herstellung von Polyglycolid aus Festkörperreaktion.

Dieses Polyglycolid-Natriumchlorid-Gemisch wird mittels einer hydraulischen Presse unter 10 t Druck zu einem Pellet verpreßt, welches 13 mm Durchmesser und bei einer verpreßten Menge von 400 mg PGA eine Dicke von 2 mm aufweist.

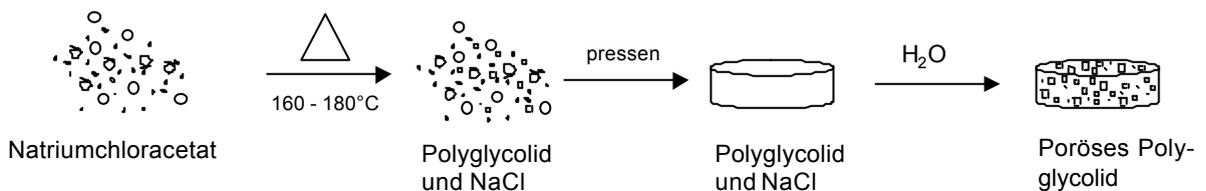


Abb. 8.6: Herstellung von porösen Polyglycolid-Pellets.

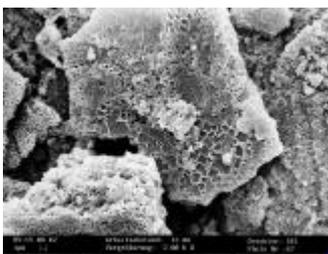


Abb. 8.7: REM-Aufnahme des porösen Polyglycolids (Vergrößerung 2000X).

Nach dem Auswaschen des Natriumchlorids erhält man ein poröses Polymer-Pellet, welches Poren von 50-500 µm Durchmesser aufweist. Die Porosität beträgt 43% und die Dichte einer solchen Polymer-Tablette beträgt durchschnittlich $0.86 \pm 0.03 \text{ g cm}^{-3}$ [Epple & Herzberg 98]. Auf der Oberfläche und in den Poren des Polymers befinden sich Carboxylat-

Natrium-Endgruppen, die beim Interdiffusionsvorgang zunächst durch Calcium aus-

getauscht werden. Diese Ähnlichkeit zum Kollagen und die besser definierte Struktur des Polyglycolids sollten es möglich machen, biomimetische Kristallisationsvorgänge besser reproduzierbar zu untersuchen.

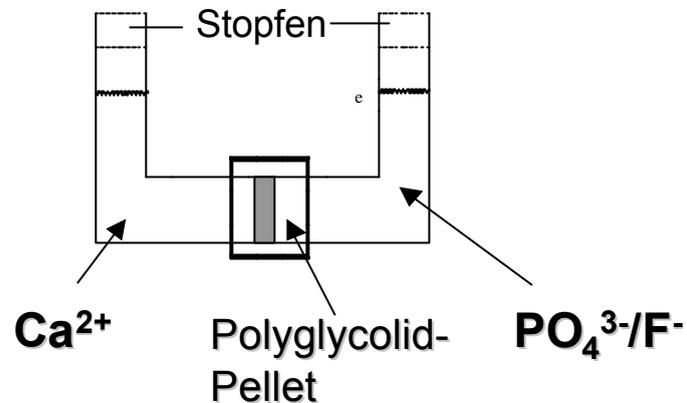


Abb. 8.8: Schemazeichnung des Versuchsaufbaus für die Interdiffusion von Fluorapatit in poröses Polyglycolid

Durch die dünnere, jedoch definiertere Matrix führte auch ein langsamer Diffusionsvorgang von Fluorapatit in einer etwas modifizierten Apparatur (Abb. 8.8) zu hantelförmigen Kristallen [Schwarz & Epple 98].

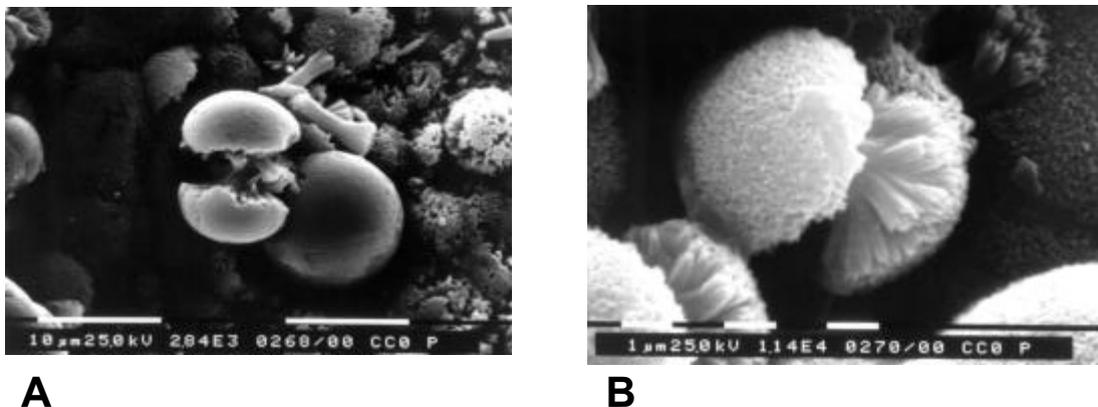


Abb. 8.9: Hantelförmige Fluorapatit-Aggregate in verschiedenen Wachstumsgenerationen auf der Oberfläche eines porösen PGA-Pellets (Phosphat-Seite) nach 20 h Interdiffusion. A: 2840 X, B: 11400X.

Nachteilig an dieser Methode ist, daß die Lösung während des Interdiffusionsversuchs an Konzentration verarmt. Niedrigere Ionenkonzentration bedeutet niedrigere Übersättigung, andere Keimbildungsvoraussetzungen und somit langsameres Kristallwachstum. Dadurch sind beispielsweise in Abb. 8.9 A verschiedene Wachstumsgenerationen der Hantelaggregate sowie andere Morphologien nebeneinander zu erkennen.

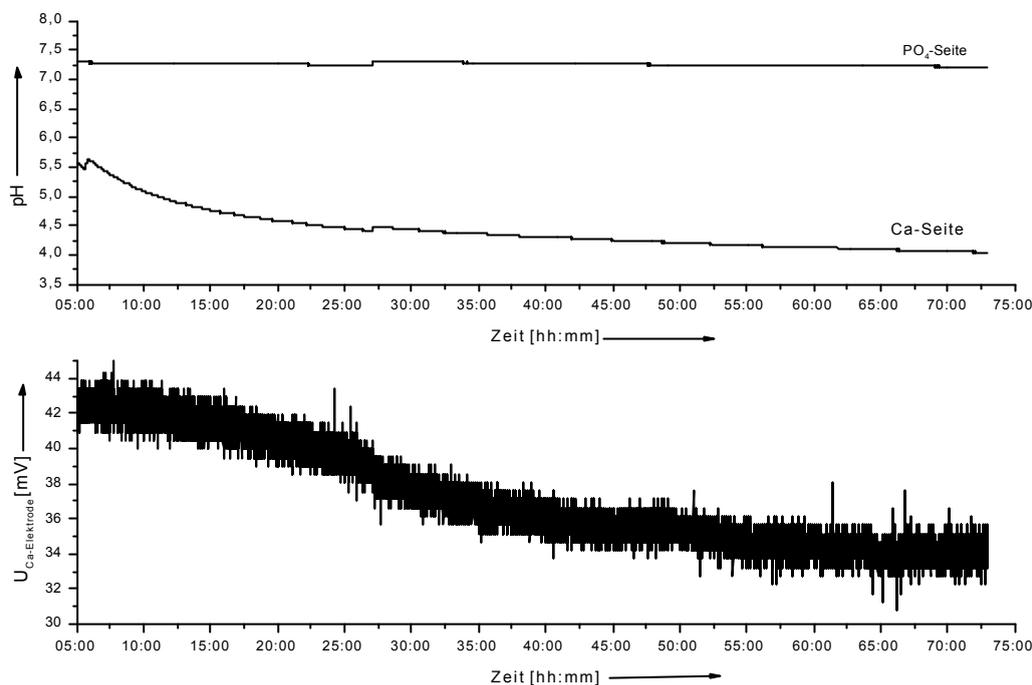


Abb. 8.10: Änderung der pH-Werte und der Ca-Elektrodenspannung bei 72-stündiger Interdiffusion von Fluorapatit in eine poröse PGA-Matrix

Abb. 8.10 zeigt die Änderung der pH-Werte und der Ca-Elektrodenspannung, die direkt mit der Konzentration korreliert. Der pH-Wert wurde zu Beginn auf den physiologischen Wert 7.4 eingestellt. Da die inhibierende Wirkung von Puffersubstanzen, wie des oft eingesetzten α,α,α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamins nicht bekannt ist, wurde auf deren Einsatz verzichtet. Der pH-Wert auf der Calcium-Seite ändert sich wesentlich stärker als der auf der Phosphat-Seite, was auf die Pufferwirkung der Phosphate zurückzuführen ist (siehe Abbildung 3.1). Wie in Kapitel 2.8 ausgeführt wurde, hat der pH-Wert einen starken Einfluß auf die Form, Größe und Beschaffenheit der entstehenden Kristallite. Ein stetig sinkender pH-Wert wird somit einen schlecht kontrollierbaren Einfluß auf die Diffusionskristalle in der porösen PGA-Matrix ausüben. Dieses kann ein Grund dafür sein, daß bei rasterelektronenmikroskopischer Betrachtung dieser Diffusionsversuche sowohl gleichzeitig jüngere Aggregate neben älteren als auch andere, ungeordnetere Morphologien gefunden wurden [Schwarz & Epple 98].

9. Die Konzeption der CCDD-Anlage

Diese Probleme können beseitigt werden, wenn eine Kontrolle über die Kristallisationsbedingungen ausgeübt werden kann, indem die Konzentrationen in der Diffusionszelle immer konstant gehalten werden. Die Verbindung der Doppeldiffusionstechnik, welche den Vorteil der langsamen Kristallisation bietet und der *Constant Composition*-Methode von Nancollas, die die Kontrolle über die Ionenkonzentrationen bietet, stellt also eine optimale Alternative dar, Biominalisationsvorgänge zu simulieren. Interdiffusionsvorgänge unter kontrollierten Bedingungen in eine Matrix wurden unternommen. Dabei konnte die Bildung von OCP und die Konversion zu FAP in Fluorid-haltigem Medium beobachtet werden. Es wurden dabei Oberflächen- und Inklusionsreaktionen der Fluorids beobachtet [Iijima et al. 96].

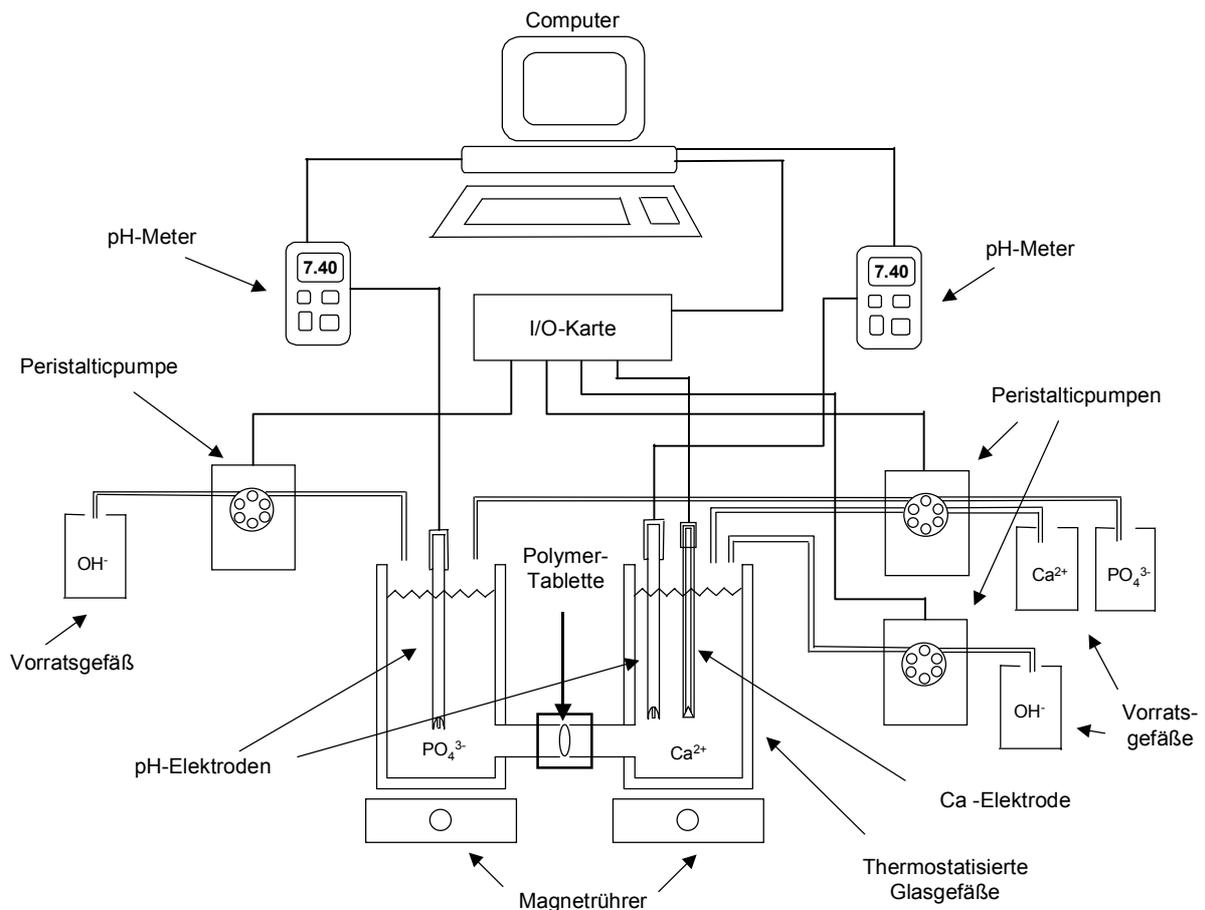


Abb. 9.1: Schematischer Aufbau der CCDD-Anlage

Um die Ionenkonzentrationen und die pH-Werte auf beiden Seiten der Diffusionsgefäße zu kontrollieren, wurde eine Computersteuerung entwickelt. Zwei pH-Meter überwachen auf beiden Seiten die pH-Werte und sind über die RS 232-Schnittstelle mit einem Computer (AMD K6 200 MHz) verbunden. Eine Calcium-ionenselektive Elektrode überwacht auf der Ca-Seite der Diffusionsgefäße die Calcium-Konzentration. Die Elektrode ist über eine A/D-Wandlerkarte mit dem Computer verbunden. Peristalticpumpen mit KOH-Lösung werden über eine D/A-Wandlung angesteuert, sobald der pH-Wert auf einer Seite sinkt. Eine weitere Peristalticpumpe kontrolliert die Konstanz der Calcium-Konzentration.

Das Konstanthalten des Phosphat-Wertes auf der anionischen Seite des Diffusionsgefäßes wird in Ermangelung einer Phosphat-selektiven Elektrode ebenfalls von der Calcium-selektiven Elektrode unter der Annahme kontrolliert, daß, wenn die Calcium-Konzentration sinkt, eine Kristallisation stattgefunden haben muß und somit auch die Phosphat-Konzentration sinken muß. Gemäß der stöchiometrischen Formel für Fluorapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ werden somit den Diffusionsgefäßen über eine Zweikanal-Peristalticpumpe auf einem Kanal Ca^{2+} und auf dem anderen Kanal PO_4^{3-} sowie F^- im Verhältnis 5:3:1 zugeführt, sobald die Calcium-Elektrode ein Absinken der Ca^{2+} -Ionenkonzentration anzeigt.

Gerät/Aktion	Marke	Auflösung	Zeitauflösung ¹	Fehler
pH-Meter	WTW pH 340A	±0,01 pH	2 sec	±0,02 pH
Peristalticpumpen	ISMATEC Reglo MS 2/6			
Ca-ionenselektive Elektrode	ORION 97-20 ionplus	1 mV	100 msec	±5mV
Thermostat	LAUDA RC6	0,1°C	---	± 0,3°C

Tabelle 9.1: Komponenten und einige Eigenschaften der CCDD-Anlage.

¹ Zeitauflösung = Zeitraum, der verstreicht, bevor der Computer einschreitet, um Abweichungen vom Sollwert zu regeln

9.1 Die Calcium-Elektrode

Als Calcium-ionenselektive Elektrode wurde eine ORION 97-20 ionplus-Einstabmeßkette eingesetzt. Diese Kombinationselektrode hat den Vorteil, daß sie Meß- und Referenzelektrode in sich vereint.

Eine ionensensitive Elektrode ist eine Halbzelle, deren Potential von der Aktivität des zu messenden Ions abhängt. Das austauschbare ionensensitive Modul ist hier eine sogenannte Flüssigmembran-Elektrode und enthält eine interne Referenzflüssigkeit in Kontakt mit einer gelartigen organophilen Membran, die aus Phosphateestern (RO_2PO_2^-) besteht und die empfindlich gegen Verunreinigungen durch Fette, Detergentien und andere höhermolekulare Stoffe reagiert.

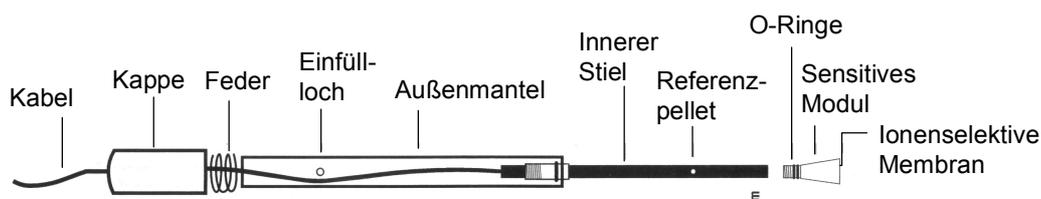


Abb. 9.2: Schemazeichnung der ORION 97-20 Ionplus-Einstabmeßkette

Wenn die Membran mit einer Calcium-Lösung in Kontakt ist, so entwickelt sich durch die Membran ein Potential. Dieses Potential hängt von dem Gehalt an freien Calcium-Ionen in Lösung ab und wird gegen ein konstantes Halbzellenpotential gemessen.

Das gemessene Potential ist abhängig von der Menge an Calcium in der Lösung und läßt sich durch die Nernstsche Gleichung beschreiben [Cammann 73]:

$$E = E_0 + \frac{R \cdot T}{z_m \cdot F} \ln(a_m + \sum_S K_{M-S} a_S^{1/z_S}) \quad (\text{Gl. 9.1})$$

E_0 – Die EMK der Meßkette in einer Standard-Lösung. Sie hängt u.a. von der Aktivität der Innenlösung und der Art der eingesetzten Bezugelektrode ab.

a_m – Die Aktivität des Meßions; z_m – Wertigkeit des Meßions

a_S – Die Aktivität des Störions; z_S – Wertigkeit des Störions

K_{M-S} – Selektivitätsverhältnis Meßion-Störion; der Wert kann zwischen 10^{-1} und 10^{-5} liegen

Im Fall der ORION 97-20 ionplus-Einstabmeßkette und der Tatsache, daß in den Versuchen störionenfrei gearbeitet wurde (störend auf die Meßergebnisse der Ca-Elektrode wirken beispielsweise Pb^{2+} , Ni^{2+} , Sr^{2+}), läßt sich die Gleichung folgendermaßen vereinfachen [Orion 96]:

$$E = E_0 + S \ln(A) \quad (\text{Gl. 9.2})$$

S – Steigung der Elektrodenspannung (ca. 27 mV per Dekade)

A – Aktivität der Calcium-Ionen in Lösung

Die Aktivität der Ionen ist mit dem Aktivitätskoeffizienten γ und der Calcium-Konzentration c_{Ca} folgendermaßen verknüpft:

$$A = \gamma \cdot c_{\text{Ca}} \quad (\text{Gl. 9.3})$$

Die Ionenstärke ist folgendermaßen definiert:

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (c_i z_i^2) \quad (\text{Gl. 9.4})$$

Wenn die Hintergrundionenstärke hoch und relativ zur zu messenden Ionenkonzentration konstant ist, dann ist der Aktivitätskoeffizient konstant und die Aktivität ist zur Konzentration direkt proportional.

Um die Ionenstärke konstant zu halten, werden der Meßlösung oft Hilfssubstanzen zugesetzt. Im Fall der hier benutzten Elektrode wird vom Hersteller "ionic strength adjustor (ISA)", eine NaCl-Lösung empfohlen. Diese Lösung soll zu allen Proben hinzugegeben werden, so daß die Hintergrundionenstärke hoch und konstant im bezug zu den unterschiedlichen Calcium-Ionenkonzentrationen ist. In Anbetracht der Tatsache, daß wohlweislich auf Fremdionen, die in das Apatitgitter inkorporiert werden können, verzichtet wurde (siehe Kap. 3.3.2), wurde auch bei der Calcium-Messung der Einsatz dieser Substanzen unterlassen. Dadurch kann die Meßgenauigkeit sinken und das Signal-zu-Rausch-Verhältnis steigen. In einem derartigen dynamischen System, in dem Kristallisation durch Doppeldiffusion stattfindet, welches auch durch die pH-Wert-Kontrolle stetigen Volumenzunahmen unterworfen ist, kann jedoch eine eindeutige Kontrolle der Hintergrundionenstärke nicht effektiv stattfinden.

Die Ag/AgCl-Bezugselektrode ist eine sogenannte sekundäre Bezugselektrode. Primäre Bezugselektroden wären z.B. die Normal-Wasserstoffelektrode, die in ihrer Handhabung aber zu umständlich wäre. Die Ag/AgCl-Halbzelle ist nach der Wasserstoffelektrode wahrscheinlich diejenige Halbzelle, die am besten reproduzierbar ist. An der Halbzelle findet folgende Reaktion statt:



Die Löslichkeit von Silberchlorid in Wasser beträgt ca. $10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ bei 25°C . Hergestellt werden solche Referenzelektroden beispielsweise durch die Beschichtung eines Silberdrahtes mit Silberchlorid. In diesem Fall besteht das Referenz-Pellet aus einer mit AgCl überzogenen Silberscheibe.

In sauren Lösungen ist die Ag/AgCl-Elektrode gegenüber Sauerstoffspuren empfindlich. Gemäß:



kann die Silberelektrode mit dem im Elektrolyten gelösten Sauerstoff reagiert [Durst 69]. Die Halbzelle der Kombinationselektrode wird über das Einfüll-Loch mit gesättigter AgCl-Lösung versorgt. Den Ionenkontakt zur Meßlösung wird aufrechterhalten, indem das konisch gebaute, sensitive Modul durch die Verschraubung (Kappe und Feder an der Oberseite) in nicht zu festem Kontakt mit dem Außenmantel gehalten wird.

Die Meßbedingungen der Referenzelektrode müssen ebenfalls beachtet werden. Immer dann, wenn zwei Lösungen mit unterschiedlichen Zusammensetzungen miteinander in Berührung kommen, entstehen Verbindungspotentiale, die aus der Interdiffusion von Ionen in die beiden jeweiligen Gegenlösungen resultieren. Da Ionen in unterschiedlicher Geschwindigkeit diffundieren, wird die Elektrodenspannung durch die Lösungsgrenzen ungleich übertragen. Die wichtigste Variable, die kontrolliert werden muß, ist die Zusammensetzung der Lösung der Referenzelektrode. Die Geschwindigkeit, mit der die positiven und negativen Ionen von der Füll-Lösung in die Probe gelangen, sollte so ähnlich wie möglich sein. Wenn das Verhältnis, mit dem positive und negative Ladungen in die Probelösung transportiert werden, gleich ist, so resultieren keine Verbindungspotentiale.

9.1.1 Anschluß der Calcium-Elektrode an den Computer

Die Calcium-Elektrode wurde über die A/D-Wandlerkarte PCL 812 (Advantech) an den Computer angeschlossen. Im Programm VISIDAQ ist hierfür ein sog. "Analog Input" (AI)-Icon vorgesehen (Abb. 9.3 1). Der Wertebereich für den A/D-Eingang wurde auf $\pm 1V$ festgelegt. Da aus der Calciumelektrode sehr niedrige Meßwerte kommen und diese vom Analogeingang 1 in Volt gemessen werden, wird der Meßwert durch eine Rechenoperation (Abb. 9.3 3) mit 1000 multipliziert. Da das Programm alle 55 ms durchgeführt wird, werden pro Sekunde 18 Meßwerte aufgenommen. Von jeweils 5 dieser Werte wird, um das Signal für die Kalibration zu dämpfen (siehe Kapitel "Rauschen"), der gleitende Durchschnitt berechnet.

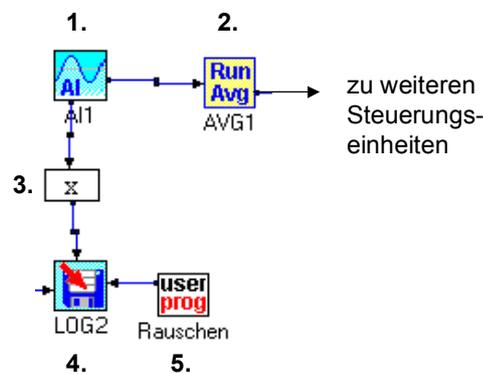


Abb. 9.3: Icon-Blocks zum Anschluß der Calcium-Elektrode. Der Analogeingangsblock (AI) 1 ist mit einem Rechenicon 2 verschaltet, welches stetig den Durchschnitt aus 5 Werten berechnet. Ein weiteres Rechenicon 3 multipliziert den Meßwert mit 1000, um aus dem niedrigen Wert in Volt einen mV-Wert zu machen. Der Meßwert wird mittels eines Datenverwaltungsblocks 4 inclusive der Molarität der Meßlösung aus dem Programmblock 5 auf die Computerfestplatte gespeichert.

9.1.2 Kalibration

Die Kalibration der Calcium-Elektrode wurde mit einer VISIDAQ-Strategie namens "KALIBRA" vollzogen. Dabei wird eine abgemessene Menge Wasser vorgelegt, in die die Calcium-Elektrode eingetaucht wird (gerührt). Die Menge der Vorlage wird in die Benutzeroberfläche eingegeben. Eine Pumpe ist an ein Vorratsgefäß mit einer definierten Ca-Lösung (0,1-1 mol/l) angeschlossen und pumpt in definierten Zeitabständen eine geringe Menge der Calcium-Lösung in die Vorlage. Um den Einschwingvorgang der Calcium-Elektrode zu unterdrücken, wird 10 Sekunden lang die Konzentration konstant gehalten und erst dann die Werte (mol/l der Ca-Lösung in der Vorlage

und U [mV] der Calcium-Elektrode) im ASCII-Format (Abb. 9.4) auf der Computerfestplatte gespeichert.

Zeit	mol/l Ca	U [mV]
155	0.00004	-31.73828
165	0.00004	-31.73828
176	0.00007	-32.22656
187	0.00011	-31.25000
198	0.00014	-29.78516
209	0.00018	-27.34375
220	0.00021	-27.34375

Abb. 9.4: Datenformat der Kalibrationswerte der Calcium-Elektrode.

Die logarithmische Auftragung der Spannung gegen die Molarität der Calcium-Lösung im Gefäß ergibt eine annähernd lineare Kalibrationskurve. Abbildung 9.5 zeigt eine solche Kalibrationskurve. Die Berechnung, wieviel mol Calcium in der Vorlage vorhanden ist, wird vom Programm automatisch erledigt.

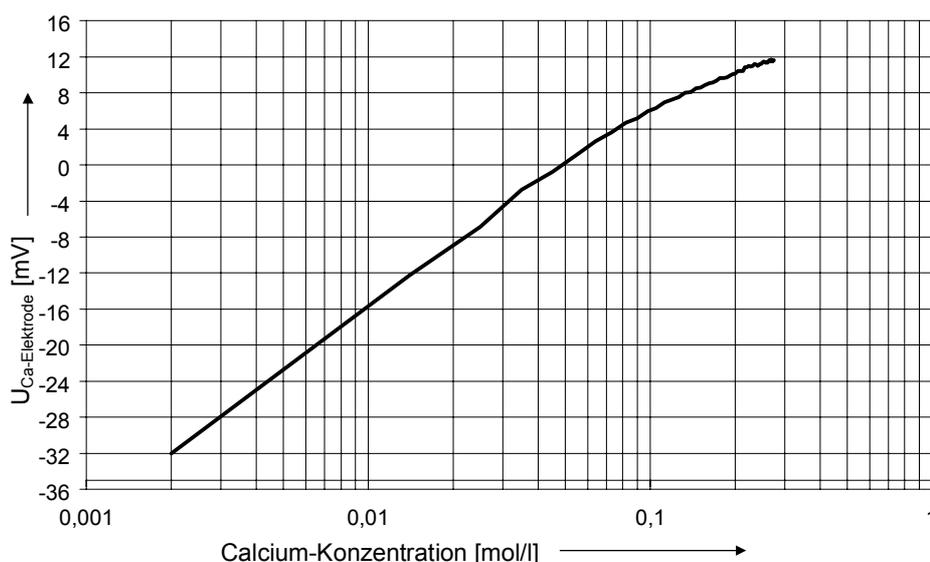


Abb. 9.5: Automatische 50-Punkte-Kalibration der Calcium-Elektrode. Eine Dekade (von 0.01 nach 0.1 mol/l) entspricht hier 22 mV.

9.1.3 Probleme

9.1.3.1 Spannungseffekte durch andere Elektroden

Elektrochemische Spannungseffekte verursachen eine Zunahme der Calcium-Elektrodenspannung um mehrere 10 mV, wenn eine pH-Elektrode eingetaucht wird. Dabei ist es ohne Belang, ob diese pH-Elektrode angeschlossen ist oder nicht. In

Abb. 9.6 sind diese Spannungssprünge dargestellt. Ohne pH-Meter zeigt die 0,01 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ -Lösung einen Spannungswert von ca. 7 mV an. Taucht man in die gleiche Lösung zusätzlich eine pH-Elektrode, so erfolgt augenblicklich ein Spannungssprung um ca. 10 mV. Eine zweite pH-Elektrode, die in die Lösung des zweiten Diffusionsgefäßes eingetaucht wird, führt zu einer Spannungssteigerung um weitere 2-3 mV. Der Effekt dieser zweiten pH-Elektrode ist geringer, da die Lösungen durch die PGA-Diffusionsmatrix getrennt sind.

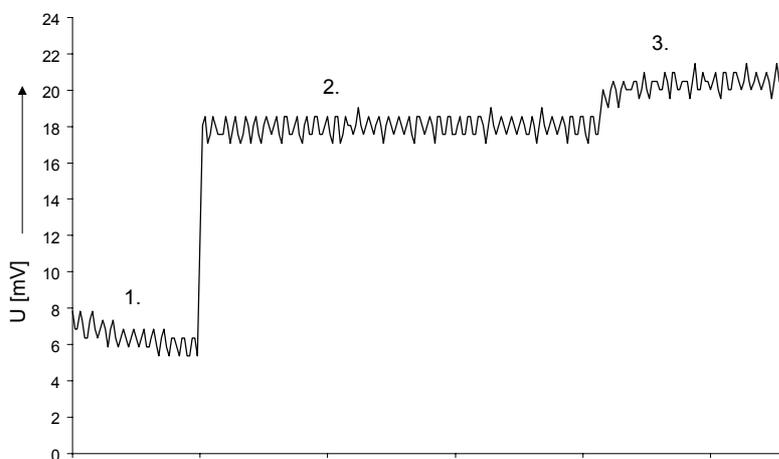


Abb. 9.6: Spannungsverlauf der Calcium-Elektrode bei 0,01 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ – Lösung mit 1. ohne pH-Elektrode in der Meßlösung, 2. eine pH-Elektrode in derselben Meßlösung, 3. mit einem zweiten pH-Meter in der Lösung auf der Phosphat-Seite, getrennt durch die Polyglycolid-Matrix

Die poröse Matrix zwischen den Meßlösungen dämpft also den Spannungseffekt. Dies ist umso folgenreicher, als daß dieser Einfluß durch das Auskristallisieren des Calciumphosphats während der Interdiffusionsversuche stetig abnimmt. Da die Spannungserhöhung jedoch nur 2-3 mV beträgt, konnte durch eine geeignete Programmierung der Calcium-Konzentrationssteuerung (*Ca-stat*) dieser Effekt unterdrückt werden.

9.1.3.2 Rauschen

Durch die hohe Auflösung der A/D-Wandlerkarte sowie durch Spannungseffekte an der Calcium-Elektrode tritt Rauschen der Elektrodenspannung auf, welches die Meßgenauigkeit der Calcium-Ionenkonzentration stört. Durch geeignete Mittel läßt sich dieses Rauschen dämpfen. Elektronische Bandpassfilter (Tiefpass) führten nicht

zum gewünschten Ergebnis, eine galvanisch getrennte Verstärkung mittels der Verstärkungseinheit eines X/Y-Schreibers verstärkte sowohl die Spannung als auch das Rauschen. Äußere Effekte konnten nach Versuchsreihen mit Masseerdung und Abschirmung ausgeschlossen werden. Somit wurden diese Spannungsschwankungen durch das Programm unterdrückt: Ein sogenannter "Average-Block" kann den gleitenden Durchschnitt aus eingehenden Meßwerten berechnen.

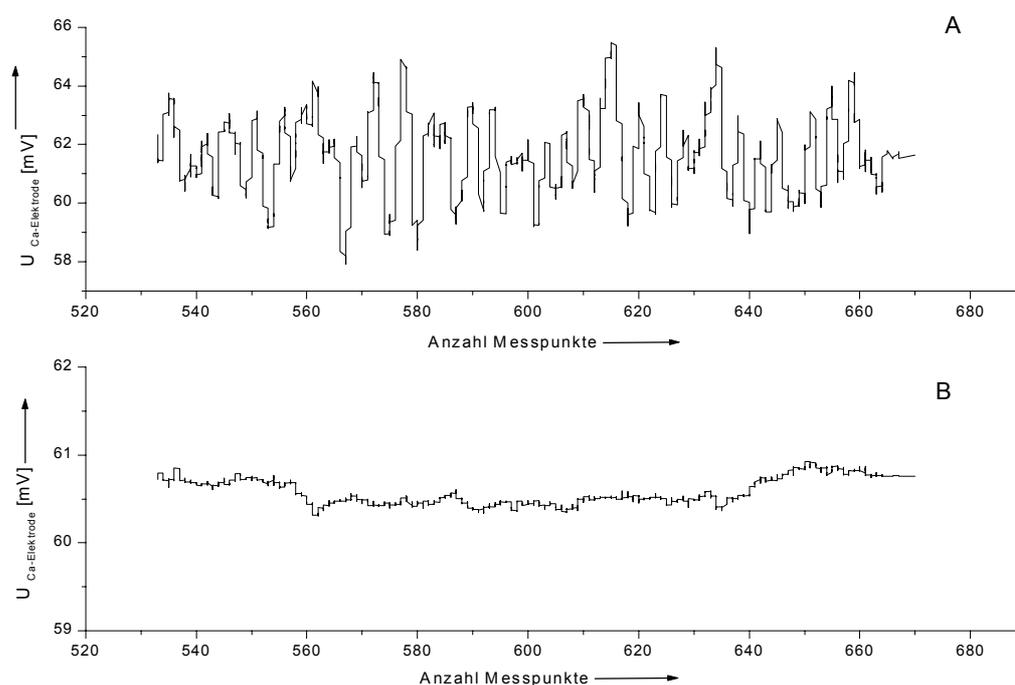


Abb. 9.7: Verlauf des Rauschens der Calcium-Elektrode bei einer Messung von 0,1 M $Ca(NO_3)_2$ -Lösung. A: Ohne Dämpfung, B: Gleitender Durchschnitt über 500 Meßpunkte (Durchführung des Programms alle 50 ms)

9.1.3.3 Drift

Für konventionelle CC-Versuche, die in einem Zeitrahmen von 20-30 Minuten bis zu wenigen Stunden durchgeführt werden, ist die Stabilität der Calcium-Elektrode ausreichend gut.

In längeren Zeiträumen beginnt sich die Elektrodenspannung oft zu höheren oder niedrigeren Werten hin zu bewegen (Abb. 9.8). Hierbei können verschiedene Effekte einen Einfluß ausüben:

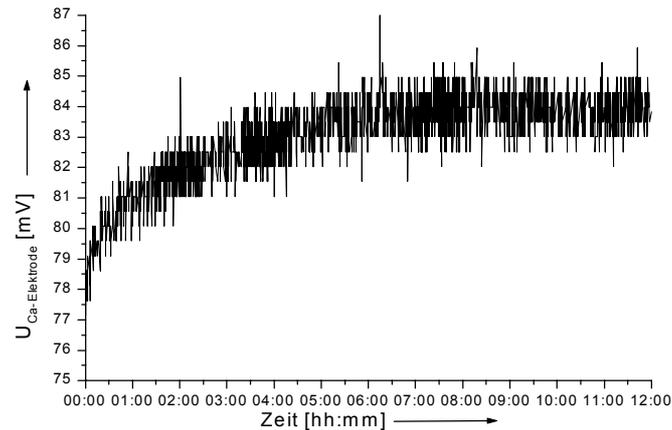


Abb. 9.8: Drift der Calcium-Elektrode innerhalb von 12 Stunden hin zu höheren mV-Werten bei der Messung einer 66.5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung.

- a. Chemische Reaktionen: Durch das Eindringen von CO_2 aus der Luft fällt bei Versuchen in stark alkalischer Calcium-Lösung Calciumcarbonat aus, welches die Meßlösung an Ca^{2+} verarmen läßt. Besonders in hohen pH-Bereichen sollte daher Stickstoff durch die Meßlösung geleitet werden.
- b. Mechanische Effekte: Die Elektrodenspannung hängt auch davon ab, wie locker oder fest die Kappe, welche eine Feder hält, mit der Elektrodenumhüllung verschraubt ist (Abb. 9.2). Festere Verschraubung senkt den Ionenkontakt zwischen der AgCl -Lösung und der Meßlösung. Lockere Verschraubung unterstützt den Ionenkontakt, gleichzeitig besteht jedoch die Gefahr, daß zu viel AgCl -Lösung in die Meßlösung eindringen kann.
- c. Diffusionseffekte: Werden zwei Lösungen unterschiedlicher Zusammensetzung in Kontakt gebracht, entstehen Potentiale. Diese resultieren aus der Diffusion von Ionen in die Lösungen. Diffundieren diese Ionen in unterschiedlichem Maß, wird die Elektrodenladung ungleich durch die Flüssigkeitsgrenze transportiert. Die Änderung dieser sogenannten „flüssigen Verbindungspotentiale“ (*liquid junction potentials*) kann zu diesen Drifteffekten führen. Wenn das Ausmaß der Diffusion positiver und negativer Ladungsträger aus der Referenzlösung in die Probenlösung gleich ist, treten solche Potentiale nicht auf. Der Einsatz von ISA (siehe oben) beziehungsweise das Konstanthalten der Ionenstärke der Meßlösung durch Einsatz eines „Hintergrundelektrolyts“ (gemäß Kapitel 3.3.2 bei Kristallisationsversuchen von Calciumphosphaten am

ehesten KNO_3) bei den konventionellen CC-Versuchen kann dies verhindern [Gilman & Hukins 94].

Nach verschiedenen Versuchsreihen erscheint der größte Einfluß von den mechanischen Effekten auszugehen. Bei einer nicht zu festen Verschraubung der Elektrodenkappe kommt es erfahrungsgemäß nur zu geringen Drifteffekten. Hierbei lassen sich jedoch keine Werte weitergeben, allein durch einen routinierten Einsatz einer ionenselektiven Elektrode lassen sich diese Erfahrungen gewinnen.

9.2 Die pH-Meter

Zur Kontrolle der pH-Werte und der Temperaturen in den Reaktionsgefäßen wurden zwei WTW pH 340 pH-Meter mit Temperaturfühlern und temperaturkontrollierten pH-Wert über die RS 232-Schnittstellen an den Computer angeschlossen. Befehle vom Computer an die pH-Meter im STRING-Datenformat (sog. *prompt string*) erlauben es, Tastendrücke am pH-Meter zu simulieren. So provoziert der Befehl „K.9“ in Verbindung mit einem „Enter“-Zeichen („^M“) das Ein- und Ausschalten des pH-Meters. „K.7“ bewirkt das Transferieren eines Datenpakets mit aktuellem pH-Wert und Temperatur zum Computer. Der Befehl „K.18“ bewirkt eine Antwort mit dem Inhalt „K.18*“, welches darüber informiert, ob das pH-Meter eingeschaltet und funktionsfähig ist.

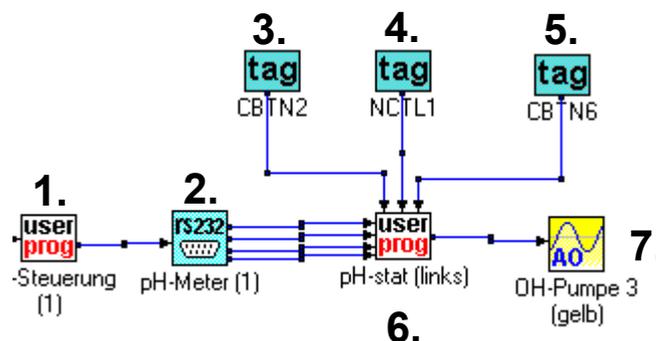


Abb. 9.9: VISIDAQ-Programmstruktur für den Anschluß eines pH-Meters und einer Titrationseinheit (pH-stat-Einheit). Das Steuerprogramm 1 gibt die genannten Befehle an das pH-Meter, welches hier über den RS 232-Block 2 mit dem Programm verbunden ist. Ein Ein/Aus-Schalter 3 bestimmt die Funktion der pH-stat-Einheit 6. Über einen Nummernblock 4 wird der vorgegebene pH-Wert eingegeben, ein weiterer Schalter 5 bestimmt darüber, ob Säure oder Lauge zutitriert wird. Das pH-stat-Programm 6 vergleicht den Vorgabe-pH-Wert von 4 mit dem aktuellen pH-Wert aus 2 und gibt gegebenenfalls Signale an die Pumpe 7.

Die Werte vom pH-Meter kommen im STRING-Datenformat (*response string*) im pH-stat-Block an und müssen zunächst in eine Fließkommazahl (FLOAT-Format) umgewandelt werden. Weitere Parameter sind die Übertragungsrate und Zeitabstände in denen die Datenpakete übertragen werden (siehe Tabelle 9.2).

<i>Geschwindigkeit</i>	4800 Baud
<i>Datenbits</i>	8
<i>Parität</i>	keine
<i>Stoppbits</i>	1
<i>Wartezeit auf Antwort (idle time)¹</i>	500 msec
<i>Wartezeit nach Antwort (wait time)²</i>	3 msec
<i>Anzahl Versuche³</i>	1

Tabelle 9.2: Eigenschaften der pH-Wert-Übertragung. ¹Wartezeit auf Antwort ist die Zeit, die der Computer verstreichen läßt, bis er beginnt, eine Antwort von der seriellen Schnittstelle zu erwarten. Die pH-Meter sind mit 500 msec Wartezeit etwas träge. ²Wartezeit nach Antwort ist die Zeit, die das Programm nach erfolgloser Wartezeit auf Antwort verstreichen läßt. ³ Anzahl Versuche bezeichnet, wie oft die beiden Wartezeiten wiederholt werden, bevor ein neuer Befehlsstring an das pH-Meter geschickt wird.

Es stellte sich heraus, daß die pH-Meter in nicht unerheblicher Weise störanfällig sind. Kommen zum Beispiel zu viele Befehlsstrings in zu kurzer Zeit, so läuft der Arbeitsspeicher des pH-Meters über und das Gerät reagiert nicht mehr auf Tastendruck. Daher sind hier die Wartezeiten tabelliert, die nach vielen Versuchsreihen als die idealen Werte herausgearbeitet werden konnten. Trotzdem wurde nicht darauf verzichtet, daß die pH-Meter routinemäßig alle 100 Sekunden ab- und angeschaltet werden.

9.3 Die Peristalticpumpen

Zur Konstanthaltung der pH-, Ca- und Phosphat-Werte wurden drei ISMATEC Reglo MS 2/6-Peristalticpumpen verwendet. Diese Pumpen bieten mit ihren 6 Rollen und zwei Kanälen genügend Spielraum für verschiedene Durchflußmengen. Standardmäßig wurden bei den hier vorliegenden Versuchen Tygon-Schläuche mit 3 mm Durchmesser verwendet. Zwei Pumpen, die jeweils einkanalig genutzt wurden, dienten dabei der Titration von Säure bzw. Lauge zur Regelung der geforderten pH-

Werte. Eine weitere Pumpe wurde zweikanalig genutzt, so daß der Calcium- als auch der Phosphat-Wert mit nur einer Pumpe konstant gehalten wurde.

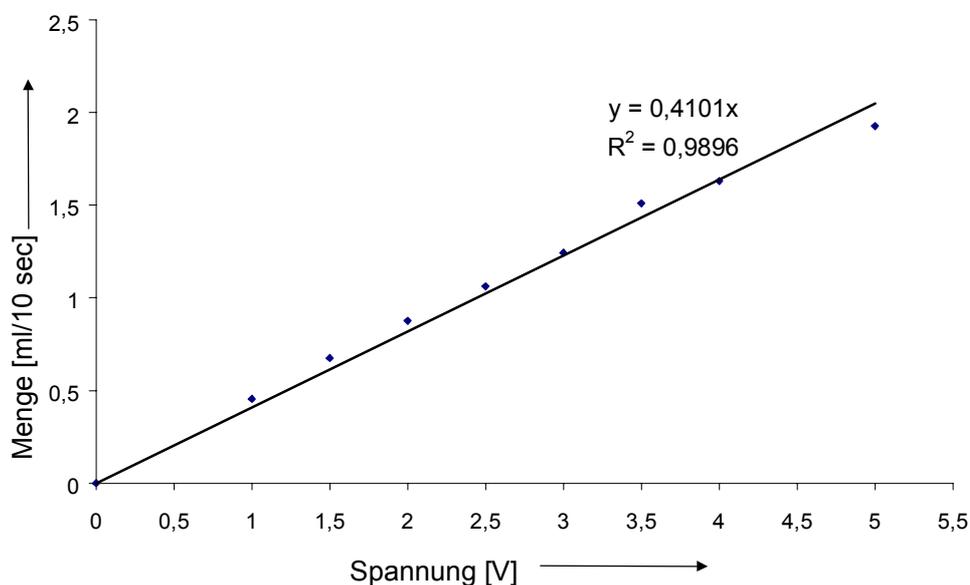


Abb. 9.10: Kalibrationsgerade einer Peristalticpumpe. Im Diagramm ist auch die Regressionsgerade und die dazugehörige Gleichung mit Korrelationskoeffizienten abgebildet.

Die Pumpen wurden über die D/A-Wandlerkarte mit einer Spannung von 0-5 V angesteuert. Um die gepumpte Flüssigkeitsmenge zu erfassen, wurden sämtliche Pumpen kalibriert. Dabei wurde 10 s lang bei einer konstanten Spannung (1-5 V in 0,5 V-Schritten) Wasser in zuvor gewogene und getrocknete Präparategläschen gefüllt. Nach dem Befüllen wurde die Auswaage bestimmt und nach einer Korrektur der Dichte der Lösungen in ein Kalibrationsdiagramm, wie in Abbildung 9.10 gezeigt, übertragen. Die lineare Regression lieferte den Korrelationswert, der zur Umrechnung von Volt in ml/10 s benötigt wird. Durch eine Varianzbestimmung konnte der Wägefehler bestimmt werden.

Ein weiterer Faktor, der in die Fehlerbetrachtung mit einbezogen wurde, war die Bestimmung des Gewichts eines Tropfens. Bei laufender CCDD-Anlage wird die zutitrierte Menge alle 10 Sekunden auf die Computerfestplatte gespeichert, um später aus den Zugabekurven quantitative Aussagen gewinnen zu können. Dabei ist es von Bedeutung, ob tatsächlich die gesamte zugepumpte Menge in das Reaktionsgefäß eingebracht worden ist, oder ob eine kleinere Menge davon an den dünnen Tygon-Schläuchen hängen geblieben ist.

9.4 Fehlerbetrachtung

Aus den Varianzen, den Regressionsfaktoren und den Tropfengewichten lassen sich die Fehler der Pumpen ermitteln. Weiterhin kommen dazu die Wägefehler und die Rundungsfehler des Computers. Durch diese Faktoren konnten die in Tabelle 9.3 aufgelisteten Werte bestimmt werden.

<i>Gerät</i>	<i>Fehler</i>
Pumpen	2 % [ml]
pH-Meter (Herstellerangabe)	5% ($\pm 0,02$ pH bei pH 7.00)
Ca-Elektrode (Herstellerangabe)	4% [mV]
Gesamtfehler Calcium-Seite	6% [ml]
Gesamtfehler Phosphat-Seite	7% [ml]

Tabelle 9.3: Fehler der Pumpen

9.5 Durchführung der **CCDD**-Versuche

Um die Kristallisationsgeschwindigkeit zu senken, wurde als Standardkonzentration wurde die halbe Konzentration früherer Versuche [Schwarz & Epple 98], [Kniep & Busch 96] eingesetzt. Um bestmöglich zu verhindern, daß Fremdionen in das Apatitgitter eingebaut werden, wurden, im Gegensatz zu den früheren Diffusionsversuchen möglichst große Gegenionen gewählt. Gemäß den Literaturdaten wurden daher Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumfluorid und Calciumnitrat gewählt, so daß als Reaktionsprodukt neben den apatitischen Produkten nur Kaliumnitrat übrigbleiben sollte, das den geringsten Einfluß auf das Apatitgitter hat (vgl. Kapitel 3.3.2) [Zawacki et al. 86], [Umegaki et al. 89].

Ca(NO ₃) ₂ -Konzentration Vorlage ¹	66 mM
KH ₂ PO ₄ -Konzentration Vorlage	40 mM
KF-Konzentration Vorlage	13,5 mM
Ca(NO ₃) ₂ -Konzentration Zugabe ¹	405 mM
KH ₂ PO ₄ -Konzentration Zugabe	243 mM
KF-Konzentration Zugabe	81 mM
KOH-Konzentration Zugabe Ca ²⁺ -Seite ²	0,005-0,05
KOH-Konzentration Zugabe PO ₄ ³⁻ -Seite ²	0,005-0,1

Tabelle 9.4: Standardkonzentrationen der Vorlage- und Zugabelösungen der CCDD-Versuche. ¹Vorlage: Konzentrationen in den thermostatisierten Reaktionsgefäßen, Zugabe: Konzentrationen in den Vorratsgefäßen für die Pumpen. ²abhängig von pH-Bedingungen.

Die Standardreaktionszeit betrug 7 Tage, die Reaktionstemperatur 37°C. Der pH-Wert wurde vor Einschalten der Anlage in beiden Reaktionsgefäßen mittels Zugabe von KOH bzw. HNO₃ auf den gewünschten Wert eingestellt (meist physiologischer pH 7,4). Auch in dem Calcium-Vorratsgefäß (Zugabeflüssigkeit) und vor allem in den Phosphat-Vorratsgefäß (zur Pufferwirkung des Phosphat-Systems vgl. Abb. 3.1) wurde der pH-Wert auf den gewünschten Vorgabewert in den Reaktionsgefäßen eingestellt, um Schwingungen zu verhindern.

Wie in Kapitel 9.1.3 erklärt, führen elektrochemische Effekte dazu, daß die Calcium-Elektrode einen Spannungssprung vollführt, sobald in dieselbe Lösung eine pH-Elektrode eingetaucht wird. Die zweite pH-Elektrode auf der Phosphat-Seite (also

getrennt durch die poröse Polyglycolid-Matrix) hat durch die Trennung mit der Matrix einen geringeren Effekt auf die Spannung der Ca-Elektrode. Durch das langsame Durchfeuchten der Polyglycolid-Matrix wird dieser Effekt größer. Daher wurde die Polyglycolid-Tablette vor dem Einspannen in die Anlage ca. 1 Stunde lang in Wasser durchfeuchtet. Da die Calcium-Elektrode ebenfalls ca. 30 Minuten benötigt, bis die Spannung einen konstanten Wert angenommen hat, wurde zusätzlich dieser Zeitraum abgewartet, bis die Spannung konstant war, bevor die Anlage eingeschaltet wurde.

9.6 Effizienz der **CCDD**-Versuche

Vorversuche ergaben bei geringeren Konzentrationen, daß, wenn größere Mengen Calcium- und Phosphat-Lösung zugegeben wurden, sich der pH-Wert um wenige Nachkommastellen veränderte, was eine Reaktion der pH-stat-Einheit provozierte und somit die Lösung wiederum an Ca^{2+} und PO_4^{3-} verarmte. Diese Verarmung an Calcium registrierte die Calcium-Elektrode und das Programm schaltete die Calcium/Phosphat-Pumpe ein, um einen Konzentrationsausgleich zu erreichen. Dadurch sank wiederum der pH-Wert, was eine weitere Aktion der pH-stat-Einheit provozierte. Diese Schwingungseffekte ließen sich mit der geeigneten Konzentrationswahl unterdrücken.

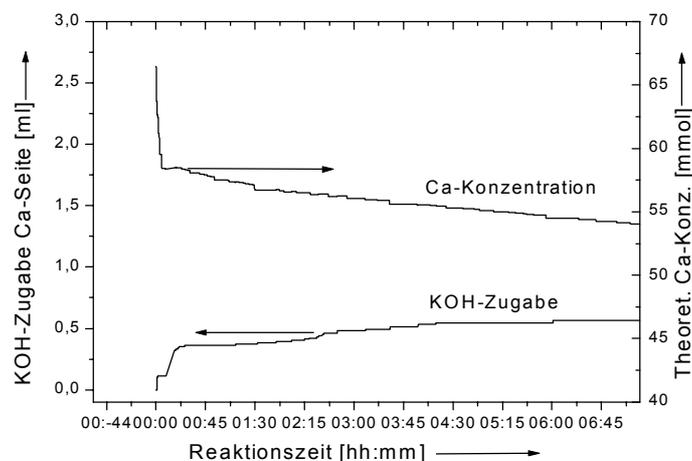


Abb. 9.11: Absinken der theoretischen Calcium-Konzentration durch Verdünnungseffekt in den Vorlagegefäßen innerhalb von 6 Stunden bei zu geringer Calcium-Konzentration der Pumpenzugabe (186 mmol) und zu geringer KOH-Konzentration (0,005 mmol).

Als weiteres Problem ergab sich nach Unterdrückung der Schwingungseffekte, daß bei zu niedriger Laugenkonzentration zwar die pH-Kontrolle sehr effizient arbeitete und eine pH-Konstanz von nahezu $\pm 0,02$ pH möglich war, jedoch der Verdünnungseffekt so stark war, daß die Lösung innerhalb weniger Stunden um 10 mmol/l Calcium bzw. Phosphat verarmte (Abb. 9.11). Daher wurden die Zugabekonzentrationen so gewählt, daß durch diesen Verdünnungseffekt der KOH-Zugabe durch Zugabe weniger 100 μl $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ - und KH_2PO_4 -Lösung die Standardkonzentrationen in den Diffusionsgefäßen stabil gehalten werden konnten und gleichzeitig die pH-Schwingungen unterdrückt werden konnten.

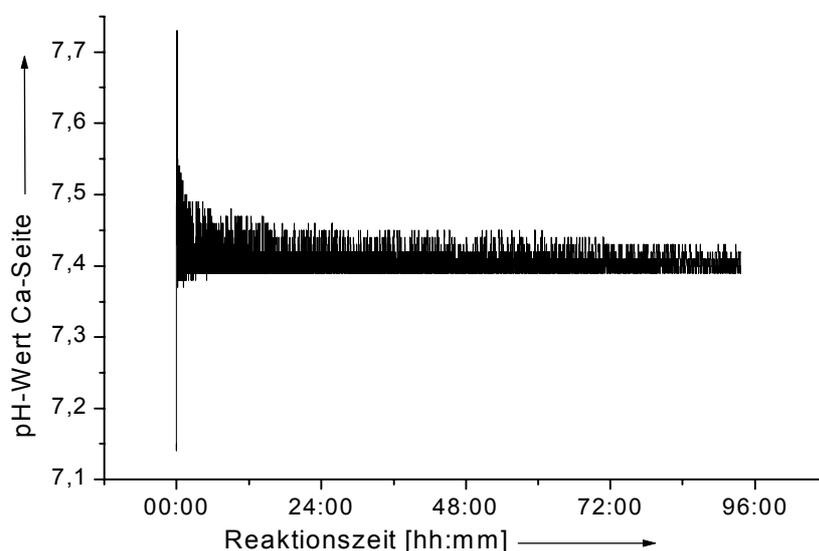


Abb.9.12: Effizienz der pH-Kontrolle auf der Calcium-Seite des Diffusionsgefäßes. Soll-pH-Wert war 7,4.

Die Effizienz der pH-Kontrolle ist auf den Abbildungen 9.12 und 9.13 dargestellt. Da die pH-Werte schon vor Einschalten der CC-Anlage mittels Zupipettieren von KOH bzw. HNO_3 auf den gewünschten pH-Wert eingestellt wurden, erfolgen die anfänglichen und größten pH-Sprünge nur im Bereich von $\pm 0,7$ pH. Das Konstanthalten des pH-Wertes funktioniert mit fortschreitender Zeit immer effektiver; dieser Effekt ist auf eine "Dämpfungskonstante" im pH-stat-Programm zurückzuführen: Bei Sinken des pH-Wertes durch Kristallisation (vgl. Reaktionsgleichung [8.6]) beginnt die Peristalticpumpe, gesteuert durch den Computer, KOH-Lösung zuzupumpen. Wenn sich in der nächsten Zeiteinheit (vgl. Tabelle 9.2) der pH-Wert nicht geändert hat, so wird das Spannungssignal zur Peristalticpumpe erhöht, die Pumpe arbeitet schneller. Re-

gistriert das pH-Meter nun eine Übertitration (über den eingestellten pH-Wert hinaus), so wird das Spannungssignal, das an die Peristalticpumpe gesendet wird, bei dem nächsten Sinken des pH-Wertes unter den gewünschten Wert, um eine "Dämpfungskonstante" gesenkt, die Pumpe arbeitet langsamer. So nähert sich die Titration immer näher der Kinetik der HAP/FAP-Kristallisation an und die pH-Wert-Schwankungen sind immer geringer.

Die Effizienz auf der Phosphat-Seite des Diffusionsgefäßes ist erwartungsgemäß wesentlich höher. Gerade in pH-Bereichen um 7,4 befindet sich die zweite Hydrolysestufe der Phosphorsäure und somit ein Pufferungsbereich (Siehe Abb. 3.1). Die Schwankungen betragen nur in Einzelfällen mehr als $\pm 0,01$ pH. Diese höhere Effektivität macht sich auch im Programm bemerkbar.

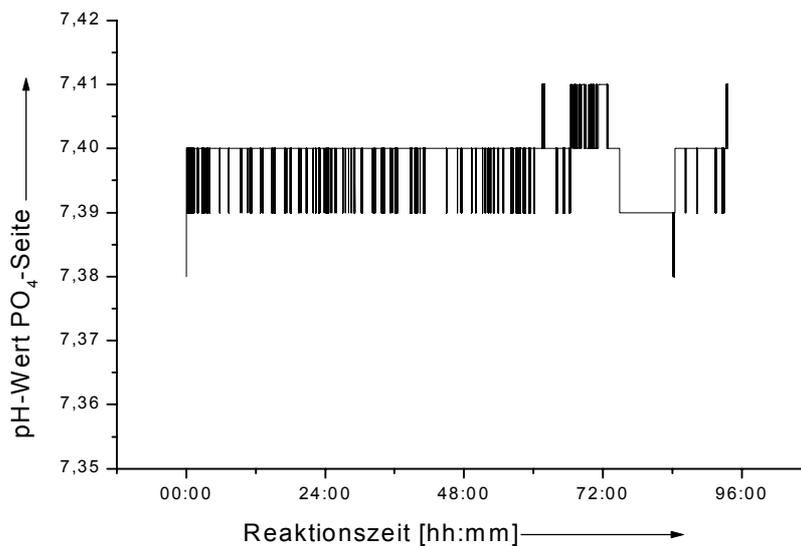


Abb. 9.13: Effizienz der pH-Kontrolle auf der Phosphat-Seite des Diffusionsgefäßes. Soll-pH-Wert war 7,4.

Der Wert der "Dämpfungskonstante" mußte weit niedriger gewählt werden, da bei einem Sinken des pH-Wertes der Phosphat-Seite effektiv eine wesentlich größere Menge an Hydroxylionen nötig ist, um den pH-Wert wieder zu erhöhen. Auch die KOH-Zugabekonzentration der Phosphat-Seite wurde oft wesentlich höher gewählt als die der Calcium-Seite.

In Abb. 9.14 ist die Konstanz der Ionengehalte von Calcium und Phosphat abgebildet. Calcium wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) bestimmt. Um innerhalb des kalibrierten Bereiches des Gerätes von 1-5 mg/l zu sein, wurden dem

Reaktionsgefäß (Calcium-Seite) 100 μl Ca^{2+} -Lösung entnommen, dazu wurde 1 ml 65% HNO_3 p.a. gegeben und anschließend mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Die photometrische Phosphat-Bestimmung wurde nach der Vanadomolybdat-Methode durchgeführt. Hierbei wurden dem Reaktionsgefäß (Phosphat-Seite) 125 μl PO_4^{3-} -Lösung entnommen und nach der Zugabe von 1 ml verdünnter HNO_3 in der Küvette auf 25 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 ml Vanadomolybdat-Meßlösung (Herstellung siehe präparativer Teil) wurde nach 3 Minuten Reaktionszeit das Gemisch gegen eine Leerprobe im Photometer bei 430 nm vermessen.

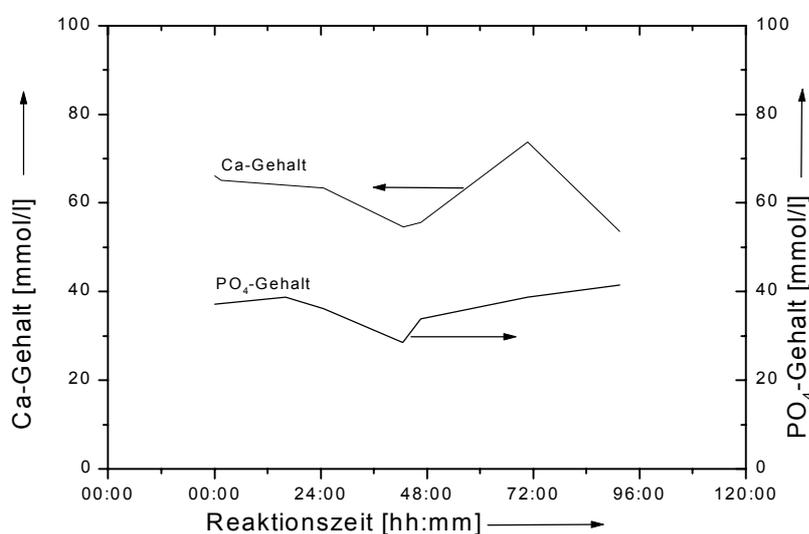


Abb. 9.14: Effizienz der Konstanz des Calcium-Gehaltes (AAS) und des Phosphat-Gehaltes (Photometrisch nach der Vanadomolybdat-Methode) in den Reaktionsgefäßen.

Fluorid stört diese Bestimmungsmethode und ergibt negative Störungen. Versuche im Vorfeld, um einen Zahlenwert der negativen Störungen zu erhalten, schlugen fehl, jedoch betragen die Abweichungen nie mehr als -10%. Weil die meisten Versuche mit einem Calcium zu Fluorid- (Ca/F-) Verhältnis von 5 (66 mmol $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und 13,5 mmol KF) durchgeführt wurden, können diese Messungen keinen Absolutwert repräsentieren, sondern nur einen Hinweis darauf geben, daß innerhalb der gesetzten Grenzen eine Konstanz der Ionenkonzentrationen erreicht worden ist.

9.7 Ergebnisse der **CCDD**-Versuche

Augenscheinlich fand die Kristallisation hauptsächlich auf der Phosphat-Seite statt (Abb. 9.15). Die Tablette wurde schräg geschnitten, um einen möglichst guten Überblick über das Innere der Tablette zu erhalten und mit dem Rasterelektronenmikroskop untersucht.

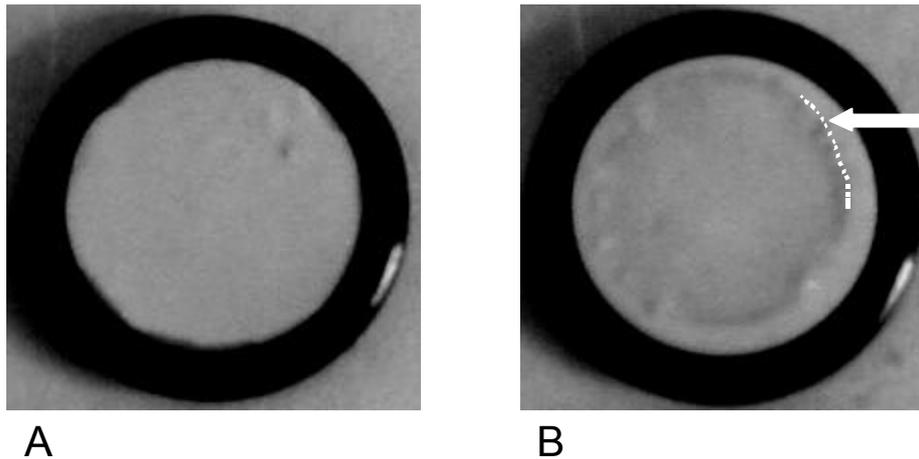


Abb 9.15: Native Photographie einer Polyglycolid-Tablette nach 7 Tagen Interdiffusion von Fluorapatit bei 37°C. A: Calcium-Seite, B: Phosphat-Seite. Die Kristallbildung auf der Phosphat-Seite ist deutlich erkennbar (Pfeil).

Wie in Abb. 9.15 erkennbar ist, erfolgte besonders in den Randzonen, wo der Dichtungsring der Klemmkonstruktion zwischen den thermostatisierten Gefäßen auflag, eine besonders dichte Kristallisation.

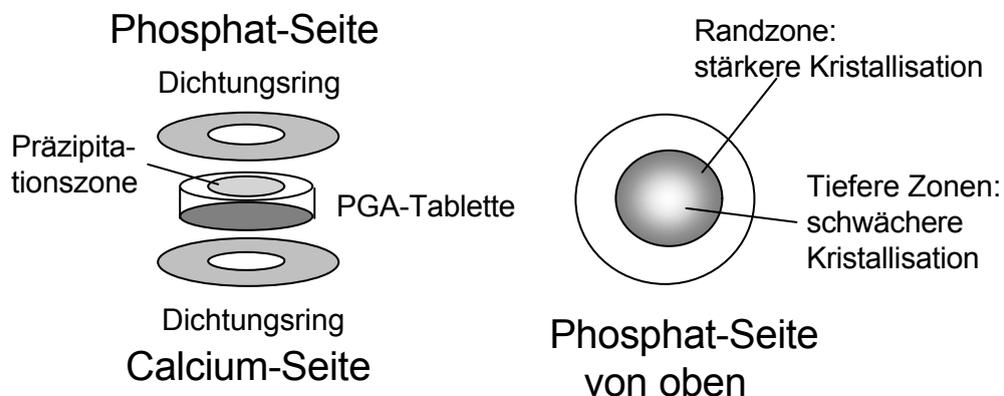


Abb. 9.16: Lage der Dichtungsringe und der hauptsächlichsten Präzipitationszonen auf der Oberfläche der Phosphat-Seite der Polyglycolid-Tablette.

Dies erfolgte vermutlich durch Verdunstungseffekte an den Randbereichen der Dichtungsringe. Hier, wo die Polyglycolid-Tablette Luftberührung hat, kann geringfügig Verdunstung erfolgen; dabei kommt es zu lokalen Übersättigungen an Calcium wie auch an Phosphationen und somit zu einer stärkeren, jedoch unspezifischen, Kristallisation. Dieser Effekt wird zur Mitte der Tablettenoberfläche hin schwächer, so daß ein Konzentrations- und somit ein Kristallisationsgradient auftritt.

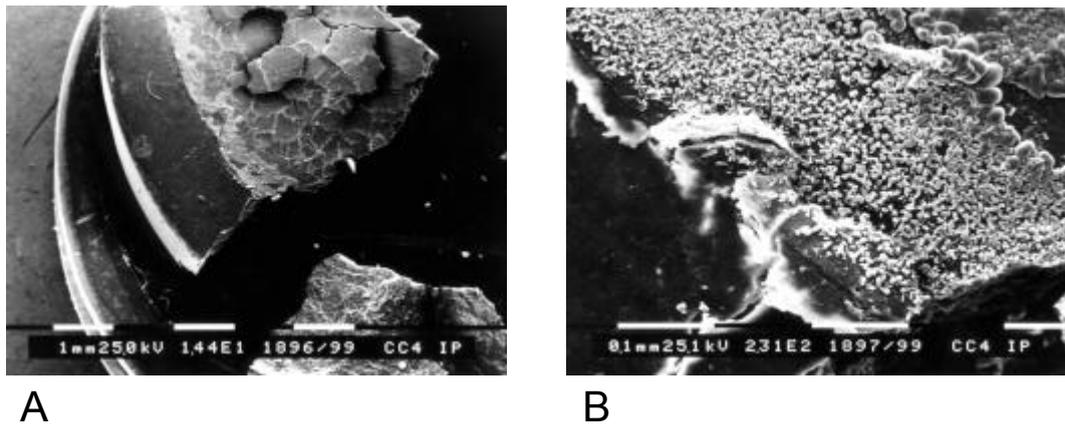


Abb. 9.17: Übersicht über die Oberfläche der Phosphat-Seite eines *CCDD*-Versuches. A: Überblick über die verschiedenen Präzipitationszonen (Vergrößerung 14X); B: Nähere Aufsicht auf den Grenz-bereich des Dichtungsringes (231X)

Da die langsame Kristallisation unter biomimetischen und definierbaren Bedingungen das hauptsächliche Ziel der Arbeit war, wurde in nur wenigen Fällen diese Randzonen in die folgenden Betrachtungen einbezogen. In den Mittelbereichen traten wesentlich besser definierbare und einzeln beobachtbare Kristallmodifikationen auf.

9.7.1 Ergebnisse des Standardversuchs unter physiologischen Bedingungen

Als Standardversuch wurden die in obiger Tabelle 9.4 angegebenen Konzentrationen verwendet. Die weiteren Bedingungen waren pH 7,4 und 37°C bei 7 Tagen Reaktionszeit.

Abb. 9.18 zeigt eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Übersicht über die schräg gebrochene Tablette des Versuches. Links befindet sich die Phosphat-Oberfläche, nach rechts bewegt man sich immer tiefer in das Tabletteninnere in Richtung der Calcium-Seite. Schon auf der Übersicht bei geringer Vergrößerung lassen sich verschiedene Morphologien erahnen.

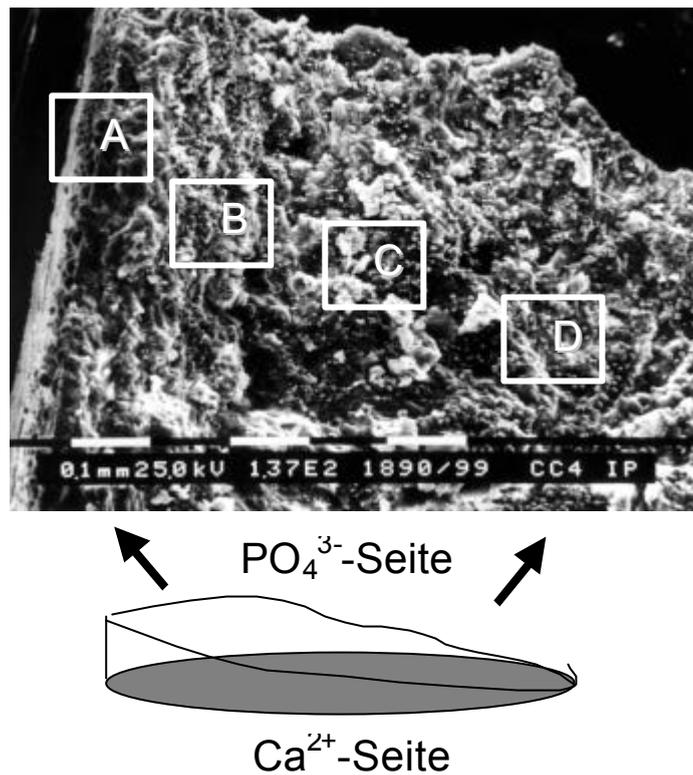


Abb. 9.18: Übersicht über die schräg gebrochene Tablette des CCDD-Standardversuches (Vergrößerung 137X)

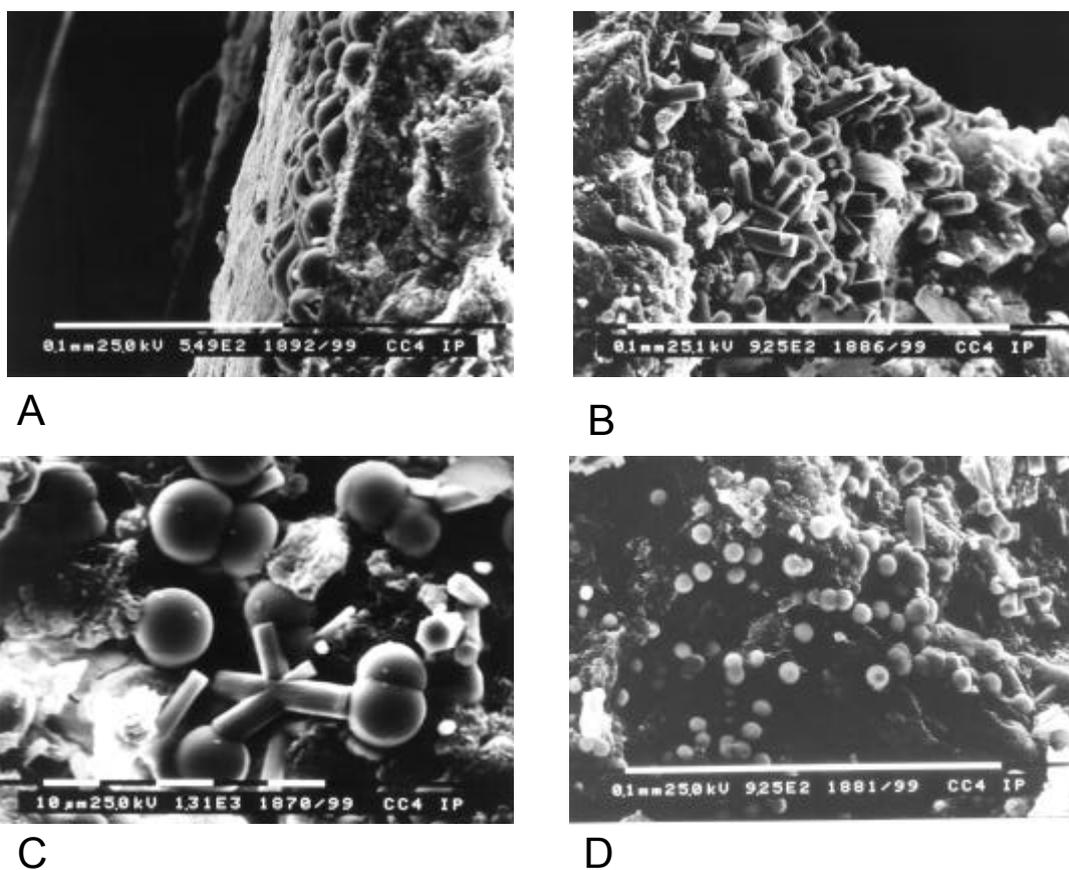


Abb. 9.19: Einblick in die verschiedenen Kristallisationszonen gemäß Abb. 9.18. A: Randzone an Tablettenkante (549X), B: Hexagonale Kristalle nahe der PO_4^{3-} -Oberfläche (925X), C: Kugeln und hexagonale Kristalle in der Mitte (1310X), D: Kugelaggregate in Richtung der Ca^{2+} -Seite (925X)

In Abbildung 9.19 sind, gemäß Abb. 9.18, tiefer gehend in das Tabletteninnere in Richtung der Calcium-Seite die verschiedenen Kristallformen in höherer Vergrößerung gezeigt. An der Kante der Tablette, hauptsächlich in Richtung der Phosphat-Seite, erkennt man ein kugelförmiges Auswachsen senkrecht zur Matrix mit Durchmessern zwischen 19 und 25 μm . Sehr regelmäßige, hexagonal geformte Stäbchen befinden sich kurz unter der Phosphat-Oberfläche, der Durchmesser variiert zwischen 18-21 μm (höhere Regionen, näher zur Phosphat-Seite) und 12-16 μm in tieferen Regionen. Das ist ein erster Hinweis darauf, daß die Kristalle näher zur Phosphat-Seite hin älter, größer und ausgereifter sind. Dies ist außerdem ein weiteres Indiz dafür, daß Calcium-Ionen wesentlich schneller durch die Matrix diffundieren als Phosphat-Ionen. Die hohe Kristallitdichte auf der Oberfläche der Phosphat-Seite bestätigt diese Beobachtung.

Weiter zur Calcium-Seite hin, ungefähr zur geometrischen Mitte der Tablette, treten vermehrt kugelförmige Kristallmodifikationen auf. Zunächst findet man noch eine Mischung aus der hexagonalen und der radialen Wachstumsform, in tieferen Regionen zeigen sich immer weniger hexagonale Stäbchen. Der Kugeldurchmesser variiert zwischen 7 und 14 μm , die kleineren Kugelaggregate sind dabei in tieferen Bereichen auskristallisiert. Als weitere Tatsache sei vermerkt, daß in gleich tiefen Regionen die Kristallitgröße nahezu gleich ist. Da es keine Zwischenbereiche gibt, in denen Übergangsformen zwischen der hexagonalen und der radialen Kristallform beobachtbar sind, muß es sich hier um zwei unterschiedliche Modifikationen mit unterschiedlichen Wachstumsstufen handeln.

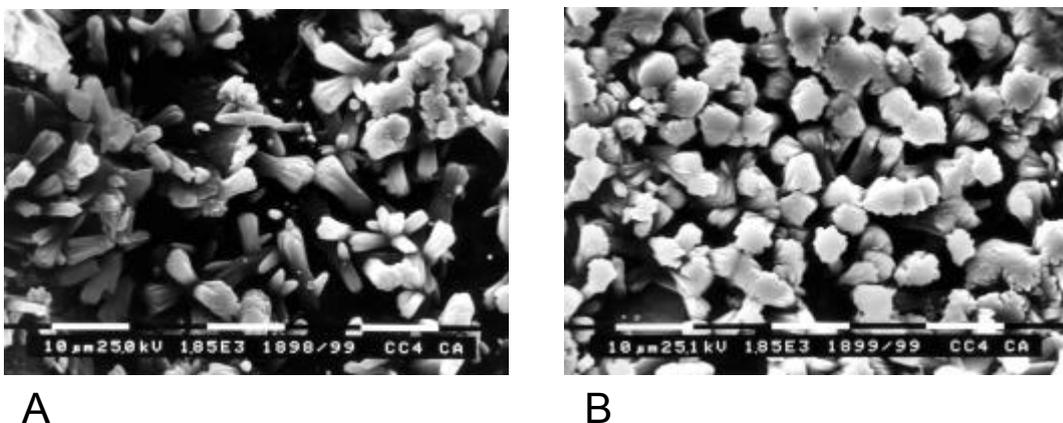


Abb. 9.20: Kristallite auf der Oberfläche der Phosphat-Seite des CCDD-Standardversuches. Deutlich ist das Ausfächern zur Hantelform erkennbar (Vergrößerung 1850X).

Ein weiterer Anhaltspunkt dafür und für die These, daß jüngere Kristallite innerhalb der Tablette und ältere Kristallformen in Richtung der Phosphat-Seite zu finden sind, geben die Abbildungen 9.20. Hier sind Kristallmodifikationen auf der Oberfläche der Phosphat-Seite gezeigt, die mit dem Ausfächern nach Erreichen einer kritischen Keimgröße zur Hantelform hin begonnen haben [Kniep & Busch 96].

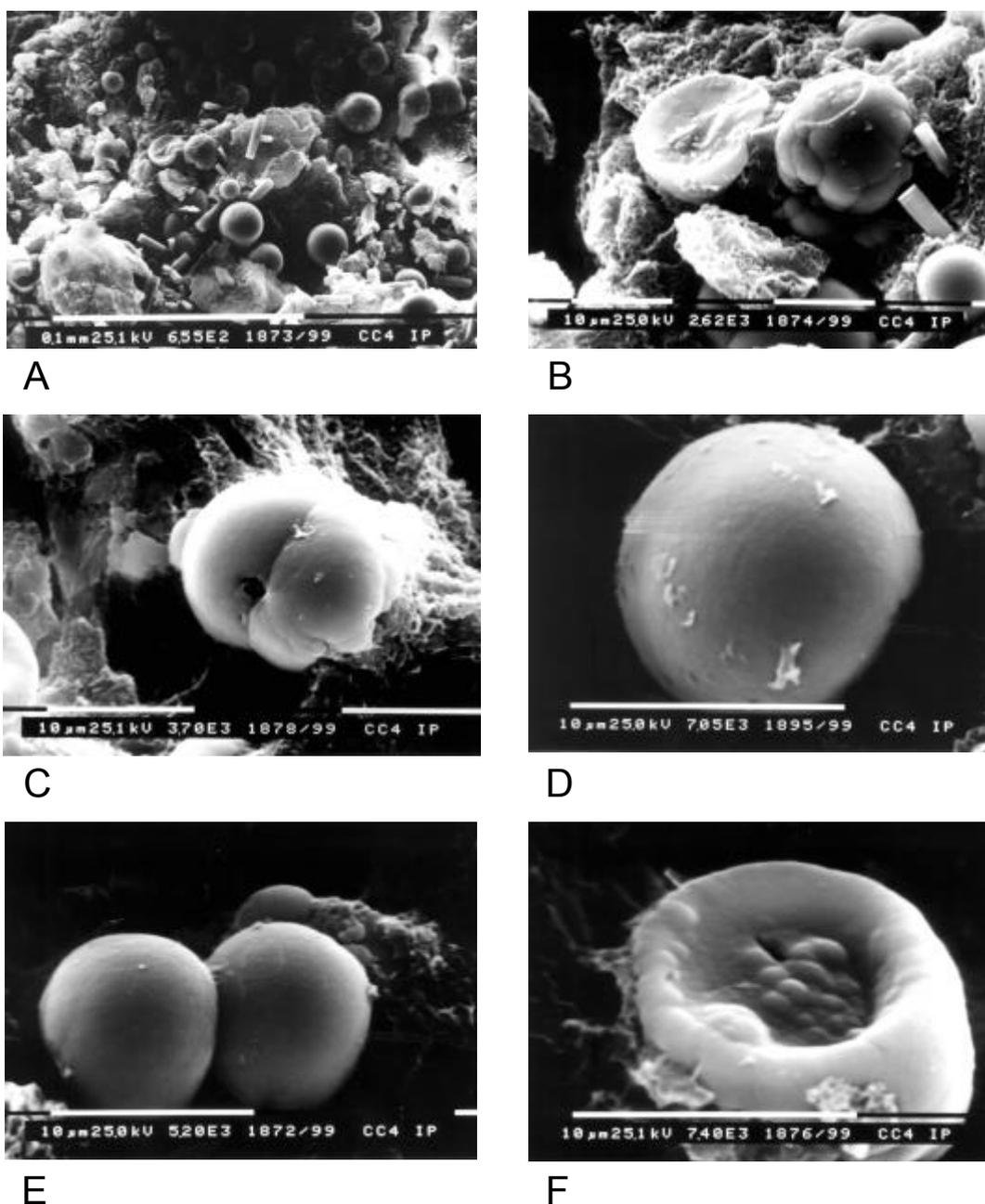


Abb. 9.21: Kugelaggregate innerhalb der Tablette zur Calcium-Seite hin. A: Kugeln verschiedener Wachstumsstadien und hexagonale Kristalle in Richtung der Phosphat-Seite (Vergrößerung 655X), B: Detailaufnahme von A (2620X), C, D, E: Verschiedene Kugelaggregate (3700X, 7050X, 2500X), F: Halbgeschlossenes Kugelaggregat mit jüngeren Auswüchsen innerhalb der Radialschale (7400X).

Die Länge der Hanteln ist, soweit erkennbar, mit 10-11 μm kürzer als die der hexagonalen Stäbchen innerhalb der Tablette nahe der Phosphat-Seite (12-21 μm je nach Tiefe). Der Durchmesser der Hanteln an der Stelle mit der größten Ausdehnung ist jedoch mit 3,5-5,5 μm nahezu gleich der der hexagonalen Kristalle innerhalb der Tablette (3,5-6 μm). Der Durchmesser der hexagonalen Stäbchen ist jedoch entlang des Kristalls gleich groß, da noch keine Ausfächerung stattgefunden hat. Offensichtlich ist also die kritische Keimgröße nicht immer gleich, sondern von weiteren Faktoren abhängig. Auf der Oberfläche beginnt das Kristallwachstum früher und die längere Zeit, die zur Ausfächerung in die Hantelform benötigt wird, ist somit eher gegeben.

Es ist davon auszugehen, daß es sich hierbei um Konzentrationseffekte handelt. Innerhalb der Tablette sind größere, regelmäßiger geformte Kristallite zu erkennen. Daraus ist zu schließen, daß hier eine niedrigere Ionenkonzentration vorlag, die eine regelmäßiger Kristallbildung fördert. Außerhalb der Tablette im KH_2PO_4 -haltigen Milieu erfolgt dagegen eine wesentlich schnellere Kristallisation im Phosphatüberschuß. So ist die Kristallbildung unregelmäßiger und schneller, die kritische Keimgröße für die Hantelbildung schneller erreicht.

Nach dieser Hypothese bilden sich die Kugeln bevorzugt in niedriger konzentriertem Medium, denn sie sind hauptsächlich in tieferen Regionen zu finden. Abb. 9.21 zeigt verschiedene Kugelaggregate. Dabei wird deutlich, daß diese Kugelaggregate nicht aus der Hantelform entstanden sein können, denn es sind keinerlei Zwischenstufen erkennbar. Vielmehr findet man in eine Richtung offene Kugeln (F), sowie Formationen, die an Schüsseln erinnern (A,B). Einige Kugelformen sind durch gehemmtes Wachstum verformt, wie z.B. zwei Kugeln, die an derselben Stelle in nahezu der gleichen Geschwindigkeit auskristallisiert sind (Abb. 9.21 C und E). Innerhalb der Schüsselformen sind in einigen Fällen kleinere, kugelförmige Auswüchse zu erkennen, die bei einer späteren lokalen Übersättigung an dem schon ausgereiften größeren Radialkristall entstanden sind (Abb. 9.21 F und B rechts oben).

Aufgrund dieser hier beobachteten Morphologien ist es eher unwahrscheinlich, daß ein Radialwachstum aus einem Keimkristall heraus für diese Kugelbildung verantwortlich ist. Dann nämlich müßten jüngere, kürzer ausgereifte Kristallite einfach aus kleineren Kugelaggregaten bestehen. Da aber verschiedenste Formen der nach oben zuwachsenden Kugeln innerhalb der Tablette sichtbar sind, sei hier folgender

Wachstumsmechanismus postuliert (Abb. 9.22): Ausgehend von einem Keimkristall bildet sich durch zweidimensionales Wachstum zunächst ein runder, tellerartiger

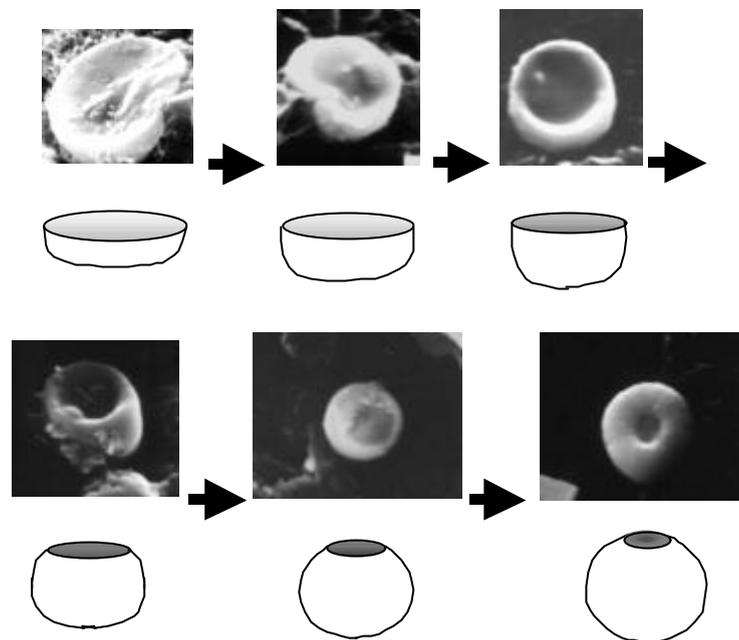


Abb. 9.22: Postulierter Mechanismus des Kugelwachstums im Inneren der Polyglycolid-Tablette bei pH 7,4 und Standardkonzentration

Primärkristall, der dann beginnt, seitlich in die dritte Dimension (in der Zeichnung nach "oben") auszuwachsen. Ausgehend von der so entstandenen Schüsselform bildet sich dann letztlich eine geschlossene Kugel.

Oberfläche Phosphat-Seite	 $9-11 \mu\text{m}$ $2-5 \mu\text{m}$
Innen Phosphat-Seite	 $14-20 \mu\text{m}$ $4-6 \mu\text{m}$ $10-12 \mu\text{m}$ In Ca-Richtung weniger Stäbchen
Innen Calcium-Seite ¹	 $5-6 \mu\text{m}$

Tabelle 9.5: Schematische Zusammenfassung der beobachteten Morphologien nach 7 Tagen FAP-Diffusion in Polyglycolid bei Standardkonzentration mit pH 7,4.¹ Innen Ca-Seite bedeutet Tabletteninneres etwas mehr in Richtung der Calcium-Seite gesehen.

9.7.2 Einfluß des pH-Werts auf die **CCDD**-Fluorapatit-Aggregate

Abb. 3.2 zeigt die Stabilitätsbereiche der einzelnen Calciumphosphat-Phasen in Abhängigkeit vom pH-Wert. Demnach ist Hydroxylapatit etwa bis zu einem pH-Wert von 4,5 die stabilste Phase. Aus dem Hydrolysegleichgewicht (Abb. 3.1) folgt, daß bei höheren pH-Werten mehr volldissoziierte PO_4^{3-} -Ionen vorliegen. Somit sollte die Kristallisation von Hydroxylapatit bzw. Fluorapatit durch höhere pH-Werte begünstigt sein.

Sämtliche Versuche der pH-Reihe wurden mit folgenden Konzentrationen durchgeführt:

Ca(NO ₃) ₂ -Konzentration Vorlage:	66,5 mM
KH ₂ PO ₄ -Konzentration Vorlage:	40 mM
KF-Konzentration Vorlage:	13,5 mM
Ca(NO ₃) ₂ -Konzentration Zugabe:	405 mM
KH ₂ PO ₄ -Konzentration Zugabe:	243 mM
KF-Konzentration Zugabe:	81 mM

Versuchs-Nummer(n)	28	6/31	4	8
pH	5	6	7,4	9
KOH-Zugabe Ca ²⁺ -Seite	0,005	0,005	0,005	0,05
KOH-Zugabe PO ₄ ³⁻ -Seite	0,005	0,01	0,01	0,1

Tabelle 9.6: Zugabekonzentrationen der KOH-Pumpen bei den verschiedenen pH-Versuchen.

Wie erwartet sind die Kristallite bei niedrigeren pH-Werten kleiner. Jedoch zeigt sich ein ähnlicher Habitus der Kristalle. Bei den Versuchen mit pH 5.00 findet man innerhalb der PO_4^{3-} -Seite Kugelaggregate mit einem Durchmesser von 1-1,5 μm , oberhalb der Phosphat-Seite weisen diese Aggregate einen Durchmesser von 0,4-1 μm auf. An diesen Aufnahmen erkennbar, daß, entgegen früherer Vermutungen, keine bevorzugte Kristallisation innerhalb der Poren erfolgt; vielmehr ist die Keimbildung auch hier hauptsächlich außerhalb der Poren erfolgt. Weitere Anhaltspunkte hierfür sind bei den anderen Versuchsreihen erkennbar.

Innerhalb der Tablette können nicht zu jeder Zeit Kristallaggregate beobachtet werden, so daß davon ausgegangen werden muß, daß sich Fluorapatit-Kristalle im Inneren der Tablette bevorzugt dann bilden, wenn bedingt durch die Herstellung oder durch Quelleffekte kleinere Hohlräume innerhalb der Tablette auftreten.

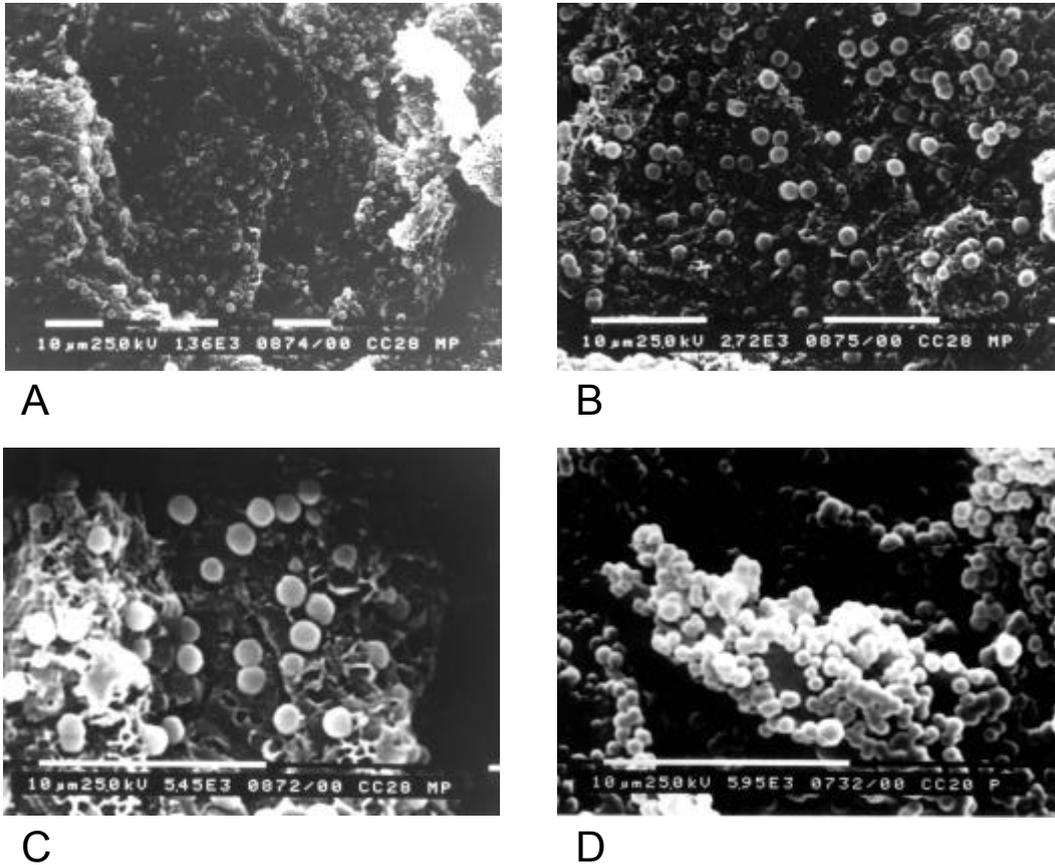


Abb. 9.23: Fluorapatit-Kugelaggregate nach 7 Tagen Diffusion bei pH 5. A, B und C: Innerhalb Tablette Phosphat-Seite (1360X, 2720X, 5450X), D: Kugelaggregate auf der Phosphat-Oberfläche (5950X)

Der Vergleich von Abb. 9.23 C und D zeigt aber, daß die Kristalle innerhalb der Tablette wesentlich regelmäßiger ausgeprägt sind. Daraus ist zu schließen, daß im Inneren des Polyglycolid-Pellets eine wesentlich definiertere Umgebung mit einer langsamen, regelmäßigen Kristallisation anzutreffen ist.

Bei der Diffusion von Fluorapatit unter dem kontrollierten pH-Wert 6 sind die glatten Kugelaggregate erwartungsgemäß etwas größer (0,9-2,3 µm). Weiterhin finden sich hier im Gegensatz zu den Versuchen bei pH 5 auf der Oberfläche die typischen hexagonalen Stäbchen, die gerade beginnen, zum Hantelwachstum auszufächern. Der Durchmesser an der breitesten Stelle der Hantelaggregate beträgt 1,4-3 µm. Der größte Durchmesser der Aggregate bei den Versuchen bei pH 7,4 beträgt 3,8-5,4 µm.

Die beginnenden Hantelaggregate sind wiederum nahezu senkrecht zur Tablettenmatrix aufgewachsen.

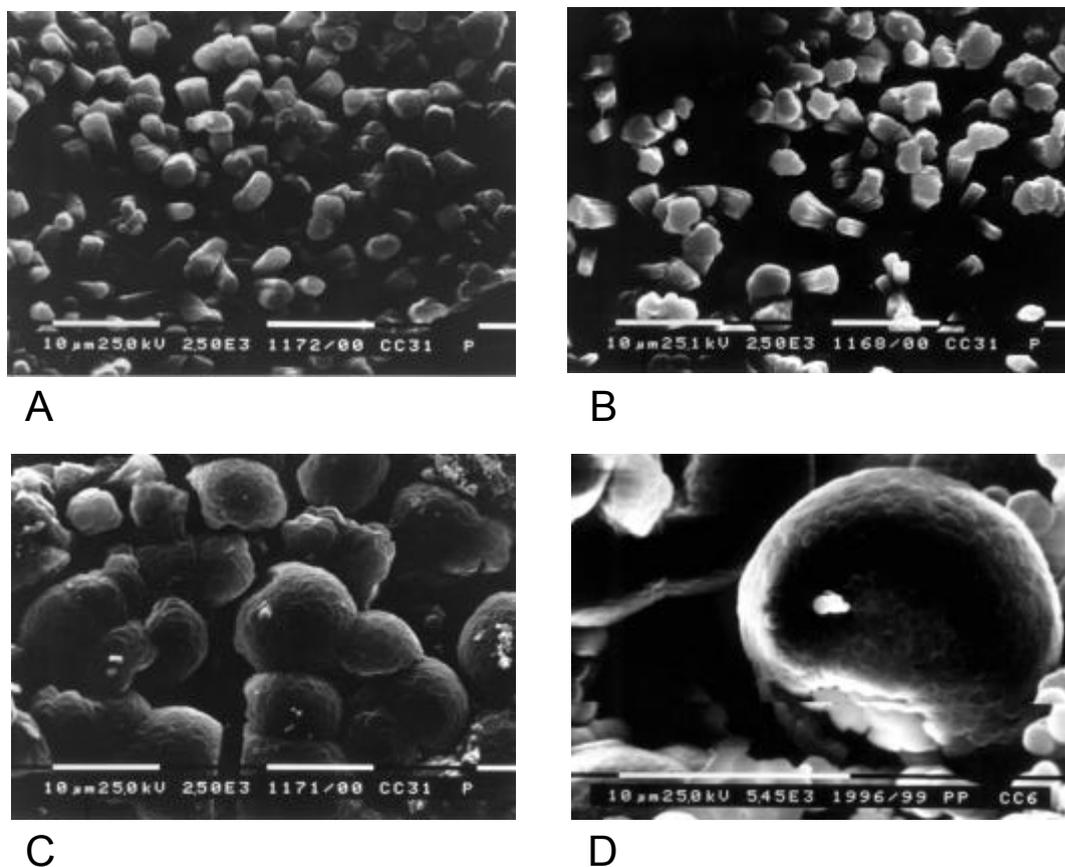


Abb. 9.24: Fluorapatit-Aggregate auf der Oberfläche der PO_4^{3-} -Seite nach 7 Tagen Interdiffusion bei pH 6. A, B: beginnende Hantelbildung (2500X), C: Kugelmuster bestehend aus hexagonalen Blättchen (2500X), D: ähnliches Kugelmuster nach nur 4 Tagen Interdiffusion bei pH 6

Ein weiteres, noch nicht bekanntes Motiv bei pH 6 zeigen die Abbildungen 9.24 C und D. Diese Morphologien erscheinen als breiter ausgefächerte Hantelaggregate, senkrecht zur Matrix gewachsen, die aber erkennbar aus wesentlich größeren Einzelkristallen ($1,5\text{-}2,4\ \mu\text{m}$) zusammengesetzt erscheinen. Bei einem Versuch mit kürzerer Laufzeit (4 Tage pH 6) wurden ebensolche Kugelaggregate mit ähnlichem Durchmesser ($10\text{-}14\ \mu\text{m}$), jedoch aus kleineren Einzelkristallen aufgebaut ($0,7\text{-}1,1\ \mu\text{m}$) gefunden (Abb. 9.24 D).

Das Wachstum bei alkalischem pH-Wert (pH 9, Abb. 9.25) führt zu sehr regelmäßigen Sphärolithen. Das Kugelwachstum führte zu größeren Kugeln im Inneren der Tablette. Kleine Kugeln sind in tieferen Regionen, große weiter oben zu finden. Die Durchmesser der Kugelaggregate sind mit bis zu $6,5\ \mu\text{m}$ die größten in der hier gezeigten Meßreihe.

Das Wachstum erfolgte hier derart regelmäßig, daß in der gleichen Region gleiche Kugelgrößen auftreten. Der hohe pH-Wert führte in diesem Fall dazu, daß zu jeder Zeit immer genügend volldissoziierte PO_4^{3-} -Ionen für die Fluorapatit-Bildung vorhanden war und sich somit weniger Defektstrukturen, beispielsweise durch Einbau von Hydrogenphosphat-Ionen, bilden konnten.

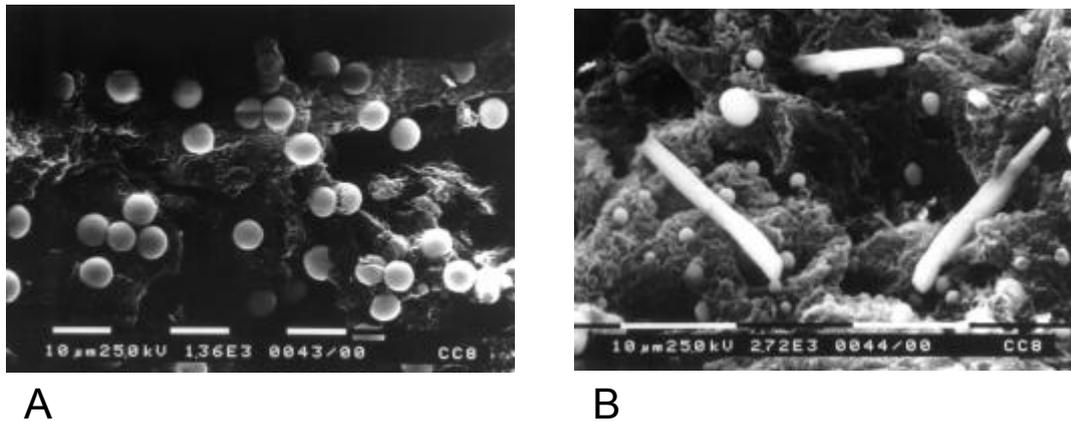


Abb. 9.24: Fluorapatit-Aggregate nach 7 Tagen Diffusion bei pH 9 innerhalb der Phosphat-Seite

Die Experimente bei pH 9 führten zu einer weiteren Schwierigkeit bei der Durchführung: Bei diesem hohen pH-Wert kann Calcium mit dem Kohlendioxid der Luft innerhalb einer Woche flockige Niederschläge von Calciumcarbonat (Calcit) bilden, die auch in den Interdiffusionsversuchen erkennbar waren:

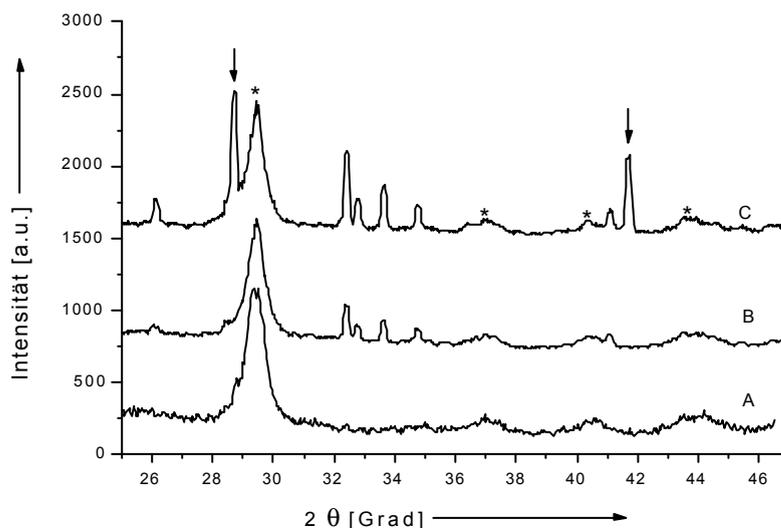


Abb. 9.26: HASYLAB-B2-Röntgenbeugungsmessungen der Diffusionsreihe in Abhängigkeit vom pH-Wert. A: pH 5, 7 Tage; B: pH 6; C: pH 9, 7 Tage. Mit Sternchen (*) bezeichnete Reflexe: Polyglycolid-Reflexe. Mit den Pfeilen sind CaCO_3 -Reflexe bezeichnet.

Abb 9.25 B zeigt neben den Kugelaggregaten weiße, flächige Kristalle einer Phase, die mittels EDX nicht als Calciumphosphat identifizierbar waren. Die Röntgenbeugungsmessungen (Abb 9.26) bestätigen die Beobachtungen des Rasterelektronenmikroskops. Bei niedrigeren pH-Werten ist die Kristallisation wesentlich schwächer ausgeprägt. Die Messung bei pH 5 zeigt zwar nur Polyglycolid, jedoch wurden im Rasterelektronenmikroskop Kristalle eindeutig identifiziert. Das Wachstum der basischen Calciumphosphate wird bei einem solch niedrigen pH-Wert inhibiert. Die Reflexe der noch kleinen und ungeordneten Apatitkristallite werden daher von den viel intensiveren des Polyglycolids überdeckt. Weiterhin erkennt man, daß mit höherem pH-Wert der kristalline Anteil des Apatits im Polymer zunimmt, erkennbar an den Intensitäten der Apatitreflexe gemessen an denen des Polymers (mit Sternchen bezeichnet). Mit zunehmender Intensität werden die Reflexe ebenfalls schmaler, was auf höhere Orientierung hinweist (Abb. 9.26 C). Die Calciumcarbonat-Fremdphase ist hier deutlich erkennbar (Pfeile im Diagramm).

9.7.3 Zusammenfassung

Niedrige pH-Werte fördern das Auflösen und hindern das Wachstum von Kristallen. Jedoch wird durch das saure Milieu auch die Regelmäßigkeit der Kristallaggregate gefördert. Nach 7 Tagen Fluorapatit-Interdiffusion in Polyglycolid bei Standardkonzentration in Abhängigkeit von verschiedenen pH-Werten treten also erwartungsgemäß bei höheren pH-Werten größere Kristallaggregate auf. Hantelbildung beginnt erst bei pH 6 auf der Oberfläche. Bei pH 6 sind außerdem Kugeln sichtbar, die aus hexagonalen Säulenaggregaten aufgebaut sind. Die größte Vielfalt an regelmäßigen Aggregaten findet sich beim physiologischen pH 7,4. Hier sind die Hantelaggregate am längsten und schon am stärksten ausgeprägt. Oberhalb pH 7,4 sind weder Hantelaggregate noch hexagonale Säulen beobachtbar. Vielmehr findet man die Kugelaggregate auf der Phosphat-Seite und innerhalb der Tablette in Richtung der Phosphat-Seite.

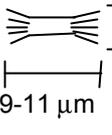
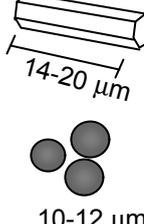
pH	5	6	7,4	9
Oberfläche Phosphat-Seite	 0,4-1 μm	 1-2,3 μm 4-5 μm 1,4-3 μm 1,5-2,5 μm 10-14 μm	 2-5 μm 9-11 μm	 4,5-6,5 μm
Innen Phosphat-Seite	 1-1,5 μm	---	 4-6 μm 14-20 μm 10-12 μm	 0,8-14 μm 1,5 μm 16 μm
Innen Calcium-Seite ¹	---	---	 5-6 μm	---

Tabelle 9.7: Zusammenfassung der beobachteten Morphologien bei 7 Tagen Fluorapatit-Interdiffusion in Abhängigkeit vom pH-Wert.

9.7.4 Einfluß der Konzentration auf die **CCDD**-Fluorapatit-Aggregate

Die Kristallisationsgeschwindigkeit wie auch die Diffusion wird von der Konzentration beeinflusst. Kristalle aus einem hoch übersättigten Medium sind meist klein und die Morphologie ist schlecht ausgeprägt.

Um den Einfluß der Konzentration auf die Morphologie und Kristallinität der Fluorapatit-Aggregate zu erfassen, wurde eine Serie von drei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt.

<i>Versuchs-Nummer(n)</i>	4	23	19-20
Standardkonzentration	1X	1,5X	2X
Ca ²⁺ -Vorlage [mM]	66,5	99,75	133
PO ₄ ³⁻ -Vorlage [mM]	40	60	80
F ⁻ -Vorlage [mM]	13,5	20,25	27
Ca ²⁺ -Zugabe [mM]	405	405	405
PO ₄ ³⁻ -Zugabe [mM]	243	243	243
F ⁻ -Zugabe [mM]	81	81	81
KOH Ca ²⁺ -Seite	0,005	0,05	0,05
KOH PO ₄ ³⁻ -Seite	0,01	0,1	0,1

Tabelle 9.8: Vorlage- und Zugabekonzentrationen der Konzentrationsreihe in der CCDD-Anlage

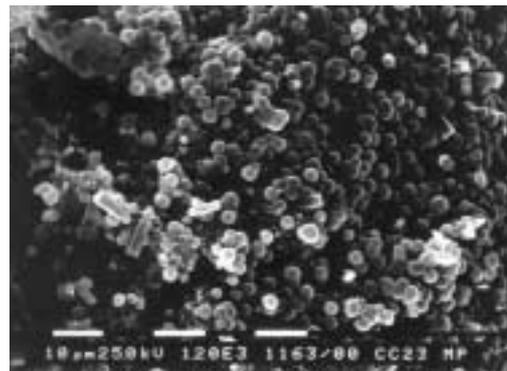
Die Versuche mit der Standard-Konzentration sind zuvor dokumentiert worden (Kapitel 9.7.1). Mit steigender Konzentration nimmt erwartungsgemäß die Größe der Kristallite zu. Innerhalb der Tablette in Richtung der Phosphat-Oberfläche finden sich bei der 1,5-fachen Standardkonzentration 6-8 µm lange hexagonale Stäbchen, die sehr regelmäßig ausgebildet sind. Wie in den *CCDD*-Versuchen mit der einfachen Standardkonzentration schon beobachtet, finden sich weiter innerhalb der Tablette in Richtung der Ca-Seite große Ansammlungen der Kugelaggregate, die einen Durchmesser von 1-4 µm aufweisen. Der Durchmesser unterscheidet sich kaum von den Durchmessern der Versuche mit der Standardkonzentration; vielmehr ist eine größere Häufung der Kugelaggregate zu erkennen.

Auf der Oberfläche der Tablette in Richtung der anionischen Phosphat-Seite zeigen sich große Felder von sehr regelmäßig ausgerichteten hexagonalen Stäbchen, die senkrecht auf die Matrix aufgewachsen sind. Die Stäbchen erscheinen wenig ausgefächert; vielmehr erfolgte das Wachstum in regelmäßigen Büscheln.

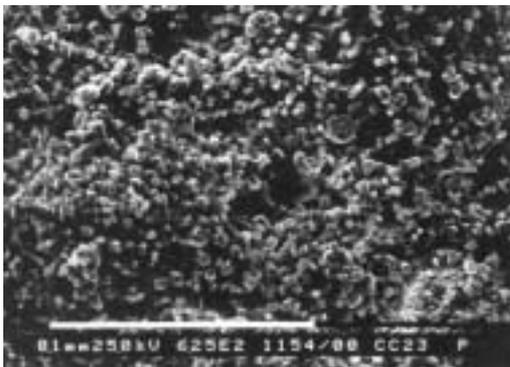
Einige kleinere Keimkristalle, wie rechts in Abb. 9.27 E erkennbar, zeigen wiederum, daß die hexagonalen Stäbchen zunächst einzeln wuchsen und in einer zweiten Phase weitere hexagonale Kristalle an den Seiten ausfächerten.



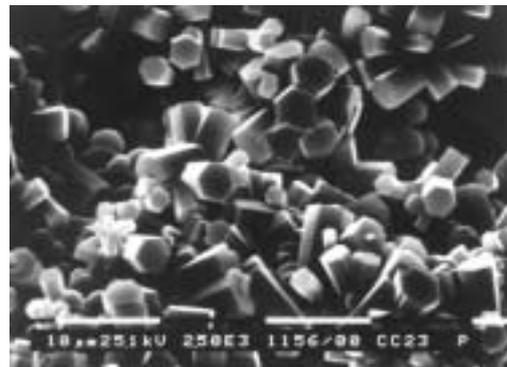
A



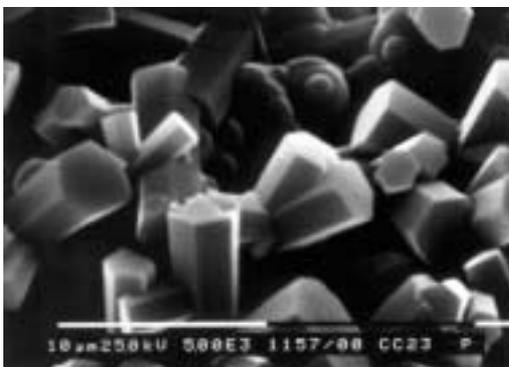
B



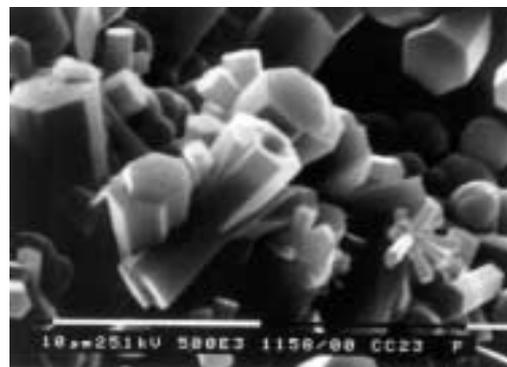
C



D



E



F

Abb. 9.27: REM-Bilder der CCDD-Versuche mit 1,5-facher Standardkonzentration. A: Kugelaggregate innerhalb der Tablette in Richtung PO_4^{3-} -Seite (Vergrößerung 2400X); B: Kugelaggregate und hexagonale Stäbchen in tieferen Regionen in Richtung der PO_4^{3-} -Seite (1200X); C, D, E, F: Kristallisation der hexagonalen Stäbchen auf der Phosphat-Oberfläche (625X, 2500X, 5000X, 5000X).

So können sich dann radial gewachsene Aggregate bilden. Ein Anzeichen für das Hantelwachstum findet sich hier nicht.

Bei den Versuchen mit zweifacher Standard-Konzentration konnte das Beginnen der Hantelbildung untersucht werden. Die Keimkristalle weisen auch hier ein Verhältnis von Länge zu Durchmesser von ca. 5:1 auf [Busch 98].

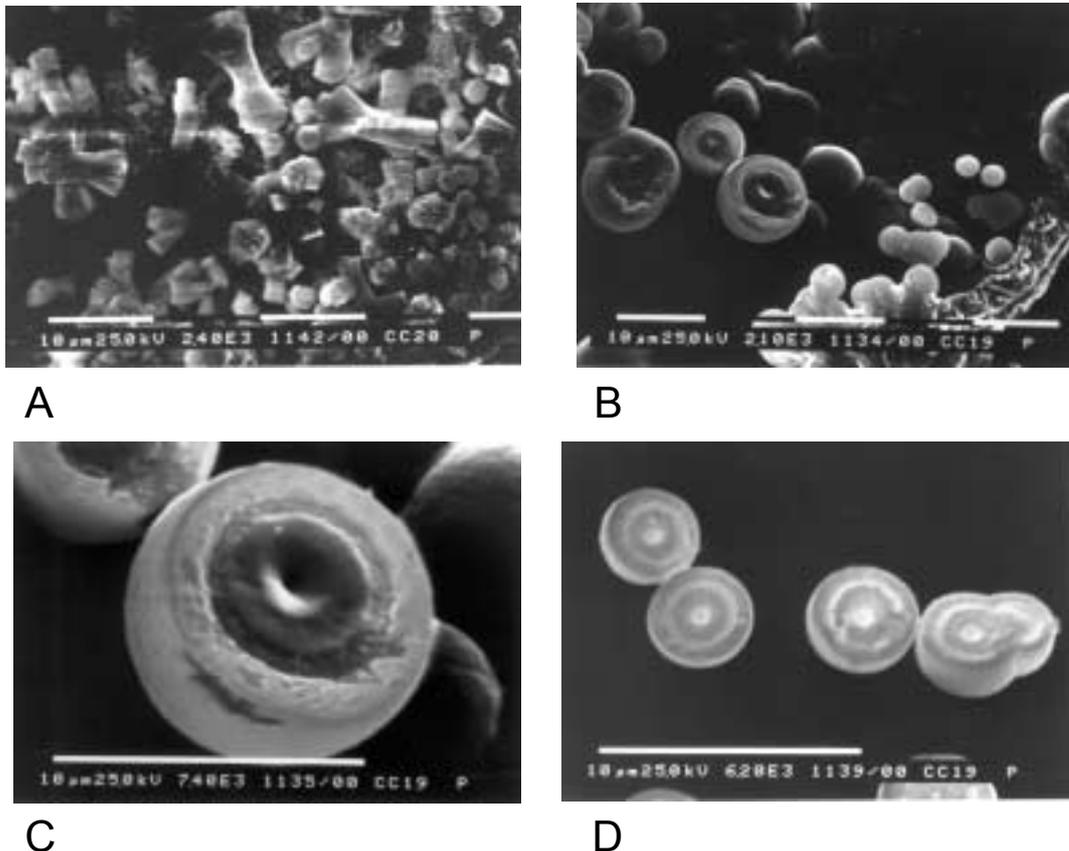


Abb. 9.28: Fluorapatit-Aggregate auf der Oberfläche der Phosphat-Seite des *CCDD*-Versuches mit 2-facher Standardkonzentration. A: Versuch nach 3 Tagen abgebrochen, hexagonale Kristalle mit begonnener Hantelbildung (2400X); B,C,D: Halbkugel- und Kugelaggregate nach 7 Tagen (2100X, 7400X, 6200X)

Auf der Oberfläche der Phosphat-Seite zeigen sich nach Diffusionsversuchen über 7 Tage keine Hanteln mehr. Vielmehr finden sich nun offene Kugeln mit einem tropfenförmigen Hohlraum, der weiterhin radialschalig umwachsen scheint. Die Dicke der radialen Schale beträgt 0,8-1,5 µm. Der innere Durchmesser der Kugeln ohne Radialschale 2,9-6,4 µm. Neben diesen radialschalig umwachsenen Halbkugeln finden sich aber auch wieder die deutlich kleineren Kugelaggregate (Abb. 9.28 B rechts). Da die Kristallisation zwar langsam erfolgt, sich jedoch die Aggregate außerhalb der Matrix auf der Phosphat-Oberfläche gebildet haben, ist davon

auszugehen, daß die Kristallisation hier wesentlich schneller erfolgt ist als innerhalb der Matrix.

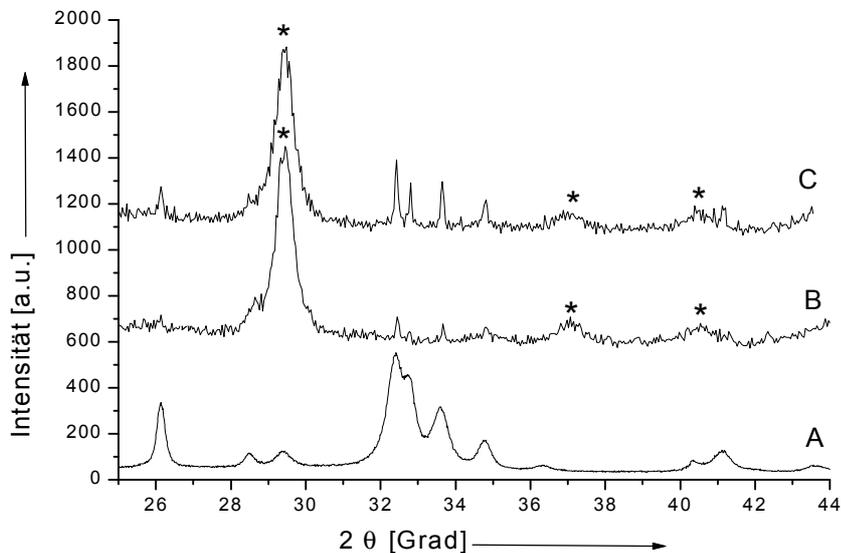


Abb. 9.29: HASYLAB-Röntgenbeugungsmessungen von HAP und zweier CCDD-Versuche. A: Hydroxylapatit MERCK; B: 2-fache Standardkonzentration 3 Tage Diffusion; C: 2-fache Standardkonzentration 7 Tage Diffusion. Mit Sternchen (*) bezeichnete Reflexe: Polyglycolid.

<i>Substanz/Versuch</i>	<i>Reflexposition</i>	<i>Halbwertsbreite</i>	<i>Kristallitgröße [Å]</i>
	<i>002-Reflex</i>		
HAP Merck	26,13	0,25	389
2X Standard, 3 Tage	26,10	0,26	378
2X Standard 7 Tage	26,13	0,10	970

Tabelle 9.9: Kristallitgrößen verschiedener Versuche berechnet aus dem 002-Reflex

Mittels Röntgenbeugung am HASYLAB (Strahl B2, Ge-Multidetektor) konnte das Ausmaß der Kristallisation und die Kristallitgröße bestimmt werden. Ein Vergleich der Kristallinität zwischen zwei Diffusionsversuchen mit 2-facher Standardkonzentration und unterschiedlichen Kristallisationszeiten (3 Tage und 7 Tage) und Hydroxylapatit von Merck als Referenzsubstanz zeigt (Abbildung 9.29), daß sich schon nach drei Tagen Diffusion diskrete Reflexe gebildet haben, die auf eine diskretere Orientierung der Kristallgitterebenen im Gegensatz zur HAP-Referenzsubstanz hinweisen (Abb. 9.29 B). Nach 7 Tagen Diffusion sind die Reflexe intensiver und schmäler, was auf eine höhere Kristallinität und auf einen höheren Anteil an Kristallisationsprodukt

hinweist. Der 002-Reflex der Röntgenbeugungsmessungen von Apatiten eignet sich durch seine diskrete Lage ($25,8^\circ 2\theta$) sehr gut, um aus der Halbwertsbreite mittels der Scherrer-Gleichung die durchschnittlichen Kristallitgrößen zu bestimmen [Blumenthal et al. 75]. Vergleicht man die Messungen der Kristallitgrößen, so erkennt man, daß anfänglich die durchschnittliche Ausdehnung ähnlich der des HAP von Merck ist, nach 7 Tagen sind die Kristallite auf mehr als das Doppelte der ursprünglichen Größe gewachsen.

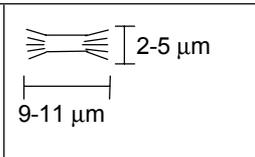
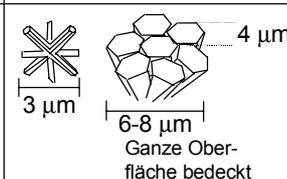
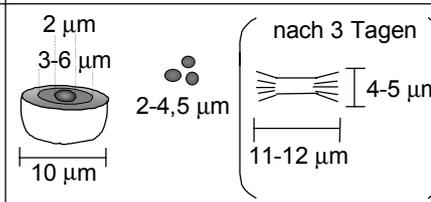
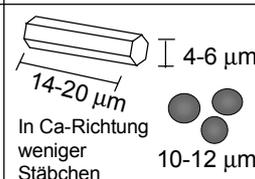
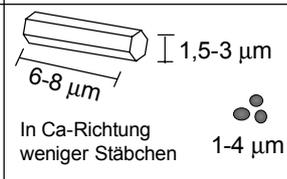
	Standardkonzentration	1,5X Standardkonzentration	2X Standardkonzentration
Oberfläche Phosphat-Seite			
Innen Phosphat-Seite			---
Innen Calcium-Seite ¹			---

Tabelle 9.10: Zusammenfassung der gefundenen FAP-Morphologien nach 7 Tagen Interdiffusion bei steigender Ionenkonzentration. ¹ "Innen Calcium-Seite" bedeutet: von der Phosphat-Seite aus gesehen Richtung Calcium-Seite, jedoch eher in der geometrischen Mitte der Polyglycolid-Tablette

9.7.5 Einfluß der Fluorid-Konzentration auf die **CCDD**-Fluorapatit-Aggregate

Um den Einfluß des Fluorids zu erfassen, wurde eine Diffusionsreihe angesetzt, bei der vier Diffusionsversuche mit verschiedenen Fluoridmengen in der Lösung auf der anionischen Seite vorgelegt wurden.

Gemäß der stöchiometrischen Formel für Fluorapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ sollte das ideale, stöchiometrische Ca/F-Verhältnis 5:1 ($\text{Ca}/\text{F}=5$) betragen. In dieser Meßreihe wurden Ca/F-Verhältnisse von 0 bis 15 eingesetzt. Tabelle 9.11 bezeichnet die einzelnen Versuche. Der prozentuale Fluorid-Anteil berechnet sich aus der stöchiometrischen Fluorapatit-Formel. Ist das Ca/F-Verhältnis gleich 5, so entspricht der Fluorid-Anteil auf anionischer Seite 100%.

Versuchs-Nummer(n)	12-14	15	18	4
F ⁻ -Anteil [%]	0	33	65	100
Ca/F	∞	15	7,5	5
F ⁻ -Vorlage [mM] ¹	0	4,4	8,8	13,5
Ca ²⁺ -Vorlage [mM]	66,5	66,5	66,5	66,5
PO ₄ ³⁻ -Vorlage [mM]	40	40	40	40
Ca ²⁺ -Zugabe [mM] ¹	405	405	405	405
PO ₄ ³⁻ -Zugabe [mM]	243	243	243	243
F ⁻ -Zugabe [mM]	0	27	54	81
KOH Ca ²⁺ -Seite	0,05	0,05	0,05	0,005
KOH PO ₄ ³⁻ -Seite	0,1	0,1	0,1	0,01

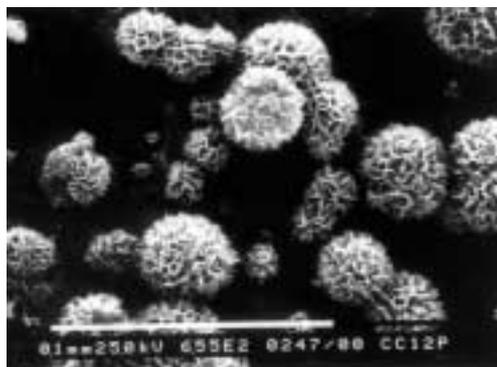
Tabelle 9.11: Konzentrationen im Kristallisationsgefäß und Zugabe-Konzentrationen der Fluorid-Versuchsreihe. ¹Vorlage: Konzentrationen der Ionen im Diffusionsgefäß, Zugabe: Ionenkonzentrationen in den Vorratsflaschen, die bei Bedarf in die Vorlage gepumpt wird.

Ohne Fluoridzugabe zeigt sich das typische Motiv der blättchenförmigen Hydroxylapatitkristalle. Diese sind auf der Oberfläche der anionischen Seite vereinzelt teils buschig, teils wabenförmig zu Kugeln (Durchmesser 13-33 µm) verwachsen (Abb. 9.30 B und C). Setzt man die Polyglycolid-Matrix längerer Kristallisation in der CCDD-Anlage aus, so aggregieren die zunächst vereinzelt auskristallisierten Kugeln zu weiten Flächen aus Apatitkristallen (Abb 9.30 A). Bei höherer Vergrößerung ist sichtbar, daß die einzelnen Kristallite eine löchrige, verwobene, teilweise eckig-poröse

Struktur aufweisen; es wird erkennbar, daß die apatitische Struktur die Form des porösen Polymers teilweise übernommen hat.



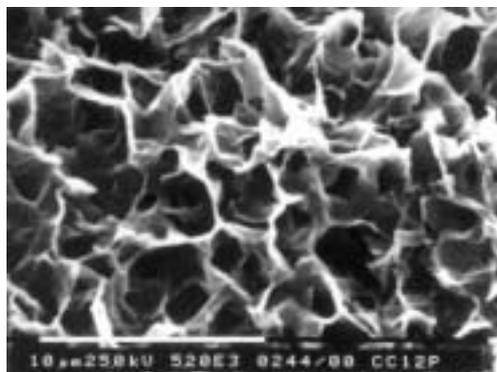
A



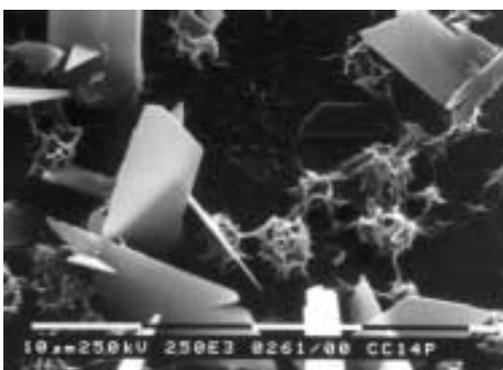
B



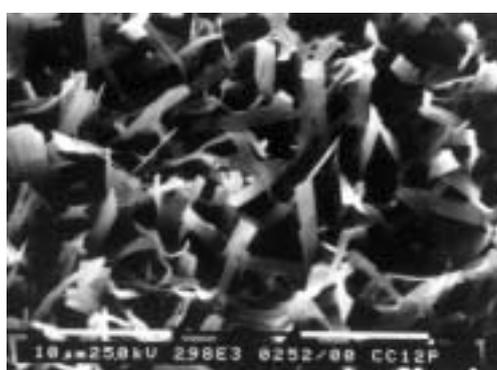
C



D



E



F

Abb. 9.30: Hydroxylapatit-Kristallisation in der CCDD-Anlage ohne Fluoridzugabe. Oberfläche der Phosphat-Seite (A: 1420X, B: 655X C: 356X, D: 5200X, E: 2500X, F: 2980X).

In Bereichen, wo die Kristallisation langsamer verlief (Abb 9.30 E) sind neben blättchenförmig elongierten Apatitkristallen, die meist senkrecht aus der Matrix herauswachsen, frühe Stadien dieser verwobenen Wachstumsform zu sehen. Es erscheinen zunächst einzelne Aggregate, die entlang der Poren der Matrix zusammenge-

wachsen sind. So wird die poröse Form der Polyglycolid-Matrix, ähnlich wie beim Calcit-Wachstum, vom Kristallinat übernommen.

In Randbereichen, wo im Diffusionsgefäß verbliebene Luftblasen auf der Matrix anhafteten, erfolgte ein gebremstes, elongiertes Wachstum von dünnen, schmalen und länglichen Apatitkristallen senkrecht zur Matrix (Abb. 9.30 F).

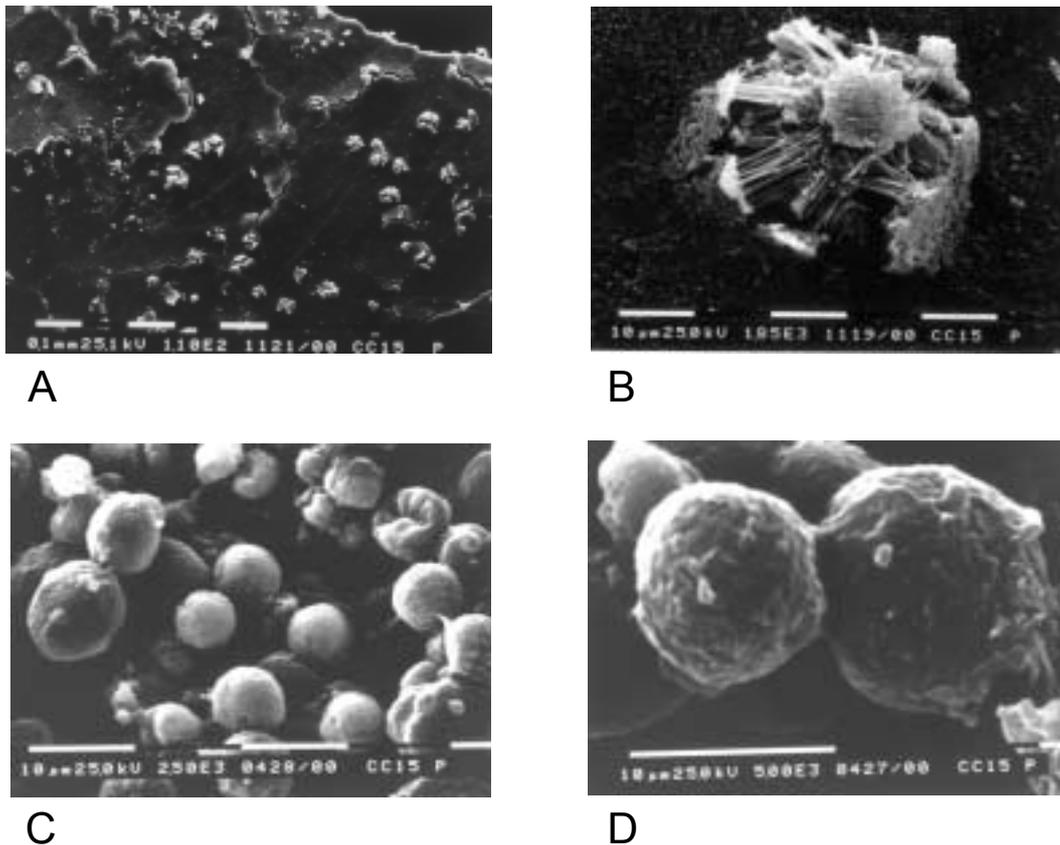


Abb. 9.31: Morphologie der apatitischen CCDD-Kristallisation auf der Phosphat-Seite nach geringer Fluorid-Zugabe ($\text{Ca}/\text{F}=15$, F^- -Anteil 33%). A: Oberfläche Phosphat-Seite, es sind Kristallaggregate durch die Oberfläche gebrochen (Vergrößerung 110X). B: Einzelnes Aggregat von A (1850X), C und D: Kugelförmige Kristallisationsmuster auf der Oberfläche der Phosphat-Seite (2500X, 5000X).

Bei geringer Fluoridzugabe ändert sich die Morphologie abrupt: Die Kugeln auf der Oberfläche der anionischen Seite erscheinen nun glatt und sind nicht mehr aus einzelnen Apatitkristalliten aufgebaut. Es erfolgte ein Wachstum von feineren Kristallen, die sich zu diesen Kugeln vereinigten, jedoch sind diese Kristallite wesentlich größer und grober geformt, als diejenigen, die bei „normaler“ Fluoridzugabe (F^- -Anteil 100%) entstehen. Diese feineren Kristallite sind in Abb. 9.31 A und B erkennbar: Durch die Oberfläche der Phosphat-Seite brechen Aggregate von fein verwobenen, sehr dünnen Apatitkristallen heraus. Die Vorläufer dieses groberen Kugelwachstums sind klar erkennbar. Es konnten keine Anzeichen für eine Hantelbildung nach Erreichen einer

kritischen Keimgröße gefunden werden, vielmehr zeigten sich Aggregate, die darauf hinweisen, daß eine Kugelbildung sogleich erfolgt (siehe Abb. 9.33 A). Sehr vereinzelt sind außerdem erste glatte FAP-Kugeln erkennbar. Die Kugeln in Abb. 9.31 C und D erinnern an jene Kugelaggregate, die nach Diffusionsversuchen bei pH 6 gefunden wurden und aus hexagonalen Platten aufgebaut zu sein scheinen (Abb. 9.24 D). Diese Aggregate können aber auch eine Zwischenform von den aus einzelnen Kristallitblättchen bestehenden, kugelförmigen HAP-Kristallen hin zu FAP-Sphärolithen mit glatter Oberfläche darstellen.

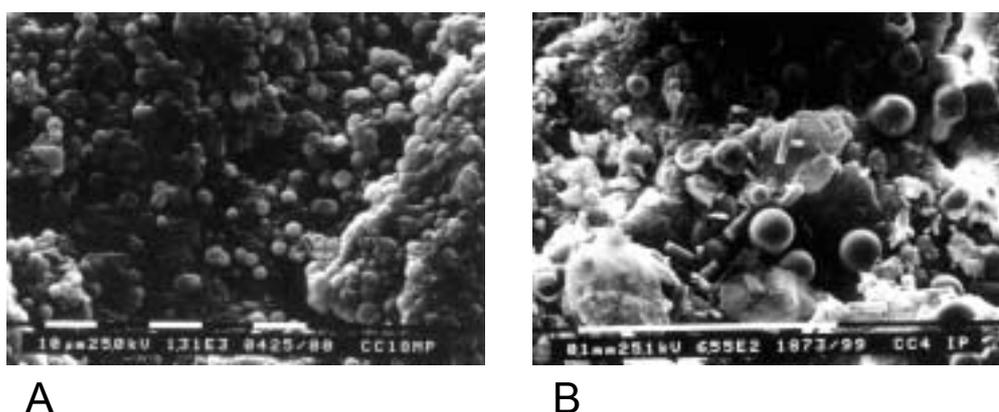


Abb. 9.32: Morphologie der apatitischen Kristallisation innerhalb des Pellets bei $\text{Ca}/\text{F}=7,5$ (A, F-Anteil=65%, 1310X) und bei $\text{Ca}/\text{F}=5$ (B, F-Anteil=100%, 655X).

Bei doppelter Fluoridzugabe ($\text{Ca}/\text{P}=7,5$, F-Anteil=65%) zeigt sich das glatte, regelmäßige FAP-Kugelmotiv im Inneren und auf der Oberfläche der Phosphat-Seite der Tablette. Die Kugeln sind mit 1-5 μm kleiner als die Kugeln der Versuche mit $\text{Ca}/\text{F}=5$ (F-Anteil=100%, Kugelgröße 10-12 μm). Außerdem ist sichtbar, daß in ähnlicher Tiefe viele verschiedene Kugeldurchmesser auftreten. Dies weist darauf hin, daß während der Kristallisation lokale und zeitliche Konzentrationsunterschiede herrschten. Bei Betrachtung der morphologischen Unterschiede stellt sich heraus, daß zwischen den glatten FAP-Kugeln, den hier beobachteten größeren Kugelaggregaten (Abb. 9.31 C und D) und den Sphärolithen, die sich aus dem Hantelwachstum bilden, unterschieden werden muß.

Die glatten Fluorapatitkugeln, die gehäuft in den Versuchen mit 100% Fluorid-Gehalt ($\text{Ca}/\text{F}=5$) auftreten haben einen anderen Ursprung: aus sehr kleinen verzweigten Keimkristallen (Abb 9.33 A) erfolgt bei höherer Fluorid-Zugabe (B) die Bildung glatter Kugeln, welche bei Zugabe eines stöchiometrischen Fluorid-Verhältnisses größer und regelmäßiger wachsen (C).

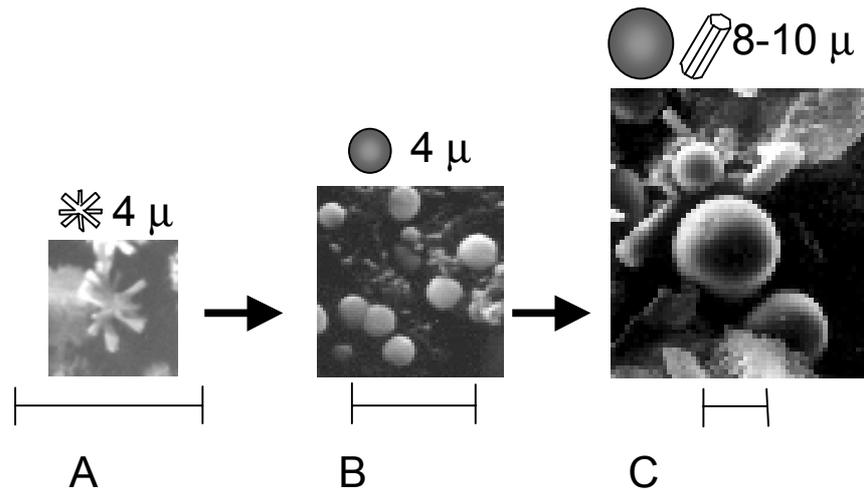


Abb. 9.33 Möglicher Mechanismus der FAP- Kugelbildung mit steigender Fluoridzugabe. A: Ca/F=15 (F'-Anteil=33%), B: Ca/F=7,5 (F'-Anteil=65%), C: Ca/F=5 (F'-Anteil=100%). Länge eines Meßbalkens: 10 µm.

Während bei den Versuchen mit stöchiometrischen Vorlagen, sowohl in bezug auf reines HAP (Fluorid-Anteil 0%) als auch in bezug auf reinen Fluorapatit (Fluorid-Anteil 100%), nur wenige bis keine fragmentarisch vorkommenden Kristallformen gefunden wurden, traten bei den "gemischten" Vorlagen sehr viele verschiedene Morphologien auf.

Aufgrund dieser Tatsache sowie der Regelmäßigkeit der, hexagonalen wie auch sphärolithischen, Kristalle der Versuche, in denen stöchiometrisch Fluorid eingesetzt wurde, ist davon auszugehen, daß ein gemischter Fluoro-hydroxylapatit eher zu Defektbildungen im Kristallgitter und damit zu vielen verschiedenen Kristallformen führt, als ein stöchiometrisch reiner Fluorapatit.

9.7.6 Zusammenfassung

Mit steigender Fluorid-Zugabe erfolgt ein regelmäßigeres, kontrollierteres Wachstum. Ausgehend von den Hydroxylapatitkristallen bei 0% Fluorid-Gehalt, die verwoben entlang der Poren auf der Phosphat-Oberfläche aufwachsen, ändert sich die Morphologie bei geringer Fluorid-Zugabe abrupt. Auf der Oberfläche erfolgt ein sehr ziselirtes Wachstum von fein verwobenen Säulen, die durch die Oberfläche durchbrechen. Weiterhin sind grobe Kugelaggregate zu erkennen, die, aufgrund ihrer Größe und Unregelmäßigkeit, einen anderen Ursprung haben wie die glatten FAP-

Kugelaggregate, die bei 100% Fluorid-Gehalt auftreten. Diese können eine Zwischenform zwischen den porös-verwobenen HAP-Aggregaten (Abb. 9.30 B) und den FAP-Sphärolithen (z.B. 9.32 B, 9.33 C) darstellen. Auch hier ist innerhalb der Tablette keine Kristallisation sichtbar. Ähnliche, jedoch größere Kugelaggregate sind bei $\text{Ca}/\text{F}=7,5$ sichtbar. Erste regelmäßige FAP-Kugelaggregate sind innerhalb der Tablette sichtbar.

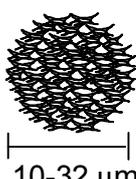
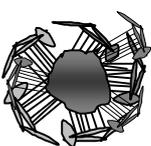
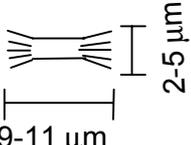
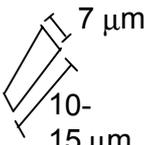
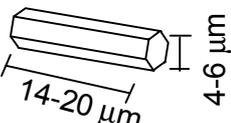
% Fluorid	0	33	65	100
Ca/F	∞	15	7,5	5
Oberfläche Phosphat-Seite	<p>Grundmuster  3-4 μm</p>  10-32 μm	 35 μm	 7,5-14 μm unregelmäßig	 2-5 μm 9-11 μm
Innen Phosphat-Seite	 7 μm 10-15 μm	 5-6 μm unregelmäßig	 1-5 μm regelmäßig	 4-6 μm 14-20 μm

Tabelle 9.12: Zusammenfassung der Morphologien bei Interdiffusion von Apatit bei pH 7,4 in einem Zeitraum von 7 Tagen bei unterschiedlichem Fluorid-Gehalt.

Diese Kugelaggregate zeigen sich dann größer und regelmäßiger neben hexagonalen Stäbchen ungefähr doppelt so groß und in regelmäßigerem Durchmesser innerhalb der Tablette bei einem Fluorid-Gehalt von 100%. Hexagonale Stäbchen und beginnende Hantelbildung erfolgt erst bei $\text{Ca}/\text{F}=5$ (100% Fluorid-Gehalt).

9.8 Simulation pathologischer Mineralisationsvorgänge mit der CCDD-Anlage

Um pathologische Mineralisationsvorgänge zu simulieren und zu erfassen, wurden Kristallisationsversuche durchgeführt, die den bei der Arteriosklerose auftretenden Vorgängen ähneln. Gleichzeitig sollte gezeigt werden, wie wirksam Inhibitionseffekte bekannter Kristallisationsinhibitoren *in vitro* simuliert werden können.

Da der Arterienverkalkung die Ablagerung von Cholesterin vorausgeht (vgl. Kapitel 7.1), wurden Kristallisationsversuche in Gegenwart von Cholesterin unternommen. Außerdem wurde in einer weiteren Versuchsreihe die inhibierende Wirkung von Magnesium auf die Kristallisation von Hydroxylapatit untersucht. Als Diffusionsmatrix wurde poröses Polyglycolid eingesetzt. Als Vergleich für eine HAP-Kristallisation ohne Einfluß diverser Inhibitoren oder Promotoren sollen die Versuche 12-14 (Kapitel 9.7.5) dienen. Die Standardkonzentrationen wurden beibehalten [Peters & Epple 01].

9.8.1 Einfluß von Cholesterin auf die CCDD-HAP-Kristallisation

Da der Arteriosklerose Ablagerungen von Cholesterin auf den Wänden der Blutgefäße vorausgehen, wurde eine Versuchsreihe unter dem Einfluß einer gesättigten Cholesterin-Lösung durchgeführt. Dazu wurden in beide Diffusionsgefäße je 100 mg Cholesterin gegeben und Diffusionsversuche unter Standardbedingungen durchgeführt. Hierbei traten neben den bekannten verwobenen blättchenförmigen Apatitkristallen, die auf der Tablettenoberfläche der Phosphat-Seite aufwuchsen, auch andere Morphologien auf.

Im Gegensatz zu den HAP-Interdiffusionsversuchen ohne Einfluß eines Zusatzstoffes, wo kugelförmige Aggregate von 10-32 µm Durchmesser aus blättchenförmigen Apatitkristallen direkt auf der Tablettenoberfläche gefunden wurden, fand hier eine eher regelmäßige Kristallisation von flachen Apatitkristallen auf der Oberfläche statt. Auf diesen HAP-Kristalliten die direkt auf der Tablettenoberfläche aufwuchsen sind weitere, 3-7 µm große, regelmäßig geformte, kugelförmige Aggregate zu erkennen. Diese konnten mittels EDX als Calciumphosphat identifiziert werden.

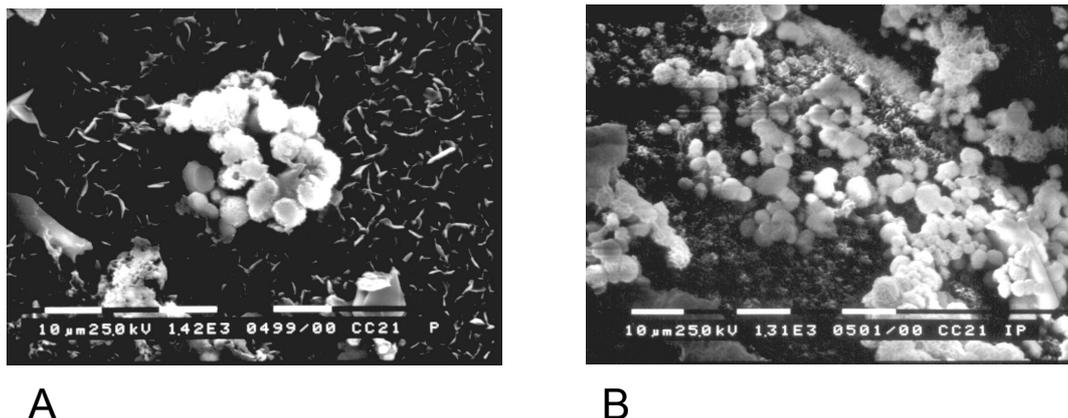


Abb. 9.34: HAP-Kristalle auf der PGA-Oberfläche unter dem Einfluß von Cholesterin (Vergrößerung A: 1420X, B: 1310X).

Durch gründliches Waschen der Tabletten mit Wasser und Ethanol nach den 7-tägigen Kristallisationsversuchen können Cholesterinkristalle ausgeschlossen werden. Vielmehr sind auch hier blättchenförmige Kristallite auf den Kugeloberflächen zu erkennen (Abb. 9.34 B rechts oben). Diese ähneln den kugelförmigen Aggregaten, die in Calciumphosphat-Ablagerungen in der Aorta („*atherosclerotic lesions*“) gefunden wurden [Tomazič 94]. Der Einfluß des Cholesterins führt also zu solchen sphärolithischen Aggregaten.

9.8.2 Einfluß von Magnesium auf die HAP-Kristallisation

Magnesium ist als wirksamer Kristallisationsinhibitor bekannt [Zawacki et al. 86]. Der Einfluß dieses Ions kann bei der Kristallisation von Calciumphosphaten zur Bildung von Mg^{2+} -haltigem TCP führen [Salimi et al. 85]. Es ist weiterhin auch ein wichtiger Bestandteil biologischer Regelkreise und im menschlichen Blutplasma enthalten [Kaim & Schwederski 91]. Daher ist es von Interesse, den Einfluß von Magnesium auf die Kristallisation von HAP in einer PGA-Matrix zu untersuchen. Dazu wurde in einer ersten Versuchsreihe ein Ca/Mg-Verhältnis von 1:1 gewählt, d.h. in der Calcium-Lösung wurden zusätzlich 66.5 mM $MgCl_2$ gelöst.

In Abb. 9.35 erkennbar, erfolgt unter dem Einfluß von Magnesium eine wesentlich gebremstere Kristallisation. Auch anhand der Calcium- wie auch der KOH-Zugabe war erkennbar, daß die Kristallisationsgeschwindigkeit gehemmt war. Die Aggregate, die mittels Röntgenbeugung als Apatit identifiziert werden konnten, kristallisierten wesentlich vereinzelter auf der Phosphat-Seite der PGA-Oberfläche aus.

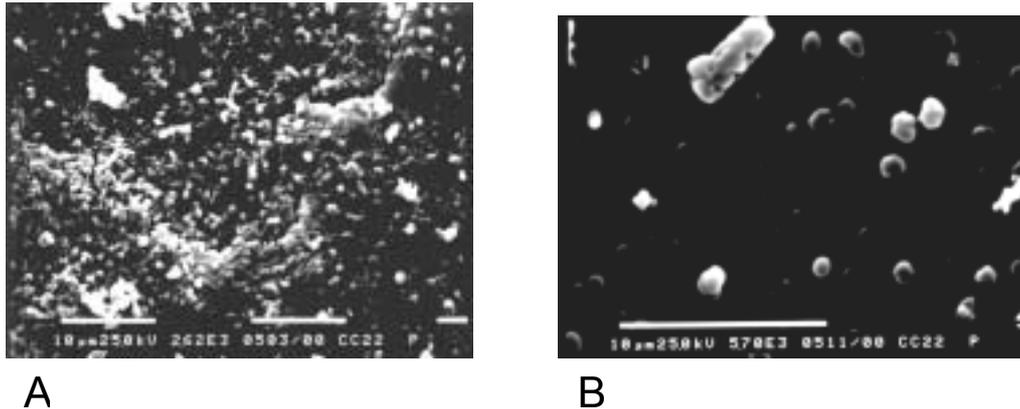


Abb. 9.35: REM-Aufnahmen von Mineralisationsaggregaten eines apatitischen Produkts, unter dem Einfluß von Magnesium in der CCDD-Anlage auf einer PGA-Matrix kristallisiert. A: Übersichtsaufnahme (Vergrößerung 2620X); B: Nahaufnahme der sphärolithischen Kristalle (5700X).

Im Gegensatz zu den vorhergegangenen Versuchen ist auf der PO_4 -Seite der PGA-Tablette die poröse Polymeroberfläche noch gut erkennbar. Die kugelförmigen Kristalle weisen einen Durchmesser von 0.5-1 μm auf. Sie sind von glattem, teilweise langgezogenen Aussehen. Vereinzelt konnten die halbrunden, elongierten Kristallite als Agglomerationen von kleineren kugelförmigen Partikeln erkannt werden (Abb. 9.35 B links oben). Auch hier ist keine bevorzugte Kristallisation aus den Poren heraus erkennbar. Eine Inhibition sowohl im Sinne der Beeinflussung der Heterogenkeimbildung und der Sekundärkeimbildung als auch der Beeinflussung des Kristallwachstums durch Adsorption des Magnesiums auf spezifische Kristallflächen kann bestätigt werden.

9.8.3. Zusammenfassung

In diesen Versuchsreihen konnte gezeigt werden, daß der Einsatz der CCDD-Anlage zur Untersuchung von Keimbildungseffekten im Sinne der pathologischen Kristallisation ebenso geeignet ist wie für die Simulation anderer Biomineralisationsvorgänge. Beide Substanzen, die eingesetzt wurden, zeigten einen deutlichen Effekt auf die Kristallbildung, wobei Magnesium einen starken Inhibitionseffekt aufwies, während Cholesterin eher einen Einfluß auf die Kristallmorphologie ausübte. Es ist vorstellbar, die poröse PGA-Matrix durch biologische Matrices zu ersetzen, um pathologische Kristallisationsvorgänge *in vitro* direkt auf dem betroffenen Gewebe zu simulieren.

Ebenfalls ist es denkbar, die Kristallisation auf Implantaten auf diesem Weg zu simulieren. Als weiterer Schritt soll in Zukunft mit Ionenkonzentrationen ähnlich denen der Körperflüssigkeit (SBF=*simulated body fluid*) gearbeitet werden. Organische Additive, wie beispielsweise humanes Serumalbumin (HSA), die schon mittels einer konventionellen CC-Anlage (Vgl. Kapitel 8 und Abb. 8.1) untersucht wurden [Gilman & Hukins 94], sind ebenfalls Substanzen von Interesse, deren Einflüsse mit dieser Technik eingehender untersucht werden können.

10. Herstellung und Optimierung eines Knochenersatzmaterials

10.1 Die Konzeption des Kompositmaterials

Wie schon in Kapitel 6 erwähnt, zeigt die Tatsache, daß der größte Teil der Eingriffe zum Knochenersatz bis zum heutigen Tag mit körpereigenem Knochengewebe durchgeführt wird, deutlich den Handlungsbedarf zur Entwicklung eines synthetischen, unbegrenzt verfügbaren und voll integrierbaren Materials.

Der mögliche Ersatz eines artifiziellen Materials durch Knochengewebe in einem dynamischen Umbauprozess (*remodeling*) spricht für den Einsatz eines degradierbaren Materials. Das Auflösen des Implantates ginge dann idealerweise mit der angeregten Knochenneubildung einher.

Um dieses Ziel zu erreichen wurden von vielen Forschergruppen Konzepte entwickelt, die auf Calciumphosphat-Keramiken, polymeren Materialien oder Kompositen basieren.

Im Falle der Calciumphosphat-Keramiken mangelt es an der vollständigen Resorption, da Osteoklasten und Osteoblasten das Material nicht durchdringen oder es aufgrund der unterschiedlichen Natur der Mineralphase gegenüber der des Knochens (siehe Kapitel 6.3) nicht genügend schnell „umbauen“ können. Dies hat eine permanente Inhomogenität des Gewebes mit potentiellen Sollbruchstellen zur Folge. Im Falle degradierbarer Polymere kommt es zwar zur Resorption, jedoch wird der entstandene Raum in den meisten Fällen nicht durch Knochen ersetzt. Zudem geht die Degradation der Polymere oft mit einer starken Übersäuerung des Gewebes einher und führt so zur Schädigung (Acidose).

Die Hoffnung vieler Kliniker stützt sich daher auf die Entwicklung von Kompositmaterialien, die, ähnlich wie das System Kollagen/Calciumphosphat, im Knochen als potentielles Implantat fungieren können. Für Hydroxylapatit als Biomaterial, auch im Komposit mit Polymeren werden Vorteile wie die Vermeidung von Immunreaktionen und das Gleichbleiben des Volumens genannt, was postoperative Schäden ausschließt. Jedoch zeigen die postoperativen Befunde auch Jahre nach dem Einsatz des Materials das unveränderte Vorliegen der HAP-Partikel [Oonishi 91], [Linhart et al. 00].

10.1.1 Abbaubare Polymere

Um degradierbar zu sein, müssen Biomaterialien unter physiologischen Bedingungen spaltbare Bindungen enthalten. Die Spaltung kann hydrolytisch oder enzymatisch erfolgen. Der hydrolytische Abbau hat dabei zum Vorteil, daß die Abbaugeschwindigkeit unabhängig vom Ort der Implantation ist, der lokale pH-Wert wird durch diesen Abbauvorgang sinken, was eine autokatalytische Beschleunigung des Abbauprozesses zur Folge hat. Im Gegensatz dazu ist die Konzentration an Enzymen lokal sehr unterschiedlich.

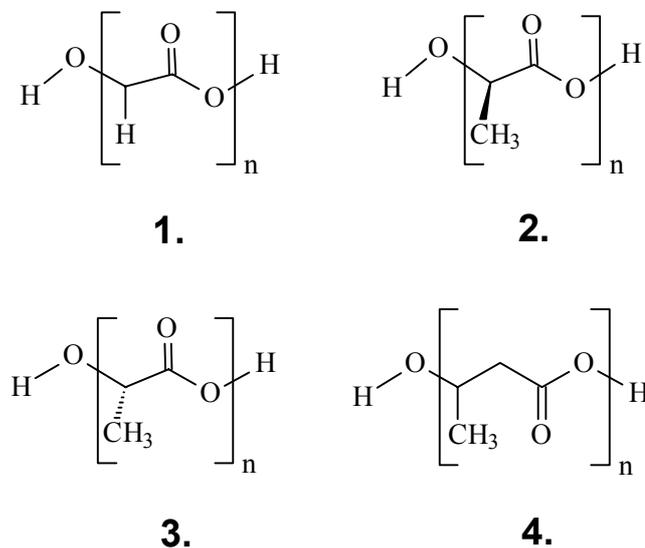


Abb. 10.1: Strukturformeln verschiedener biologisch abbaubarer Polyester: 1. Polyglycolid; 2. Poly(D-lactid); 3. Poly(L-lactid); 4. Poly-3-hydroxybutyrat (allgemeine Struktur).

Eine wichtige Gruppe von resorbierbaren Polymeren sind Polyhydroxycarbonsäuren, die zu verschiedenen Zwecken eingesetzt werden [Gerngroß & Becker 94]: Polyglycolid wird seit 1970 als chirurgisches Nahtmaterial eingesetzt, da seine Festigkeit 7-11 Tage anhält. Dieses ist für die Wundheilung ein geeigneter Zeitraum. Weiterhin werden auch Copolymere aus 92 mol-% Glycolideinheiten und 8 mol-% L-Lactideinheiten für diese Zwecke verwendet. Im Bereich der minimalinvasiven Chirurgie werden aufgrund ihrer einfachen Handhabung mit dem Endoskop resorbierbare Klemmen (*clips*) und Heftklammern (*staples*) aus diesem Copolymer eingesetzt. Auch im Rahmen der *kontrollierten Freisetzung von Arzneistoffen* (*controlled drug release*) finden diese abbaubaren Polyester Verwendung. Nicht zuletzt wird das Gebiet des *Tissue Engineering* immer wichtiger. Das Ziel dieser

Technologie besteht darin, neues, funktionelles, lebendes Gewebe zu erzeugen, das Patienten im Sinne der rekonstruktiven Medizin transplantiert werden kann. Dieses neue Gewebe wird dabei durch die Besiedelung einer polymeren Matrix oder eines porösen Gerüsts (*scaffold*) mit lebenden Zellen hergestellt. Stammen die verwendeten Zellen vom Patienten selbst, so können Fremdkörperreaktionen bei der Transplantation des künstlichen Gewebes vermieden werden. Das polymere Gerüst bestimmt dabei die dreidimensionale Form des Gewebes und soll abgebaut werden, während die Zellen einwachsen. Dabei werden ebenfalls Matrices aus Polyglycolid (PGA) und Polylactid (PLA) eingesetzt [Dee & Bizios 96], [Laurencin et al. 96]. Diese Polyhydroxycarbonsäuren werden im allgemeinen mittels Ringöffnungspolymerisation von Lactonen oder cyclischen Diestern synthetisiert [Lendlein 99]. Eine weitere Herstellungsweise dieser Polyester (hauptsächlich PHB) erfolgt bakteriell in Bioreaktoren [Heyde 97].

Weiterhin wurde in Kapitel 6.1 auch die Porosität des Implantatmaterials angesprochen. Nicht nur für den Knochenersatz, sondern auch für die Anforderungen des *Tissue engineering* sind hochporöse, biokompatible und biodegradable Polymere mit einer hohen Oberfläche, um eine möglichst große Anzahl von Zellen unterzubringen und versorgen zu können. Oftmals sind das Überleben und die *Proliferation* (Vermehrung) von Zellen begrenzt durch die Diffusion von Nährstoffen, die durch kleine Poren vonstatten gehen kann [Mikos et al. 93].

10.2 Kompositmaterialien aus Polyglycolid und Calciumphosphat

Wie in Kapitel 8.3 erwähnt, können das Polyglycolid und auch andere Polyester durch Festkörperreaktion in der Hitze aus den Halogensalzen der Carbonsäuren (hauptsächlich aus Natriumchloracetat) gewonnen werden [Epple & Herzberg 98], [Epple & Kirschnick 97]. Als Nebenprodukt bleibt dabei Alkalihalogenid (Natriumchlorid) übrig, welches als *Porogen* fungiert. Größere Poren werden durch Beimischen von weiterem Kochsalz vor dem Verpressen zu einem Pellett erzeugt (siehe Abbildung 10.2). Versuche mit wasserlöslichen Fäden bzw. Zuckerfäden, um eine echte interkonnektierende große Porosität zu erzeugen, sind angedacht. Außerdem sollen durch gezielte Beimischung eines *Porogens* Polyglycolid-Werkstücke mit Gradienten in der Porosität erzeugt werden [Schwarz & Epple 98-2].

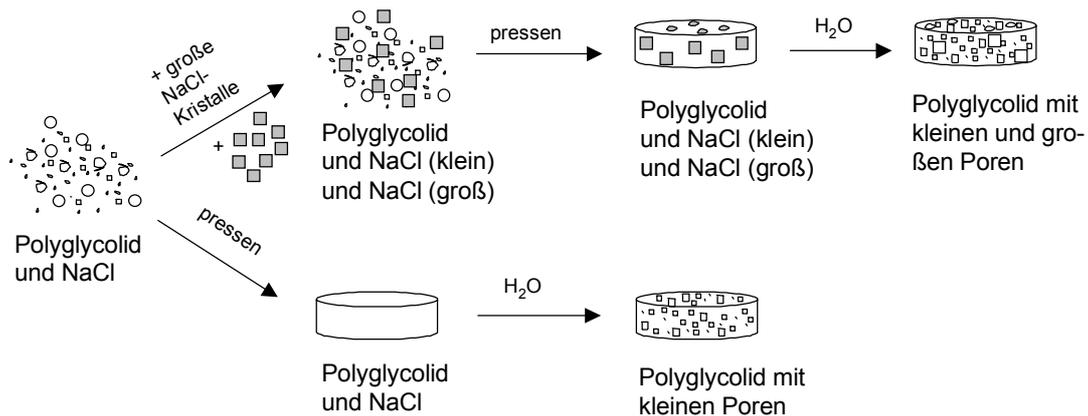


Abb. 10.2: Erzeugen von großen Poren im Polyglycolid aus Festkörperreaktion.

Die Degradation der Polyester setzt saure Abbauprodukte frei, die in der Umgebung des Polymers zelltoxisch wirken können. Um dem entgegenzuwirken, wurden diverse Versuche unternommen, um die Degradationsprodukte Material durch Beimischung von Calciumphosphaten abzupuffern. Als weiterer Effekt sollte die Calciumphosphat-Beimischung als bioresorbierbares Calcium-Depot fungieren. Im Idealfall soll dann im gleichen Zeitraum, wie das Implantat degradiert, neuer Knochen gebildet werden.

10.2.1 Einstellung des pH-Wertes des Komposits

Die Verläufe der pH-Werte gegen die Zeit geben Aufschluß über die Degradationskinetik der Polyester. Abbildung 6.12 gibt einen kleinen Einblick in die Verschiedenartigkeit der pH-Wert-Verläufe der Calciumphosphate. Das Polyglycolid und jedes Gemisch wurde daher intensiven pH-Tests bei 37°C in deionisiertem Wasser unterzogen.

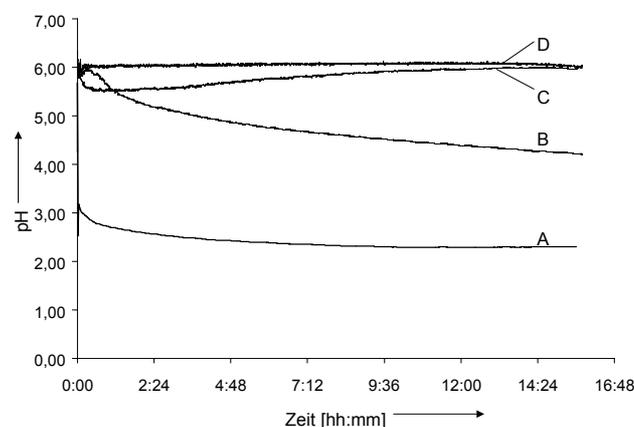


Abb. 10.3: pH-Verläufe über 15 Stunden in Wasser bei 37°C von A: PGA der Firma Aldrich; B: PGA aus Festkörperreaktion; C: PDLLA; D: P-3HB

Abbildung 10.3 verdeutlicht, daß Polyglycolid bereits nach wenigen Stunden, abhängig von der Herstellungsweise, saure Degradationsprodukte freigibt. Das Diagramm zeigt auch, daß die höheren Homologen der Polyester eine wesentlich langsamere Degradationskinetik aufweisen. Damit muß jedes Polyestersystem wiederum für sich behandelt werden, um das optimale Calciumphosphat bzw. das optimale Mischungsverhältnis zu ermitteln. Zunächst wurden dabei die Tabletten ausgewaschen, um das poröse Polymer zu erhalten, danach erst wurden pH-Verläufe aufgenommen. Nach einigen Meßreihen zeigte sich, daß dieser unmittelbare Beginn der Degradation, noch während des Auswaschens des Natriumchlorids, genügend Aufschluß auch über den zukünftigen pH-Verlauf geben kann.

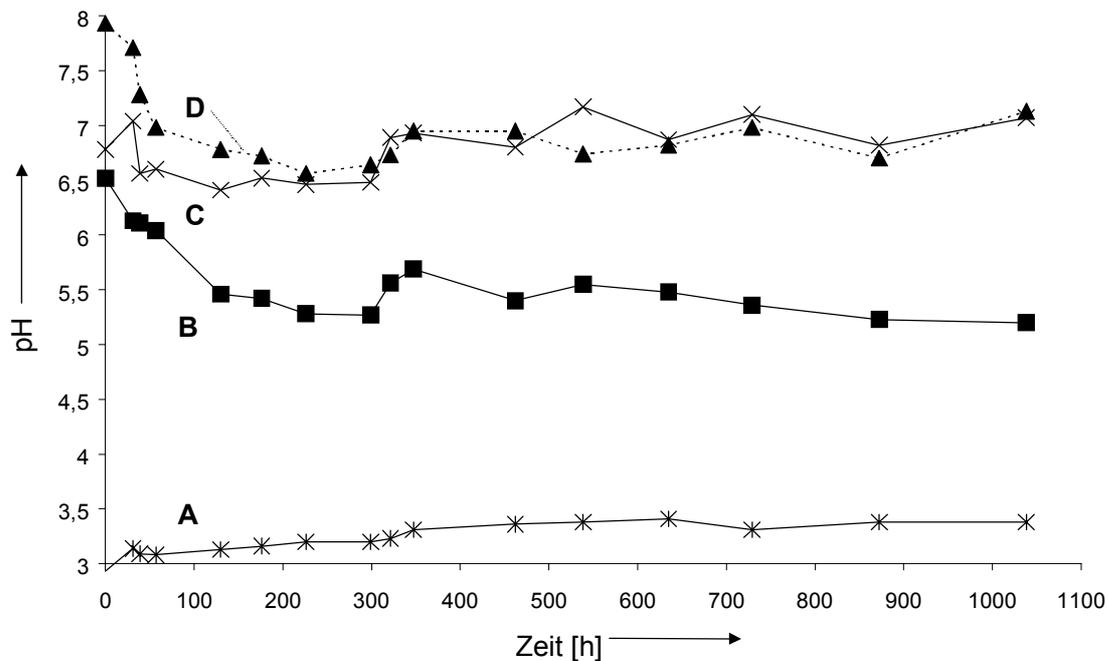


Abb. 10.4: 6-wöchige pH-Verläufe von A: MCPM (Monocalciumphosphat-monohydrat $\text{CaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$); B: DCPD (Brushit CaHPO_4); C: α -TCP (Tricalciumphosphat $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$); D: β -TCP.

Sowohl Brushit als auch Tricalciumphosphat werden als in biologischen Mineralen vorkommend beschrieben. Beide Calciumphosphate sollen sich über einen Lösungs-Rekristallisationsprozeß (*Konversion*) langsam in den thermodynamisch stabileren Hydroxylapatit, bzw. in ein Ca-defizientes apatitisches Produkt umwandeln [LeGeros 94]. Es liegt also nahe, ein solches Calciumphosphat als bioresorbierbares Calcium-Depot einzusetzen. Gemäß Abbildung 3.1 sollte vor allem Tricalciumphosphat in der Lage sein, durch einen hohen pH-Wert die sauren Degradationsprodukte der

Polyester abzupuffern. Es existieren diverse Arbeiten, die sich mit dieser Problematik beschäftigen [Peter et al. 99], [Betz et al. 99]. Hauptsächlich die Tieftemperaturphase β -TCP zeigt während der ersten 100 Stunden einen pH-Wert, der nicht so hoch ist, wie erwartet werden könnte (Vgl. Abb. 3.1). Es findet zunächst die erwartete Phosphat-Hydrolyse statt, danach jedoch erfolgt die Konversion zum thermodynamisch stabileren und basischeren Hydroxylapatit.

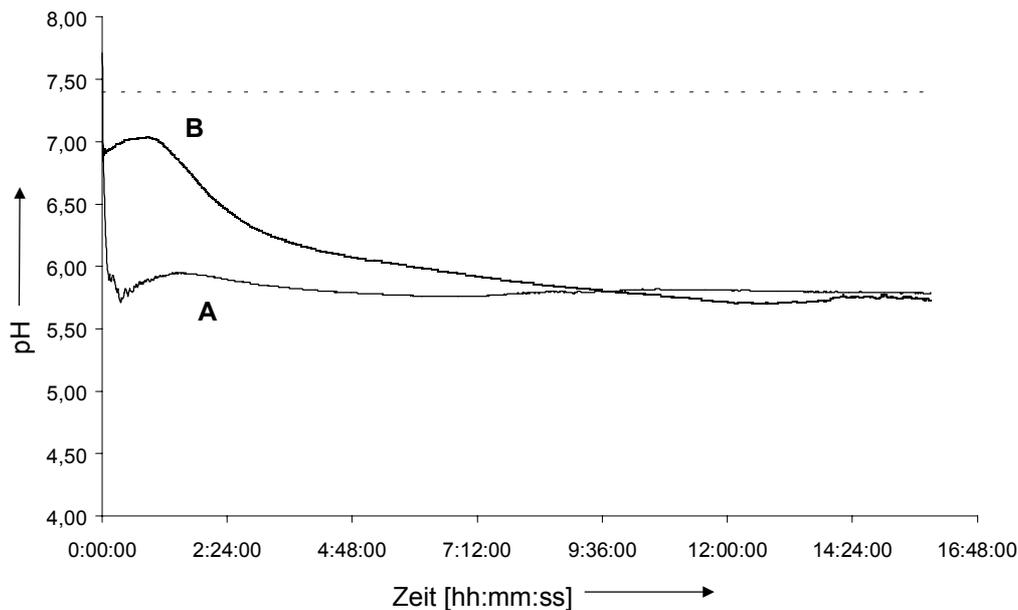


Abb. 10.5: pH-Verlauf beim Auswaschen von Polyglycolid aus Festkörperreaktion mit A: 50, B: 60 Gewichts-% β -TCP (bezogen auf das ausgewaschene Polymer).

Die pH-Testungen von Kompositmaterialien wurden in 100 ml Wasser durchgeführt. Das Komposit wurde mittels einer hydraulischen Presse bei 10 t Druck zu 200 mg schweren Tabletten mit einem Durchmesser von 13 mm verpreßt. Erwartungsgemäß bewegt sich ein Komposit aus β -TCP und Polyglycolid je nach Mischungsverhältnis mehr oder weniger dauerhaft zunächst fast in den geforderten pH-Bereich zwischen pH 7.2 und 7.6. Nach Beenden der Hydrolyse jedoch beginnt die Degradation des Polyesters zu überwiegen. Um den pH-Wert dauerhaft im physiologische Bereich zu halten, wurde versucht, den Abfall des pH-Werts bei Degradation der Polyester durch Zusatz anderer basischer Additive (CaCO_3 , NaHCO_3 , HAP) zu kompensieren [Agrawal & Athanasiou 97].

10.2.2 Carbonathaltige amorphe Calciumphosphate (CO₃ACPs)

Da Körperflüssigkeiten generell bezüglich HAP übersättigt sind, können HAP-Keramiken in diesen Flüssigkeiten nicht resorbiert werden, wenn sie nicht durch Mechanismen wie einer Protonierung von der gewellten Unterseite der Osteoklasten angelöst werden. Löslichkeitsversuche mit bei niedrigen Temperaturen (600-750°C) gesinterten Carbonatapatiten vom B-Typ mit ca. 12 Gew. % Carbonat im Vergleich mit Knochenproben und gesintertem HAP (1200°C) zeigen, daß die Löslichkeit der Carbonatapatite mit der des Knochens vergleichbar ist, das gesinterte HAP jedoch wesentlich unlöslicher ist. Zellbesiedelungsversuche mit Osteoklasten und die Betrachtung der Materialien nach 2 Tagen Inkubation mit dem Rasterelektronenmikroskop zeigten ebenfalls Resorptionslakunen (muldenförmige Einbuchtungen auf der Oberfläche des untersuchten Materials, hervorgerufen durch die Resorption der geriffelten Unterseiten (*ruffled borders*) der Osteoklasten) sowohl auf der Knochenprobe als auch auf dem Carbonatapatit, hingegen keine Anzeichen auf eine osteoklastäre Resorption bei dem gesinterten, hochkristallinen und damit thermodynamisch wesentlich stabileren HAP [Doi et al. 98].

Biologische Apatite unterscheiden sich vom reinen HAP bezüglich Stöchiometrie, Zusammensetzung, Kristallinität und bezüglich anderer physikalischer und mechanischer Eigenschaften. Biologische Apatite sind immer Calcium-defizient und carbonathaltig [LeGeros 94].

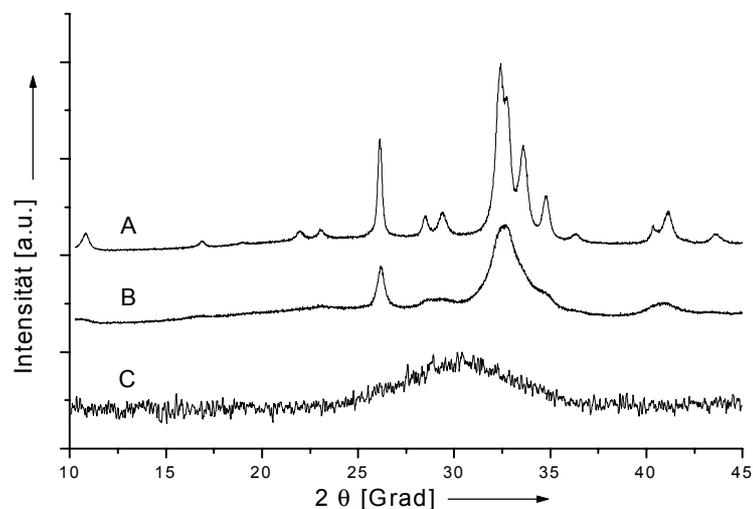


Abb. 10.6: Röntgenpulverdiffraktogramme von A: synthetischem Hydroxylapatit; B: Knochen und C: carbonathaltigem amorphem Calciumphosphat (Carbonat-ACP).

Es liegt also auf der Hand, entweder ein Calciumphosphat zu verwenden, welches dem Knochenapatit bezüglich Kristallinität und Carbonatgehalt sehr ähnlich ist, oder ein Material zu verwenden, welches eine noch niedrigere Kristallinität und somit eine noch höhere Löslichkeit besitzt als die Dahllit-Plättchen im Knochenverbund.

Aus diesem Grund wurden Versuche mit carbonathaltigen amorphen Calciumphosphaten (nachfolgend Carbonat-ACPs oder CO₃ACPs genannt) durchgeführt. Die amorphe Calciumphosphat-Phase transformiert in einem Auflösungs-Rekristallisations-Mechanismus zu Hydroxylapatit, welches letztendlich die stabilste Phase darstellt.

ACPs lassen sich in neutralen bis sauren pH-Bereichen darstellen [Posner & Betts 75]; in diesem Fall wurde eine Herstellungsweise im alkalischen Gebiet (pH 10) gewählt, um einen möglichst hohen Puffereffekt auf das Polyglycolid ausüben zu können. Weiterhin wurde ein stöchiometrisches Ca/P-Verhältnis von 1,67 gewählt. Die Darstellungsanweisung ist im präparativen Teil genauer aufgeführt. Um eine große Bandbreite verschiedener CO₃ACPs zur Verfügung zu haben, wurden verschiedene stöchiometrische C/P-Verhältnisse präpariert. Dabei bedeutet ein C/P-Verhältnis von 0.1 einen Gehalt von 10% CO₃²⁻ in Lösung bezogen auf die Molarität von PO₄³⁻. Bei einer 0.0108 molaren KH₂PO₄-Lösung bedeutet dies eine 0.00108 molare K₂CO₃-Lösung, um ein Verhältnis von C/P=0.1 in Lösung zu erreichen.

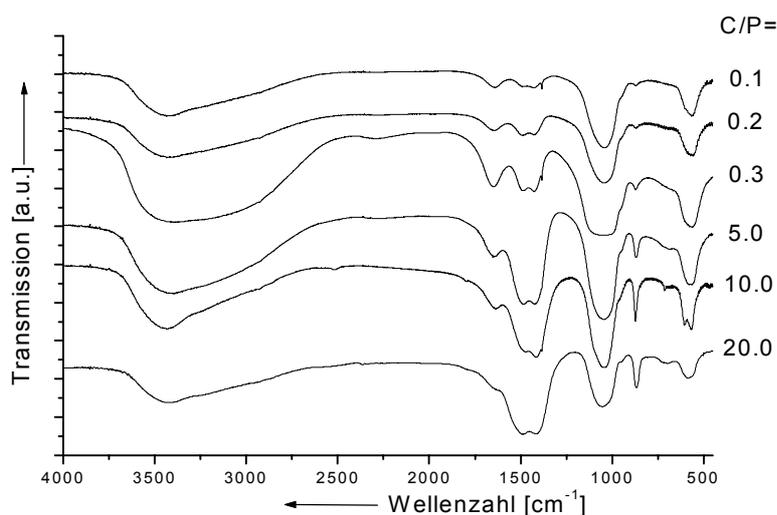


Abb. 10.7: Infrarot-Spektren verschiedener Carbonat-ACPs, gefällt mit den rechts stehenden C/P-Verhältnissen in Lösung.

Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde bei pH 10 und 37°C gefällt. Der End-pH lag zwischen 9.3 und 9.8. Das amorphe Material wurde über Blaubandfilter abfiltriert, dabei wurde der sich bildende Filterkuchen ausgenutzt. Versuche mit Gefriertrocknung des Materials erwiesen sich als ineffektiv, da die Konversion von amorphem Calciumphosphat hin zu HAP auch in der Kälte voranschreitet.

In den IR-Spektren der Abbildung 10.7 zeigen sich die typischen breiten Banden amorpher Calciumphosphate. Weiterhin sind die C-O Schwingungsbanden bei 1493 und 1423 sowie bei 871 cm^{-1} erkennbar (Vgl. Kapitel 3.3.3 und Kapitel 3.3.4). Es fällt auf, daß sich die Maxima der C-O Schwingungsbanden bei 1493 und 1423 cm^{-1} mit zunehmenden Carbonatgehalt zu niedrigeren Wellenzahlen verschieben.

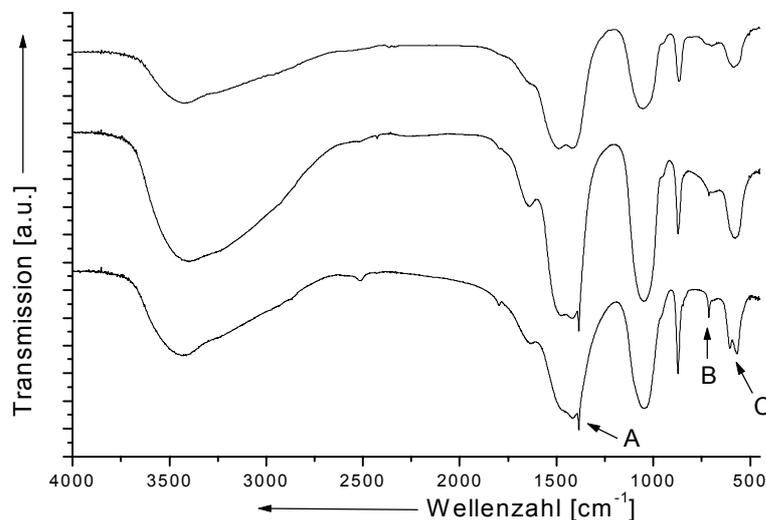


Abb. 10.8: IR-Spektren verschiedener Ansätze eines Carbonat-ACPs, gefällt mit dem C/P-Verhältnis von 20 in der Lösung.

Je nach Herstellungsbedingung und Dauer des Filtrationsprozesses (der Filter kann schneller oder langsamer durch das sehr feinkörnige CO_3ACP -Pulver verstopft werden) können erste Kristallisationstendenzen beobachtet werden. Die ν_4 P-O Schwingungsbande ($550\text{-}600\text{ cm}^{-1}$) erscheint oftmals in den Carbonat-ACPs, welche im C/P-Verhältnis von 10 bis 20 gefällt wurden, schwach aufgespalten (Abb. 10.8 C). Eine weitere Bande fällt im Bereich von 1384 cm^{-1} auf (A), wobei es sich um eine N-O Schwingungsbande aus verbliebenem, nicht ausgewaschenen Nitratresten handelt. Weiterhin ist oftmals ab einem stöchiometrischen C/P-Verhältnis von 10 eine Bande bei 712 cm^{-1} sichtbar (B). Diese Bande läßt sich am ehesten als die ν_4 C-O

Schwingungsbande der Calcit-Modifikation des Calciumcarbonats identifizieren. Aragonit und Vaterit zeigen an derselben Stelle zwei Banden, bei amorphem Calciumcarbonat sind diese Banden nahezu unsichtbar [Andersen & Brečević 91], [LeGeros et al. 68].

Diese Erkenntnisse zeigen, daß viele Faktoren auf die Kristallinität und Zusammensetzung der CO₃ACPs einen Einfluß haben können. Zu kurzes Waschen führt zu Nitrat-Einschlüssen. Zu langes Waschen kann dagegen zu beginnender Kristallisation des Calciumphosphats führen. Gerade bei hohen Carbonatgehalten kann dabei auch Calcit auskristallisieren. Dieser Effekt ist im Einklang mit der Beobachtung, daß oftmals neben CO₃ACP auch amorphes Calciumcarbonat entsteht [Elliott 94]. Hinweise für diese Tatsache geben die weiter unten aufgeführten Konversionsversuche.

Im allgemeinen ist es möglich, CO₃ACPs bis zu einem Verhältnis von C/P=25 ohne Calcit-Banden oder -Reflexe herzustellen. Bei höheren Temperaturen führt ein C/P-Verhältnis von über 40 zur Bildung von Aragonit [LeGeros et al. 68]. Allerdings findet auch im Festkörper durch Auflösungs- und Rekristallisationsvorgänge im okkludierten Wasser eine langsame Kristallisation statt, so daß das Calciumphosphat unter Kühlung länger stabil bleibt. Es ist aber nach längerer Bevorratung zumindest eine IR-spektrometrische Messung oder ein Röntgenpulverdiffraktogramm vonnöten, um den nach wie vor amorphen CaCO₃-freien Zustand des Materials zu bestätigen.

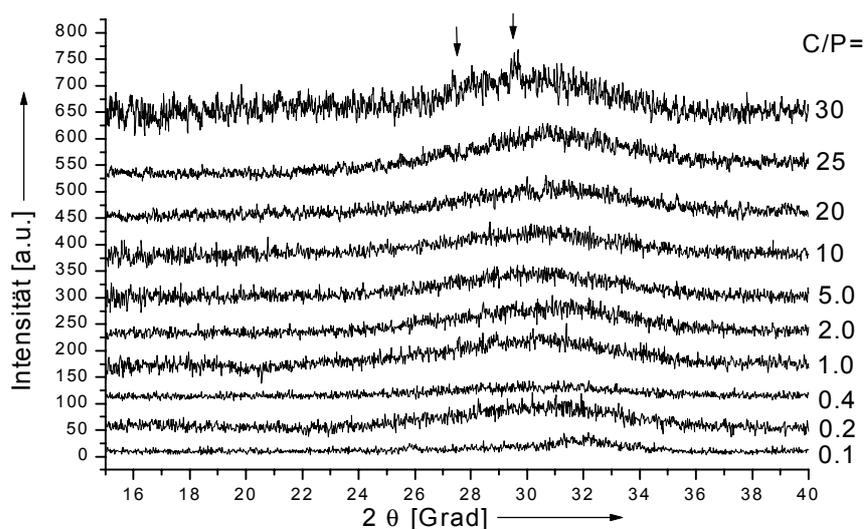
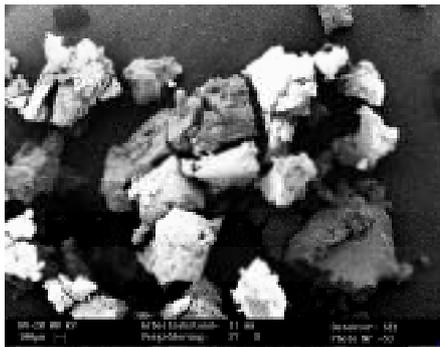
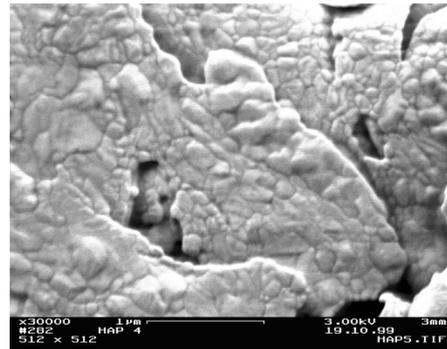


Abb. 10.9: Röntgenpulverdiffraktogramme von amorphen carbonathaltigen Calciumphosphaten, gefällt mit verschiedenen stöchiometrischen C/P-Verhältnissen in Lösung. Die Pfeile bezeichnen schwache Calcit-Reflexe.

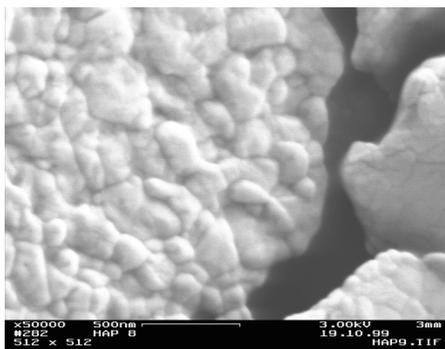
Die Röntgenbeugungsmessungen (Abb. 10.9) zeigen beginnende Calcitbildung bei hohen stöchiometrischen C/P-Verhältnissen in der Präzipitationslösung. Hohe Carbonatgehalte führen zu einer so starken Reflexverbreiterung, daß das Röntgenpulverdiffraktogramm nur noch einen breiten amorphen Halo zeigt. Daher wird in diesen Fällen auch von Carbonatapatiten gesprochen, da eine Unterscheidung nicht mehr möglich ist.



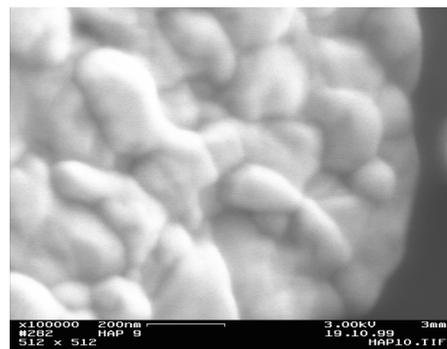
A



B



C



D

Abb. 10.10: REM-Aufnahmen der amorphen carbonathaltigen Calciumphosphate. A: Überblick über die Substanzpartikel (Vergrößerung 27X); B: Aufsicht auf ein CO_3ACP -Korn (30.000X); C: Oberfläche der CO_3ACP -Partikel (50.000X); D: Nahaufnahme von C (100.000X). Die Bilder B C und D wurden von Dr. D. Scharnweber, Dresden aufgenommen.

Die Substanz ist nach dem Filtrieren sehr breiig, was auf die geringe Partikelgröße in Verbindung mit Restwasser zurückzuführen ist. Nach dem Trocknen ist das Material sehr fest, erscheint in dickeren Körnern (Abb. 10.10 A) und muß zermörsert werden. Durch die kleinen Partikel erfolgt eine hohe Wasserokklusion. Die Aufsicht auf die Oberfläche dieser CO_3ACP -Partikel zeigt große Agglomerate (B), die aus wesentlich kleineren, runden Subpartikeln im Bereich von ca. 20 bis 200 nm Größe aufgebaut zu sein scheinen (C). Abb. 10.10 D zeigt in der rechten Bildhälfte tropfenförmige Mikrokristallite in Nahaufnahme, wie sie nach der Konversion auch in größeren Dimensionen beobachtet werden konnten (Abb. 10.21 B).

Thermisch unterscheiden sich die Carbonat-ACPs kaum untereinander. Das okkludierte Wasser lässt sich durch Erhitzen entfernen, erkennbar an dem starken MS-Signal für Wasser und dem endothermen DTA-Peak. Trocknungstemperaturen bis 200°C haben keine Veränderung des Materials zur Folge. Im Bereich von 600-670°C erfolgt ein exothermes Ereignis, gefolgt von einem Gewichtsverlust im Bereich bis 800°C, der mit dem wiederum exothermen Verlust von CO₂ verbunden ist. Einige Messungen zeigen auch im Massenspektrum eine zweistufige Reaktion des Carbonats im Festkörper, was wiederum auf die Existenz eines CO₃ACP neben einem amorphen Calciumcarbonat hinweisen kann. Aus anderen Messungen ergibt sich das Bild von endothermen CO₂-Abgängen (bei ca. 700°C), die durch exotherme Signale der Phasenumwandlungen (680°C und 750°C) hin zu den thermodynamisch stabileren kristallinen Produkten überlagert sein können. Je nach Ausmaß der Signale kann sowohl das eine wie auch das andere überlagern.

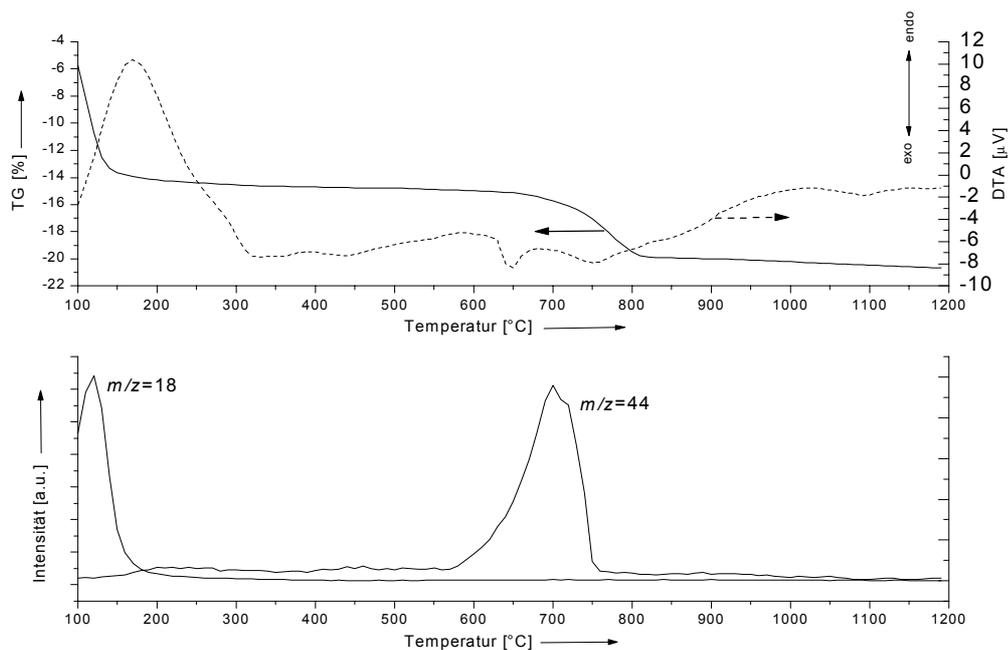


Abb. 10.10: Kombinierte TG-DTA-MS-Messung eines CO₃ACPs. Dargestellt sind im unteren Diagramm die Massen $m/z=18$ (H₂O) und $m/z=44$ (CO₂).

Röntgenbeugungsuntersuchungen zeigten nach dem Erhitzen auf 600°C eine kristalline Apatitphase neben einer kristallinen Calcitphase, nach den beiden mit der DTA gemessenen exothermen Ereignissen das Vorliegen von Calciumoxid und Hydroxylapatit.

Der Wassergehalt folgt keinem bestimmten Trend. Er kann von 9-33 Gew.-% betragen. Der Beginn des CO₂-Signals (DTA und MS) verschiebt sich mit zunehmenden Carbonatgehalt immer weiter hin zu höheren Temperaturen. Beginnend bei ca. 400-450 °C bei niedrigen C/P-Verhältnissen in Lösung steigt diese Temperatur bis zu 580°C bei C/P=20. Die Anfangstemperatur der CO₂-Entstehung bei Calcit beträgt etwa 700°C. Trägt man die Gewichts-% CO₂ gegen das C/P-Verhältnis in Lösung auf, womit die Substanz gefällt wurde, so erhält man ein Diagramm wie in Abbildung 10.11 ersichtlich.

<i>C/P in Lösung</i>	<i>H₂O [Gew.-%]</i>	<i>Gesamt CO₂ [Gew.-%]</i>	<i>Beginn der CO₂- Entstehung [°C]</i>
0,1	9.29	2.6	400
0,2	20.3	1.9	480-500
0,3	18.2	2.3	480
0,5	21.3	2.5	450
1	21.7	4.1	520
2	20.5	5.7	520
5	19.5	10.9	500
10	18.2	10.9	500
15	32.7	13.7	520
20	18.5	18.9	580
CaCO ₃	0	44	700

Tabelle 10.1: Zusammenfassung der TG-DTA-MS-Daten der carbonathaltigen amorphen Calciumphosphate. Als Vergleichssubstanz ist noch die Calcit-Modifikation von CaCO₃ angegeben.

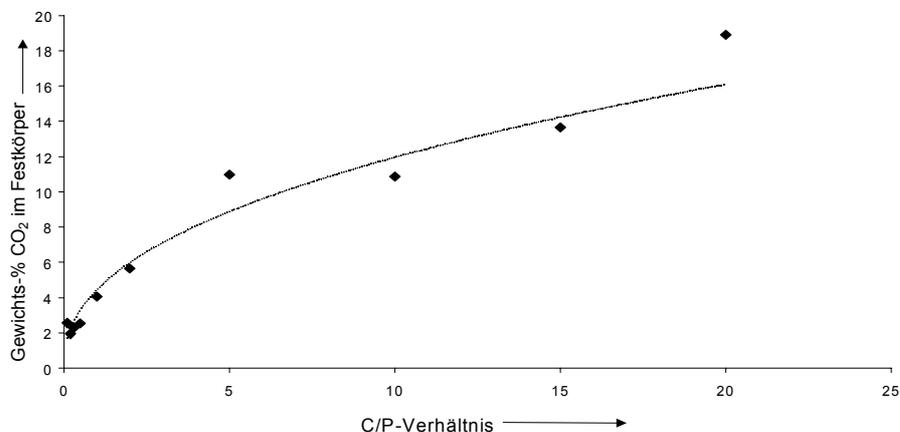


Abb. 10.11: Auftragung des C/P-Verhältnisses in Lösung gegen die mittels Thermogravimetrie gemessenen Gewichts-% CO₂.

Dieses Diagramm ist in guter Übereinstimmung mit den Literaturdaten über Carbonatapatite [LeGeros 68].

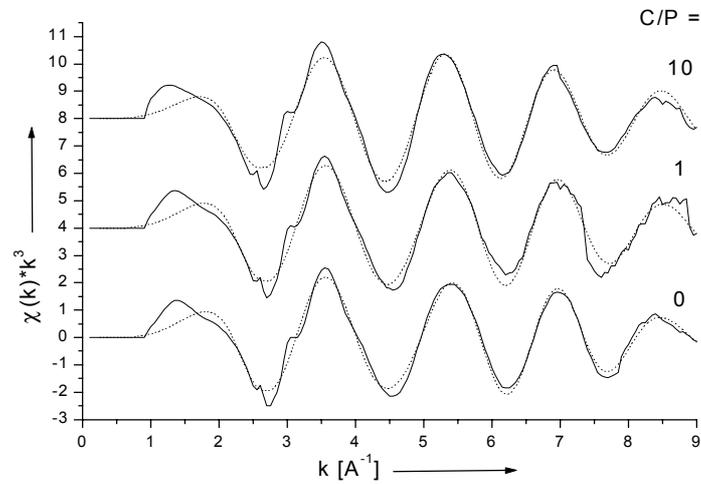


Abb. 10.12: k^3 -gewichtete EXAFS Spektren von Carbonat-ACPs gefällt mit dem rechts angegebenen stöchiometrischen C/P-Verhältnis (0, 1 und 10). Durchgezogene Linie: Experimentelle Daten, gestrichelte Linie: Fit an die experimentellen Daten

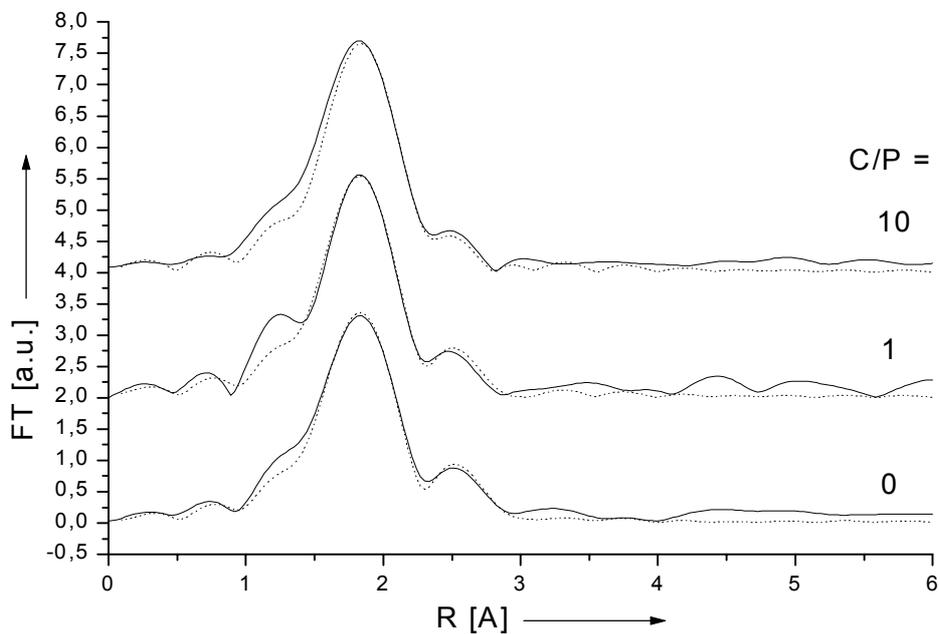


Abb. 10.13: Fourier-transformierte Calcium-EXAFS-Spektren amorpher und carbonathaltiger amorpher Calciumphosphate, gefällt mit den in der Abbildung angegebenen stöchiometrischen C/P-Verhältnissen in Lösung. Durchgezogene Linien: experimentelle Daten; gepunktete Linien: berechnete Fitfunktion aus den Röntgenbeugungsdaten.

Aus den ausgewerteten EXAFS-Spektren (Abb. 10.12 und 10.13) geht hervor, daß nur die ersten zwei Schalen mit einer Näherungsfunktion (Fit) beschreibbar sind.

Allgemein ergeben die carbonathaltigen amorphen Calciumphosphate sehr ähnliche EXAFS-Spektren, obwohl die Zusammensetzung variiert [Nelson et al. 89].

Schale	Ca-6 O	Ca-2.4 P
HAP Kristallographische Werte ¹	2.32-2.41	3.03-3.36
ACP C/P=0	2.40/11	3.10/18
CO ₃ ACP C/P=1	2.40/10	3.09/22
CO ₃ ACP C/P=10	2.41/10	3.15/31
CO ₃ ACP C/P=20	2.40/10	3.18/37

Tabelle 10.1: Auswertung der EXAFS-Spektren. Angegeben sind die Atomabstände in Ångström für die ersten zwei Schalen und die Debye-Weller-Faktoren $\sigma^2 \cdot 1000$ [Å²] für die vier gemessenen Calciumphosphate. ¹ Kristallographische Werte aus [Posner & Diorio 58].

Tabelle 10.1 verdeutlicht, daß die Abstände der ersten Schale immer sehr ähnlich sind. Mit steigendem Carbonatgehalt scheint auch der Ca-P Abstand der zweiten Schale zu steigen, wohingegen die erste Schale durch die steigende Carbonatsubstitution unberührt bleibt. Gleichzeitig nimmt steigt aber auch die Unordnung der zweiten Schale an. Durch die Substitution vom B-Typ dehnt sich die kristallographische c-Achse aus, die Hydroxylgruppe wird aus den „Kanalpositionen“ hinausgedrängt und die P-O Abstände sinken [El Feki et al. 00] (vgl. Kapitel 3.3.4). Die Interpretation dieser Tatsache und der steigenden Abstände in der zweiten Schale kann weiter ausgedehnt werden: Bei Substitution eines tetraedrischen PO₄³⁻-Ions durch ein planares CO₃²⁻-Ion werden drei der vier vakanten Sauerstoffpositionen wieder besetzt. Die vierte Sauerstoffposition wird vom Ca²⁺-Ion entfernt positioniert [Harries et al. 87-2].

Da die Carbonat-ACPs bei hohen pH-Werten gefällt wurden und die Löslichkeit entsprechend hoch ist [Okazaki & Takahashi 99], konnte erreicht werden, daß mit diesen Calciumphosphaten der pH-Wert in reinem Wasser in den physiologischen Bereich verläuft (siehe Abbildung 10.12). Als ideal erwies sich ein Carbonat-ACP, welcher mit einem stöchiometrischen C/P-Verhältnis in Lösung von 20 gefällt wurde. Dies führt zu einem carbonathaltigen amorphen Calciumphosphat mit 18 Gewichts-% CO₂. Dabei wurde ein Gewichts-Verhältnis von 40 % Carbonat-ACP und 60 % ausgewaschenem Polyglycolid eingesetzt.

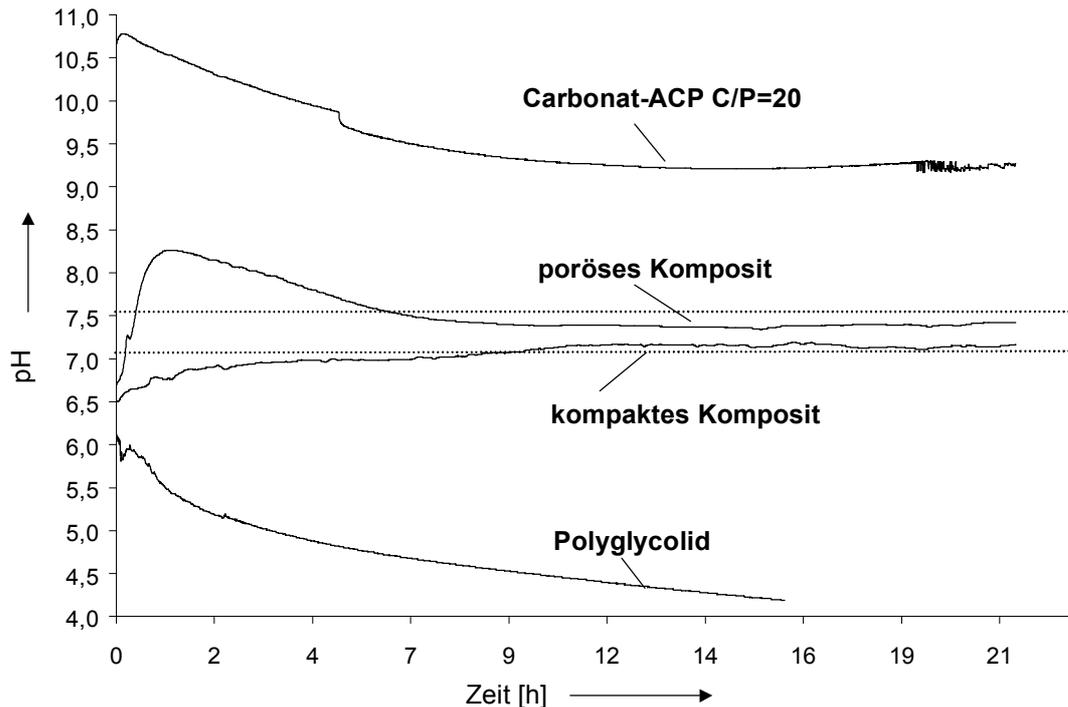


Abb. 10.14: pH-Verläufe über 21 Stunden von Polyglycolid, Carbonat-ACP mit einem C/P-Verhältnis von 20 in Lösung gefällt und den porösen sowie kompakten Kompositmaterialien. Der mit gestrichelten Linien eingegrenzte Bereich stellt dabei den pH-Bereich dar, der optimale Bedingungen für die Zellen bietet.

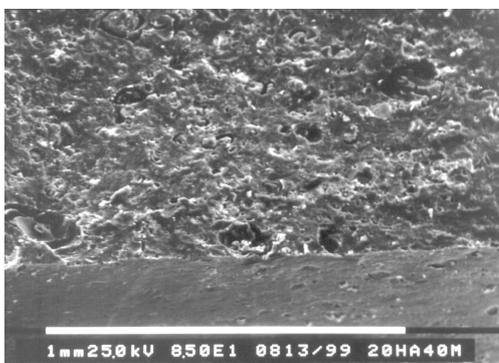
Kompakte (massive, im Gegensatz zu porösen) Komposite wurden hergestellt, indem das Polyglycolid vor dem Vermischen mit CO_3ACP und Verpressen ausgewaschen wurde. Diese Materialien fördern nicht die Zellmigration und Zellversorgung, sind jedoch wesentlich stabiler. Es ist angedacht, durch Gradieren der Materialien (beispielsweise ein kompakter Mantel aus Komposit, der einen porösen Kern aus Komposit umfaßt) die Stabilität zu erhöhen.

10.2.3. Stabilität des Komposits

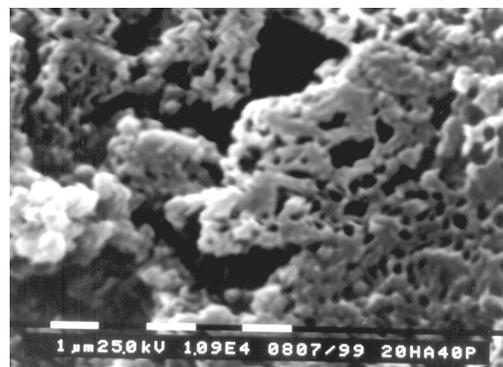
Durch die Wasseraufnahme sowohl des Polyglycolids als auch des Carbonat-ACPs kann es beim Auswaschen des Komposits zum Zerfallen des Materials kommen. Ungenügender Zusammenhalt zwischen den Partikeln und zu kleine Korngrößen konnten als Hauptverursacher herausgefunden werden. Das Material sollte zum Vermischen nicht zu stark vermörsert werden. Tabletten aus im elektrischen Mörser oder in einer Kugelmühle innig vermörserten Bestandteilen wiesen die geringste Festigkeit auf. Vorsichtiges Vermörsern und Sintern des Materials gewährleisteten

die beste Stabilität der Komposite. Dabei wurden Partikelgrößen des Carbonat-ACPs von höchstens 100-300 μm Durchmesser, gemessen mit dem Rasterelektronenmikroskop, erreicht. Mittels einer Schmelzpresse wurden aus 150 mg ausgewaschenen Polyglycolid und 60 mg CO_3ACP (bzw. 300 mg Polyglycolid mit NaCl beladen und 60 mg CO_3ACP für poröse Komposite) Tabletten mit einem Durchmesser von 13 mm gepreßt. Als vorteilhaft erwiesen sich Preßbedingungen von 3 min bei 150°C und 10^8 MPa (10 kN) Druck und einer Abkühlperiode von 5 min unter demselben Druck. Zu hohe Temperaturen führten zur Degradation des Materials, was auf den Wassergehalt des Calciumphosphats zurückführbar ist: Ein Polyester degradiert in der Hitze wesentlich schneller. Im Fall des ausgewaschenen Polyglycolids kollabieren die Poren unter solchen Preßbedingungen, was zu einem kompakten Material führt (Abb. 10.14 A). Diese kompakten Komposittabletten wiesen dadurch eine Dicke von 1.1 mm und eine Dichte von 1.45 g cm^{-3} auf. Nach dem 4-stündigen Auswaschen des Kochsalzes in kaltem Wasser (8°C) wiesen die porösen Tabletten eine Dicke von 1.3 mm auf, hatten eine Dichte von 1.0 g cm^{-3} und ein durchschnittliches Porenvolumen von ca. 31 Vol.-%. Bezieht man noch die 18.5 Gewichts-% Wasser im Carbonat-ACP mit ein, so erhält man ein Gewichtsverhältnis Polyglycolid zu Calciumphosphat von 150 mg : 49 mg. Größere Preßlinge, wie beispielsweise zylindrische Formkörper der Ausmaße 13X15 mm, benötigen eine entsprechend längere Auswaschzeit (ca. 24 Stunden).

An diesen zylindrischen Formkörpern wurden Bruchtests durchgeführt und die Zeiten und Temperaturen des Schmelzpreßvorgangs variiert. Bei idealen Preßbedingungen kompakter Kompositzylinder wurden Elastizitätsmodule von 1850 Mpa und 132 Mpa Druckfestigkeit gemessen [Gerngroß & Becker 94].



A



B

Abb. 10.15: A: Aufsicht auf die Bruchkante eines kompakten Komposit-Preßlings (Vergrößerung 8.5X); B: Bruchkante des porösen Komposits (10900X).

10.2.4. Zellkulturtestung auf Biokompatibilität

(durchgeführt von Unfallchirurgen des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf)

Zum Besiedeln mit Osteoblasten zur Testung der Biokompatibilität wurden sowohl poröse als auch kompakte Tabletten mit obiger Zusammensetzung eingesetzt. Die pH-Verläufe zeigen, daß durch die hohe Löslichkeit und den hohen pH-Wert während der Fällung des Carbonat-ACPs der pH-Wert anfänglich über die physiologische Grenze hinaus verlaufen kann. Daher wurden die Tabletten vor dem Besiedeln mit Osteoblasten weitere 4 Stunden gewässert. Primäre Mausosteoblasten von 3 Tage alten Mäusen wurden in α -MEM (*Minimum Essential Medium*), welches 10 % fötales Kälberserum (FKS) und 1 % Penicilin-Streptomycin (PS) enthielt, kultiviert. Die Komposittabletten wurden, plziert auf mikroskopischen Deckgläschen, in *six-well plates* (Zellkulturgefäß für 6 verschiedene Proben) mit $3 \cdot 10^5$ Zellen pro well überschichtet. Das Medium (5 ml/well) wurde nach dem ersten und daraufhin nach jedem dritten Tag gewechselt. Die Zellkulturen wurden bei 37°C unter 95 % Luft und 5 % CO₂-Atmosphäre bebrütet. Der pH-Wert wurde bei jedem Medienwechsel gemessen. Nach 1, 2, 3 und 4 Wochen wurden Proben entnommen, mit 3,7 % Formaldehyd in Phosphatpufferlösung (PBS) fixiert und mit PBS gewaschen. Diverse histologische Untersuchungen (*van Giesson-Färbung* auf Alkalische Phosphatase und Kollagen, *von Kossa-Färbung* auf mineralisierte Bereiche) gaben Aufschluß über die Zellaktivität. REM-Aufnahmen nach Gefriertrocknung des Materials zeigten einen dichten, konfluenten Zellrasen (Abb. 10.16). Durch die Optimierung sind die Osteoblasten fähig, zu wachsen und Knochenmatrix auf der Implantatoberfläche zu bilden [Linhart et al. 01].

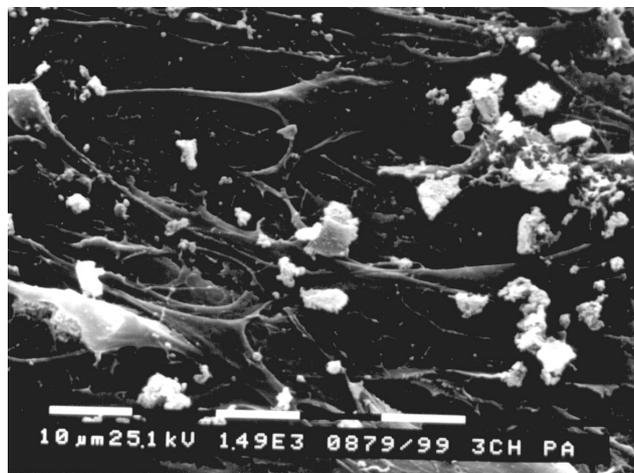


Abb. 10.16: Osteoblasten-Zellrasen auf dem porösen Komposit nach 3 Wochen Besiedelung (Vergrößerung 1490X).

10.2.5 Konversion des amorphen carbonathaltigen Calciumphosphats

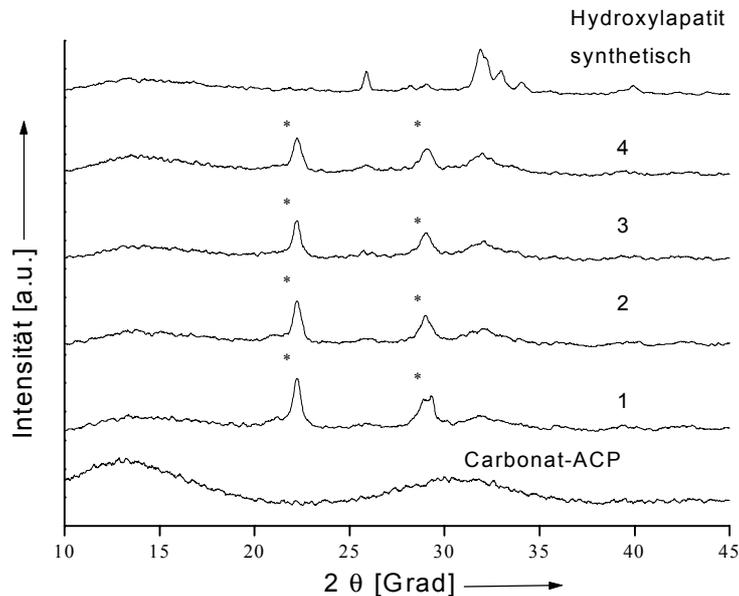


Abb. 10.17: Konversion des Carbonat-ACPs im Komposit nach 1 bis 4 Wochen. Die Zahlen bezeichnen die Wochen der Zellbesiedelung. Mit Sternchen (*) bezeichnete Reflexe: Polyglycolid-Reflexe.

Nach vierwöchiger Zellbesiedelung wurden Röntgenpulverdiffraktogramme der besiedelten Komposittabletten aufgenommen. Deutlich ist im Vergleich mit dem Carbonat-ACP und dem synthetischen Hydroxylapatit die langsame Kristallisation der apatitischen Phase (hauptsächlich zwischen 30 und $35^\circ 2\theta$) erkennbar. Die organische Polyglycolid-Phase und das Zellkulturmedium α -MEM wirken hier als Inhibitor und verzögern die Kristallisation deutlich.

Um zu erfassen, inwieweit die Zellen für die Inhibition der Kristallisation verantwortlich sind, wurden poröse Komposittabletten dem Zellnährmedium α -MEM ausgesetzt. Welchen Einfluß das fötale Kälberserum hatte, wurde durch Konversionsversuche der Komposite in α -MEM mit und ohne FKS erfaßt. Auch der Einfluß von Polyglycolid wurde untersucht, indem auch reines Carbonat-ACP der Phase, die für den Knochenersatzwerkstoff verwendet wurde (gefällt mit $C/P=20$ und bei $\text{pH } 10$), den Medien ausgesetzt wurde. Diese Versuche wurden, wie die Zellbesiedelungsversuche unter den gleichen Bedingungen durchgeführt (sterile Bedingungen, Inkubation der Pulverförmigen Proben und der Probenkörper in six-well plates im Brutschrank bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ -Atmosphäre). Alle drei Tage wurde das Medium gewechselt, in regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen

und untersucht. Zum Vergleich wurde die Konversion des Carbonat-ACPs in Wasser untersucht.

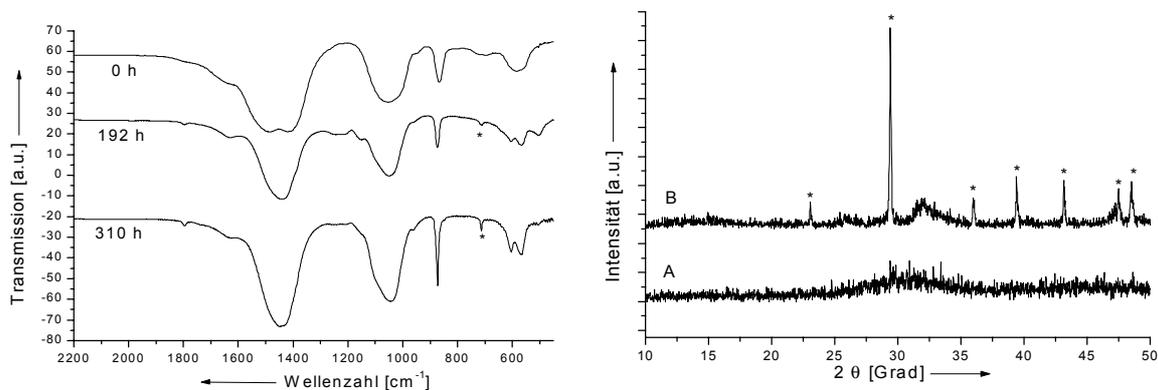


Abb.10.18: Konversion des Carbonat-ACPs, gefällt bei pH 10 mit einem stöchiometrischen C/P-Verhältnis von 20 in Lösung. Links: IR-Spektren nativ; nach 192; nach 310 Stunden in Wasser. Mit Sternchen (*) bezeichnet: Calcit-Bande. Rechts: Röntgenpulverdiffraktogramm von A: nativen CO₃ACP und B: nach 310 Stunden in Wasser. Mit Sternchen (*) bezeichnet sind Calcit-Reflexe.

Dispergiert man Carbonat-ACP in Wasser und nimmt in regelmäßigen Zeitabständen Proben, welche abzentrifugiert und schnell bei 80-100°C im Trockenschrank getrocknet werden, so zeigt sich, daß bereits nach kurzer Zeit Calcit, auskristallisiert. Einfacher und schneller läßt sich diese Konversion im Infrarot-Spektrum anhand der Bande bei 712 cm⁻¹ beobachten. Gleichzeitig erfolgt auch eine Kristallisation des Calciumphosphats, erkennbar an der Aufspaltung der Banden bei 550 bis 600 cm⁻¹ (Vgl. Kapitel 3.3.3 und insbesondere Abb. 3.11). Die Bande bei 1034 cm⁻¹ verändert sich in dieser Zeit nicht erkennbar. Im Röntgenpulverdiffraktogramm sind schon nach wenigen Stunden Calcit-Reflexe erkennbar, die nur in der Intensität, jedoch nicht in der Schärfe (Halbwertsbreite) zunehmen.

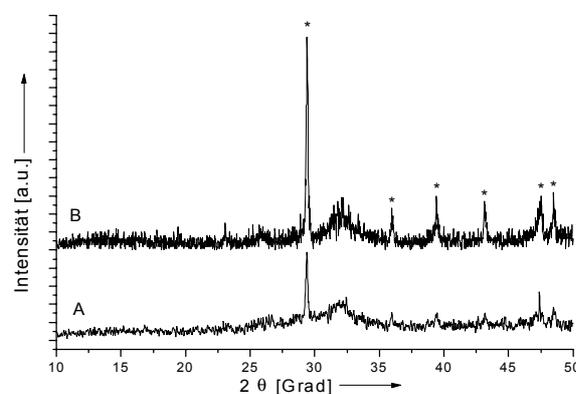


Abb. 10.19: Röntgenpulverdiffraktogramme der Carbonat-ACP-Proben in Zellnährmedium A: mit FK5, B: ohne FK5 nach 166 h. Mit Sternchen (*) sind die Calcit-Reflexe bezeichnet.

Die Röntgenpulverdiffraktogramme der Carbonat-ACP-Phase in Zellnährmedium zeigen ein eindeutiges Bild der Inhibition. Nach 166 Stunden Inkubationszeit sind die Intensitäten der Calcit-Reflexe im Vergleich zum amorphen Halo der ACP-Phase wesentlich höher. In beiden Fällen ist keine Konversion des Calciumphosphats erkennbar.

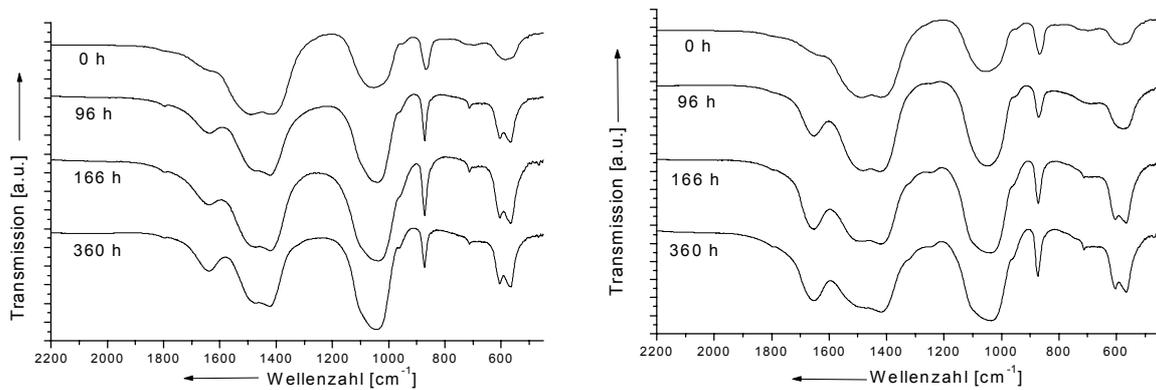


Abb. 10.20: Konversion des Carbonat-ACPs in α -MEM ohne (links) und α -MEM mit fötalem Kälberserum (FKS) (rechts).

Die IR-Spektren der Konversion des CO₃ACP in dem Zellnährmedium α -MEM zeigen ebenfalls deutlich eine Inhibition, hervorgerufen durch die Inhaltsstoffe des Mediums und durch das Serumalbumin. Der Calcitgehalt erscheint nach ähnlicher Inkubationszeit geringer, auch die Aufspaltung der P-O Schwingungsbande bei 550-600 cm⁻¹ ist nicht so stark ausgeprägt. Länger dauert dagegen die Konversion im serumhaltigen Zellnährmedium. Nach 166 Stunden Inkubationszeit ist die Bandenaufspaltung ähnlich der bei der Konversion in α -MEM ohne Serum nach 96 Stunden. In diesem Fall zeigen sich im Röntgenpulverdiffraktogramm auch beginnende Stufen der Calcitbildung. Weiterhin fällt die zunehmende Intensität der Bande bei 1655 cm⁻¹ auf, die allgemein H-O-H Bindungs- und Rotationsschwingungen von freiem Wasser zugeordnet werden (vgl. Tabelle 3.4). Es kann sich aber auch um eine C=O Valenzschwingung mit N-H Valenzschwingungen aus Proteinen handeln, zumal im Bereich von 2800-3000 cm⁻¹ ebenfalls intensivere Banden nach 166 Stunden Inkubationszeit beobachtbar sind. Ein steigender Wassergehalt kann mit der zunehmenden Okklusion von Wasser durch ein nanokristallin und sehr feinkörnig bleibendes Material erklärt werden; ebenso ist auch eine Okklusion von Bestandteilen des Mediums möglich.

Die Konversion des Komposits, bestehend aus porösem Polyglycolid und Carbonat-ACP zeigt keine Kristallisation von Calcit. Die erwartungsgemäß stark gebremste

Bildung einer apatitischen Phase ist dagegen nach 360 Stunden sowohl im Zellnährmedium mit als auch ohne Serum erkennbar. Polyglycolid inhibiert die Kristallisation von CaCO_3 , wie offensichtlich auch während der Zellinkubationsversuche (Abb. 10.16) geschehen.

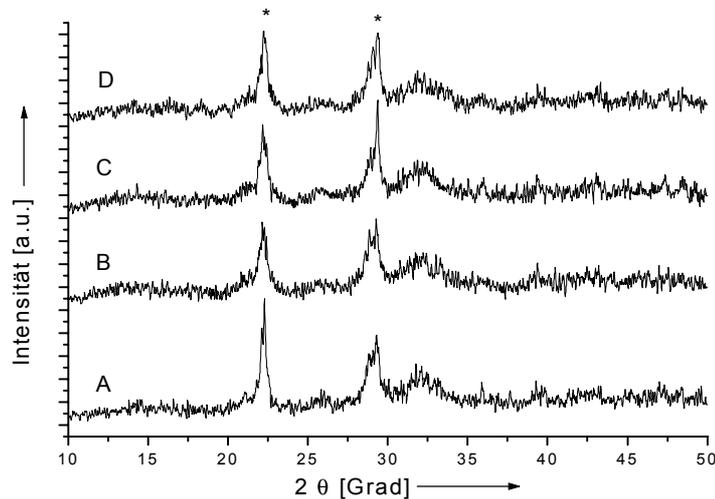


Abb. 10.21: Röntgenpulverdiffraktogramme von PGA- CO_3 ACP-Komposit-Tabletten in Zellnährmedium. A: ohne FKS nach 360 h; B: ohne FKS nach 450 h; C: mit FKS nach 360 h; D: mit FKS nach 450 h. Mit Sternchen (*) sind die Polyglycolid-Reflexe bezeichnet.

Weder in den Inkubationsversuchen mit noch bei den ohne fötalem Kälberserum sind Unterschiede in der Konversionsgeschwindigkeit zu erkennen. Jedoch ist das Signal/Rausch-Verhältnis für eine solche Abschätzung zu hoch.

Die rasterelektronenmikroskopischen Beobachtungen zeigen die sich durch die Konversion bildenden Kristallformen. Hantelförmige Kristallite, wie bei den Fluorapatiten sind auch hier beobachtbar (Abb. 10.22 A). In serumhaltigen Medium finden sich nach 96 Stunden Kristallite dieser Form von 7 μm Länge und einer größten Ausdehnung von 2 μm . Ein kritisches Verhältnis von Länge zu Durchmesser ist bei diesen Aggregaten nicht beobachtbar. Weiterhin finden sich auf der Oberfläche der ACP-Agglomerate hantel- bis tropfenförmige Kristalle (B) ähnlicher Ausdehnung (ca. 8·4 μm). Dieser Habitus deckt sich mit den Literaturdaten [Okazaki & Takahashi 99], jedoch sind die hier beobachteten Kristalle deutlich größer. Ein weiteres, oft beobachtetes Phänomen ist die Bildung von Hohlkugeln (C und D). Auf der Oberfläche eines CO_3 ACP-Agglomerats beginnen Calcit und Carbonatapatit auszukristallisieren und dabei selbst wiederum ein festes Gefüge zu bilden. Das

Carbonat-ACP löst sich in der Geschwindigkeit, mit der sich Calcit und Carbonatapatit bilden, auf.

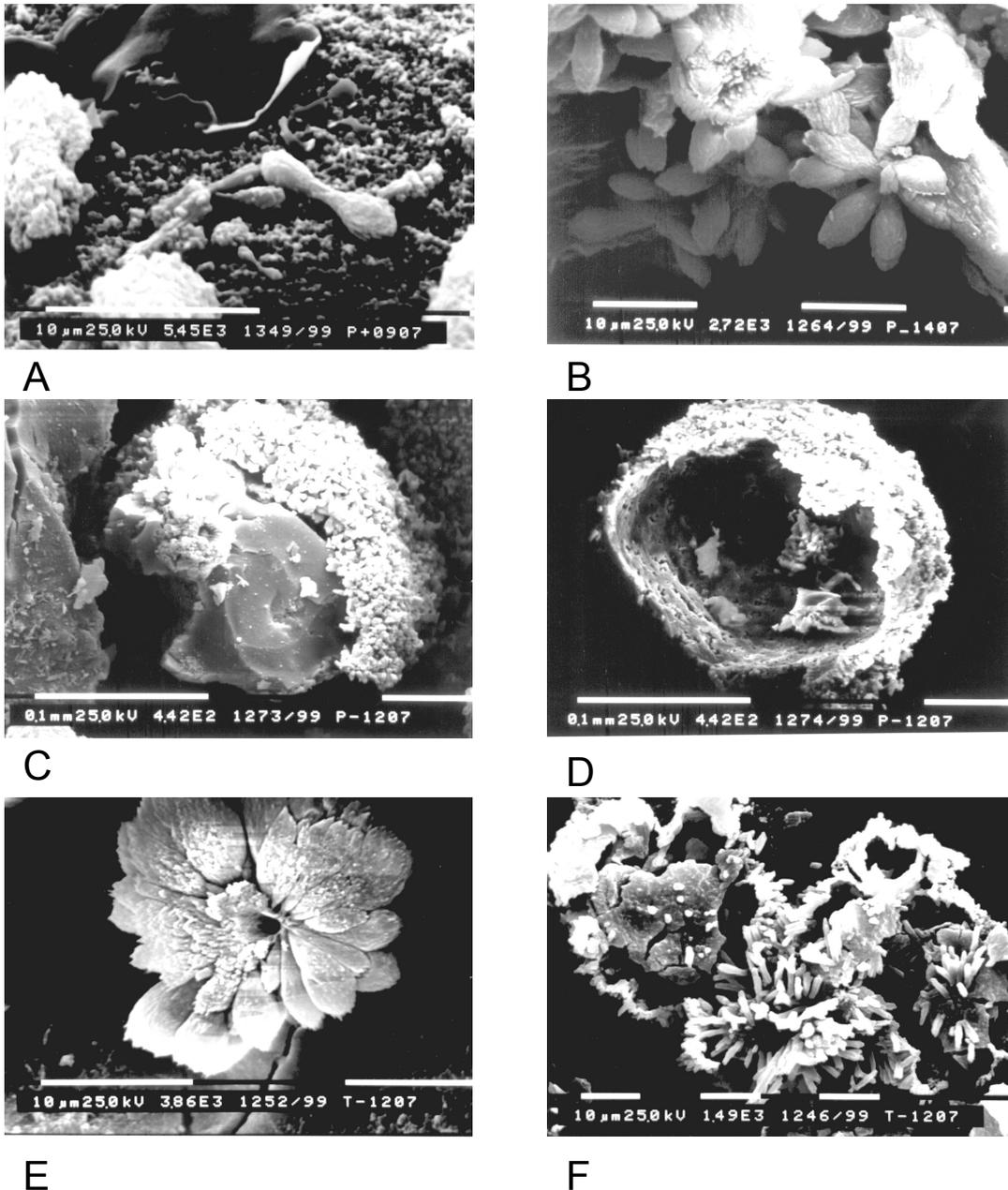


Abb. 10.22: REM-Aufnahmen der konvertierten Carbonat-ACPs. A: Bildung von hantelförmigen Kristalliten in serumhaltigen Medium nach 96 h Inkubation (Vergrößerung 5450X). B: Hantel- bis tropfenförmige Carbonatapatitkristalle nach 214-stündiger Konversion in α -MEM ohne FKS (2720X). C und D: Phänomen der Hohlkugelbildung. Kristallisation auf der Oberfläche eines CO_3 -ACP-Agglomerats (442X). E: Rosenförmige Kristallisation auf der Oberfläche des Komposits nach 165 Stunden in serumfreiem Medium (3060X). F: Hexagonale Kristallite, ebenfalls auf der Oberfläche des PGA/ CO_3 -ACP-Komposits nach 165 h in α -MEM ohne Serum (1490X).

Besonders die Oberfläche des Carbonat-ACPs ist davon betroffen, so steigt mit steigendem Kristallwachstum der Abstand zwischen dem Agglomerat und den neu entstandenen Kristallen. Durch mechanische Belastung (Rühren) fällt das kleiner

gewordene ACP-Agglomerat aus dem festen Kristallgefüge heraus und zurück bleibt eine solche Hohlkugel.

Das tropfenförmige Motiv der Carbonatapatite findet sich auch auf der Oberfläche eines Polyglycolid/Carbonat-ACP-Komposits (E). Ähnlich einer Rose ist dieser Kristall aus einem Riß der Polyglycolid-Oberfläche heraus auskristallisiert. Die einzelnen Kristallite zeigen dabei eine Länge von 5-8 μm und einen größten Durchmesser von 1.5-3 μm . An weiteren Rissen auf der Polyglycolid-Oberfläche, die durch die Kristallbildung zu größeren Hohlräumen wurden, wachsen längliche, dünne hexagonale Kristallite von 3-10 μm Länge heraus, die mit ca. 1 μm Durchmesser sehr dünn erscheinen. Entgegen den Strukturmotiven, die für Hydroxylapatit gesehen und erwartet wurden (siehe Abb. 9.30), zeigen sich hier andere Morphologien. Diese können durch das Auskristallisieren der Calcit/Carbonatapatit-Aggregate oder durch Inhibitionseffekte des Zellnährmediums während der Konversion oder durch Auskristallisieren herrühren. Auch Kristallisation auf der Oberfläche des porösen Polyglycolids aus dem an Calciumphosphaten übersättigten Zellnährmedium ist eine Erklärungsmöglichkeit.

11. Konversion von Brushit in verschiedenen Medien

Während Synthesen bei hohen Temperaturen im allgemeinen zu hochkristallinen, einphasigen und homogenen Materialien führen, ist die heterogene Präzipitation wesentlich schwieriger zu kontrollieren (Vgl. Kap. 8.1). Diese Methoden erzeugen abhängig von einer hohen Fällungsgeschwindigkeit eine lokale Übersättigung. Die kristallographischen und chemischen Eigenschaften sind von den jeweils vorliegenden Bedingungen abhängig, so daß diese Eigenschaften sowohl von Experiment zu Experiment als auch von Experimentator zu Experimentator variieren können (vgl. Kap. 10.2.2, insbes. Abb. 10.8). Diese heterogenen Fällungsreaktionen können vermindert werden, wenn die Reagenzien in der Lösung langsam generiert werden. Eine solche homogene Fällung läßt sich durch die Hydrolyse von sauren Calciumphosphaten erreichen [De Maeyer et al. 93]. Durch die hohen Kristallinitäten, das vom HAP stark unterschiedliche Röntgenpulverdiffraktogramm und IR-Spektrum und die Reaktivität bezüglich Hydrolyse und Konversion zu thermodynamisch stabileren apatitischen Produkten eignet sich Brushit (DCPD , $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) sehr gut, um die Konversion in verschiedenen Medien zu carbonathaltigen apatitischen Produkten bzw. zu anderen in dieser Umgebung stabilen Calciumphosphaten zu beobachten. Biologische Medien, wie z.B. das menschliche Blutplasma enthalten $0.025 \text{ mol/l CO}_3^{2-}$. Durch Konversionsversuche in natriumcarbonathaltigen wäßrigen Medien und im proteinhaltigen Zellnährmedium α -MEM, welches denselben Carbonatgehalt aufweist [Eagle 76], sollten dabei Aussagen über die entstandene Phase, über Inhibitionseffekte, die Mechanismen der Carbonat-Inkorporation sowie kinetische und morphologische Daten gewonnen werden.

In einem pH-Bereich von 6.2 bis ca. 7.4 und bei Temperaturen zwischen 25 und 37°C hydrolysiert Brushit (DCPD) zu OCP. Bei höheren pH-Werten und/oder Temperaturen werden apatitische Produkte gebildet. Der Punkt, an dem sich die Löslichkeitsisothermen von HAP und DCPD kreuzen, liegt in niedrigeren pH-Bereichen als der Punkt, an dem sich die Löslichkeitsisothermen von DCPD und OCP kreuzen (siehe Abb. 3.2). Die Wachstumsrate für ist jedoch HAP zu niedrig, so daß OCP die kinetisch begünstigte Phase darstellt. Wird DCPD in Wasser eingebracht, so lösen sich Ca^{2+} - und PO_4^{3-} -Ionen im Verhältnis 1:1. Mit fortlaufender Auflösung wird diese Lösung bezüglich HAP übersättigt und dieses fällt aus. Die Auflösung von DCPD ist also inkongruent. Es wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, daß in wäßrigen Me-

dien Calcium-defizientes HAP entsteht [Brown & Martin 99]. Beobachtungen des Löslichkeitsverhaltens von DCPD bei verschiedenen pH-Werten deuteten darauf hin, daß bei pH-Werten von 6.5 oder höher gewöhnlich eine Kristallisation einer weiteren Phase einsetzte. Der pH-Wert sank und die Ca/P-Verhältnisse der Lösung sanken unter 1.0, was darauf hinweist, daß eine Phase mit einem Ca/P-Verhältnis höher als 1.0 gebildet wurde [Chhetry et al. 99].

Konversionsversuche von Brushitschichten auf Titanimplanten wurden in proteinfreiem *Hanks-Buffer* (*Hanks balanced salt solution, HBSS*, $4.16 \cdot 10^{-3}$ mol/l NaHCO_3 , 0.14 mol/l NaCl, $5.36 \cdot 10^{-3}$ mol/l KCl, $4.4 \cdot 10^{-4}$ mol/l KH_2PO_4 , $3.35 \cdot 10^{-4}$ mol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) durchgeführt. Dabei zeigte sich, daß sich in dieser wäßrigen Lösung innerhalb von 2 Stunden nanokristalliner Apatit gebildet hatte, welcher sich entweder wiederum auflöste oder zu kristallinen HAP konvertierte. Innerhalb von 24 h war die Konversion abgeschlossen [Kumar et al. 99].

11.1. Konversion in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung

Die Konversion von Brushit in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung ist als eine Möglichkeit beschrieben, definierte Carbonatapatite vom B-Typ zu erhalten. Die Transformation von einer Calciumphosphatphase in eine andere hängt dabei vom pH-Wert, der Temperatur und der Anwesenheit anderer Ionen neben Calcium und Phosphat ab [LeGeros 94]. Der offensichtlichste Effekt ist die Reduktion der Kristallinität des Apatites. Kristallinere carbonathaltige apatitische Produkte lassen sich durch Konversion oder Kristallisation bei 80-100°C erhalten. Weiterhin ist die Bildung von anderen Phasen, wie Calcit oder Aragonit von der Carbonat-Konzentration in der Mutterlauge abhängig. So entsteht beim Hydrolyseversuch von Brushit in einer 1 M Na_2CO_3 -Lösung auch Calcit (siehe Abb. 11.1).

Zur Durchführung der Konversionsversuche wurde eine Suspension von Brushit in Natriumcarbonat-Lösung hergestellt (1g in 100 ml) und bei 37°C gerührt. In definierten Zeitabständen wurden Proben entnommen, abfiltriert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und über Nacht im Trockenschrank bei 80°C getrocknet.

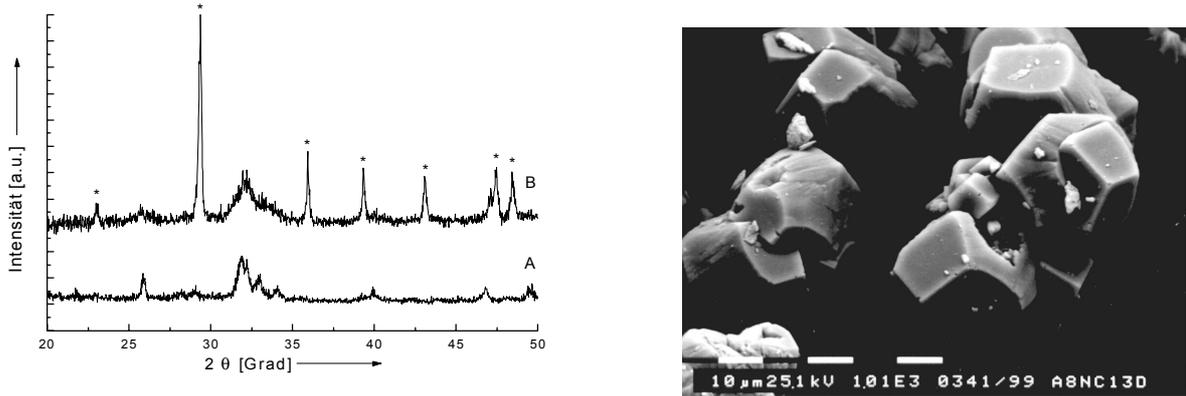


Abb. 11.1: Links: Röntgenpulverdiffraktogramme von A: synthetischem Hydroxylapatit und B: Brushit nach 13 Tagen in 1 M Na_2CO_3 -Lösung. Die intensiven Reflexe stammen vom entstandenen Calcit und sind mit Sternchen (*) bezeichnet. Rechts: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der entstandenen und mittels EDX identifizierten Calcit-Kristalle nach 13 Tagen in 1 M Na_2CO_3 -Lösung (Vergrößerung 1010 X).

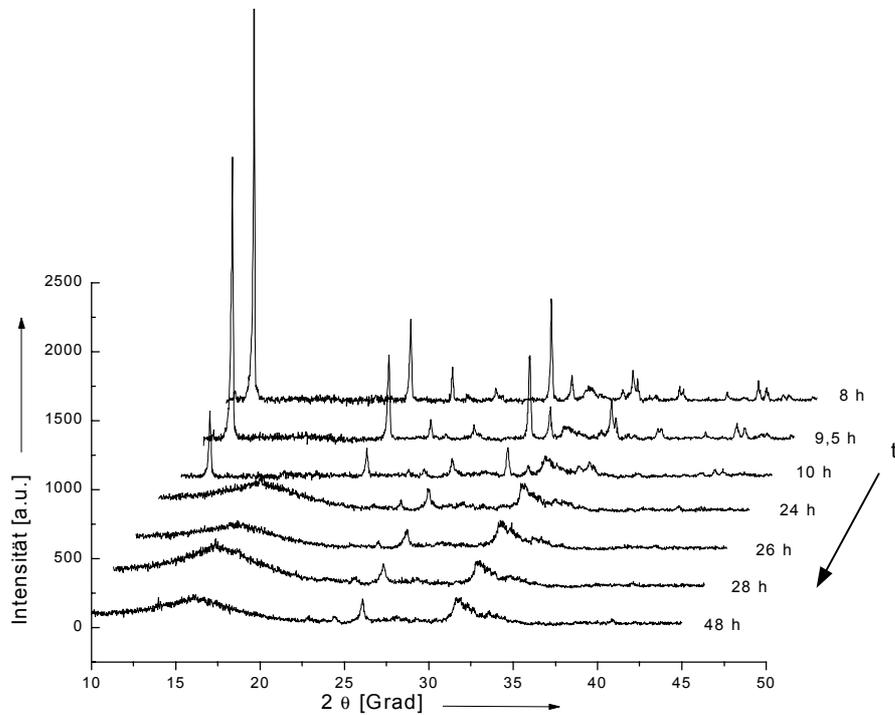


Abb. 11.2: Pseudo-3-dimensionale Darstellung der Röntgenpulverdiffraktogramme der Konversion von Brushit zu carbonathaltigem apatitischen Calciumphosphat in 0.025 M Na_2CO_3 -Lösung. Der amorphe Halo bei $10\text{-}20^\circ$ 2θ stammt vom Kunststoff-Probenträger, der aufgrund der geringen Probenmengen eingesetzt werden mußte.

Abb. 11.2 zeigt die Konversion von Brushit bei 37°C in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung (0.025 M). Die Konversion in die apatitische Form erscheint nach 24 Stunden abgeschlossen. Messungen mittels hochauflösender Röntgenbeugung am HASYLAB zeigen schon nach 12 Stunden kein Brushit mehr. Die hohe Kristallinität

ist einem schlechteren Signal zu Rausch-Verhältnis gewichen. Gleichzeitig sind Reflexe des Octacalciumphosphats (OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6$) erkennbar (Pfeile in Abb. 11.3). Durch die hohe strukturelle Ähnlichkeit des HAP und des OCP bilden diese Minerale miteinander stabile Schichtstrukturen. Dadurch sollen diese HAP/OCP-Gemische, welche bezüglich HAP metastabil sind, lange Zeit stabil bleiben [Brown et al. 82].

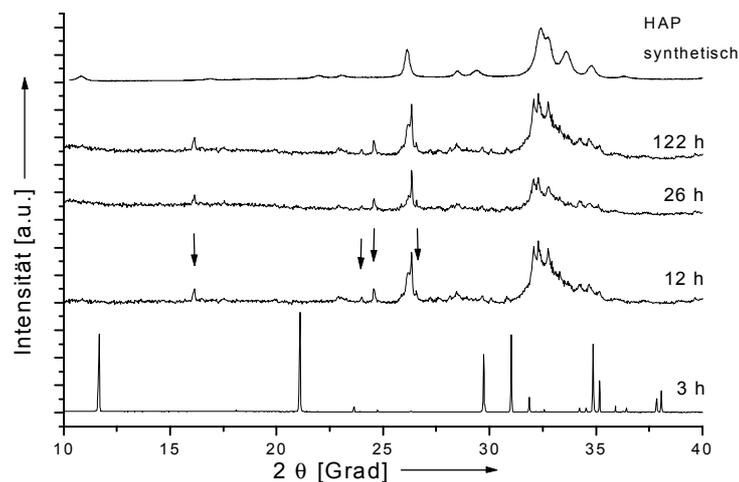


Abb. 11.3: Hochauflösende Röntgenpulverdiffraktogramme (Synchrotron) von Brushit mit den rechts angegebenen Zeiten inkubiert in 0.025 M Na_2CO_3 -Lösung. Als Vergleichssubstanz ist synthetisches HAP angefügt. Die Pfeile bezeichnen Reflexe des Octacalciumphosphats (OCP).

OCP ist als Intermediat bei der Hydrolyse von ACP und DCPD zu HAP bekannt, jedoch wird OCP durch Hydrolyse von DCPD im Bereich von pH 5.7 bis pH 7.0 hergestellt [LeGeros 85]. Der pH-Wert bei der Konversion von Brushit in Na_2CO_3 -Lösung verlief innerhalb von 12 Stunden von anfänglich 10.8 bis auf 8.0.

Betrachtet die IR-Spektren, so ist feststellbar, daß die ν_3 C-O Streckschwingungsbanden bei 1423 und 1493 cm^{-1} an Intensität zunehmen. Die Carbonataufnahme ist also auch nach 50 Stunden noch nicht beendet. Im Bereich zwischen 2 und 6 Stunden sind auch die beiden Banden bei 3546 und 3488 cm^{-1} , welche für O-H Streck-schwingungen von Kristallwasser charakteristisch sind (vgl. Abb. 3.4 und Tab. 3.3), nicht mehr erkennbar. Auch die Doppelbande der H-O-H Bindungsschwingung bei 1649 cm^{-1} nimmt an Schärfe ab. Die Tatsache der Carbonataufnahme nach Konversion zu einem apatitischen Produkt zeigt, daß zunächst ein nanokristallines apatit-sches Produkt oder ein ACP gebildet wird, welches dann über OCP zu einem Carbonatapatit hydrolysiert.

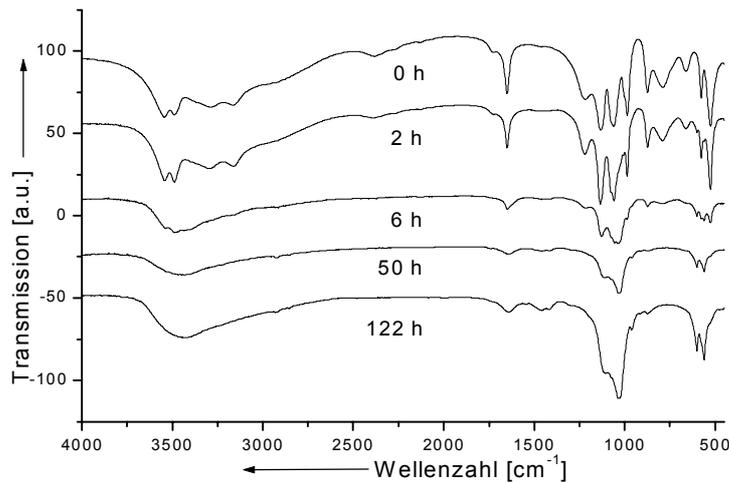


Abb. 11.4: Infrarot-Spektren der Konversion von Brushit zu einem carbonathaltigen apatitischen Produkt in 0.025M Na_2CO_3 -Lösung.

Konversionsversuche von amorphen Calciumphosphaten zu carbonathaltigen apatitischen Produkten in carbonathaltigen Lösungen wurden bereits in den frühen siebziger Jahren unternommen. Dabei zeigte sich, daß während der Konversion sowohl das molare Ca/P-Verhältnis als auch der Carbonatgehalt gering, aber meßbar zunahm. Weiterhin wurde ein Sinken der Anzahl von HPO_4^{2-} -Gruppen festgestellt.

Die TG-DTA-MS-Diagramme der verschiedenen konvertierten Brushite in physiologischer Na_2CO_3 -Lösung bei 37°C zeigen nach erfolgter oder begonnener Konversion sowohl steigenden Carbonatgehalt als auch variablen Wassergehalt. Brushit enthält, wie auch in den Infrarot-Spektren erkennbar ist, sowohl Kristallwasser als auch okkludiertes (zwischen den einzelnen Partikeln gebundenes) Wasser. Eine weitere Wasserabgabe läßt sich mit der Reaktionsgleichung:



als endotherme Bildung von Pyrophosphat aus den aciden Hydrogenphosphat-Gruppen des Brushits erklären. Diese Wassergehalte lassen sich in der TG-DTA-MS-Messung durch die unterschiedlichen Verdampfungstemperaturen unterscheiden. Zwischen 100 und 250°C in Verbindung mit einem endothermen DTA-Signal (1.) und einem intensiven Wasserpeak im Massenspektrum ist das okkludierte bzw. das Kristallwasser erkennbar. Zwischen 380 und 480°C erfolgt ein weiterer Wasserabgang, der wiederum mit einem endothermen DTA-Signal verbunden ist (2).

Dieser zweistufige Mechanismus und die Mengen an, an Kristallwasser und an sauren Hydrogenphosphat-Gruppen werden im Folgenden noch näher untersucht. Dabei seien der Wassergehalt der ersten Stufe als *Kristallwasser* und das Wasser, welches aus der Reaktion der Hydrogenphosphat-Gruppen entstanden ist, als *Reaktionswasser* bezeichnet.

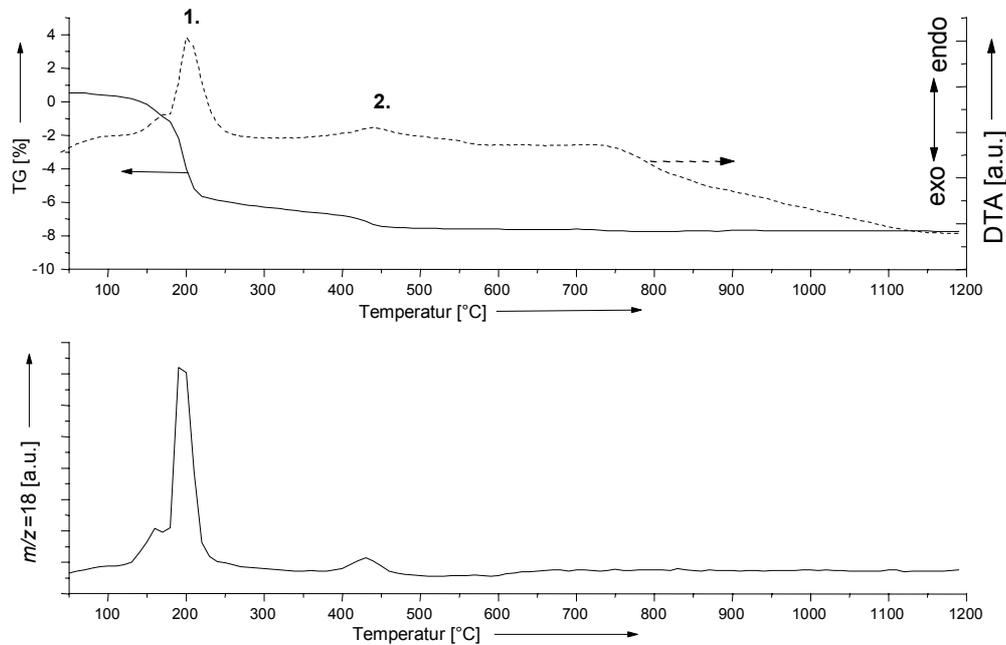


Abb. 11.5: TG-DTA-MS-Diagramm von Brushit nach 2 Stunden in 0,025M Na_2CO_3 -Lösung bei 37°C.

In Abbildung 11.4 ist die Menge des Kristallwassers gegen die Konversionszeit aufgetragen. Zum Zeitpunkt $t=0$ ist hier Brushit aufgeführt. Es zeigt sich, daß mit fortschreitender Konversion die Menge an Kristallwasser abnimmt. Diese Zu- und Abnahmen der Wassermengen erfolgen dabei in drei Phasen:

Zunächst ist nach zweistündiger Konversion ein Ansteigen des Wasser-Gehaltes erkennbar. Nach dem unmittelbaren Beginn der Konversion entstehen in einer ersten Phase durch einen Auflösungs-Rekristallisations-Mechanismus größere Mengen von amorphen Calciumphosphaten oder nanokristallinen, apatitischen Vorprodukten. Durch die geringe Kristallinität, die damit kleiner werdenden Partikelgrößen und die dadurch steigende Oberfläche ist die Wasserokklusion stark begünstigt [Misra 86]. Diese geringer und später wieder größer werdende Partikelgröße war auch optisch erkennbar.

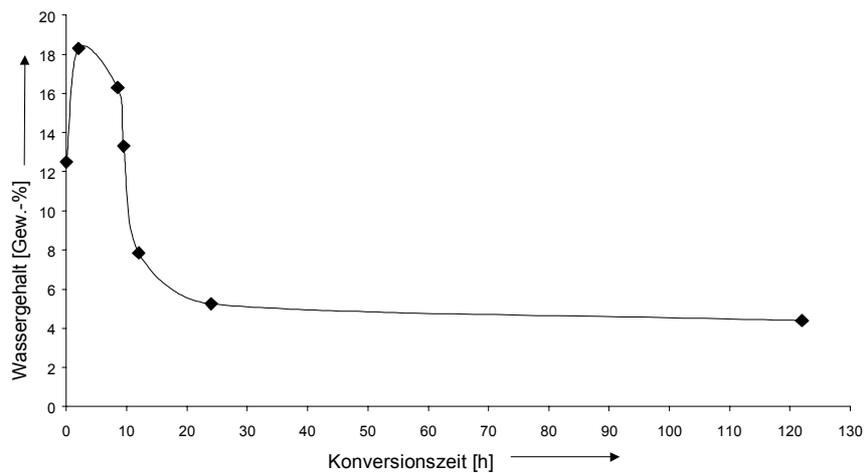


Abb. 11.6: Auftragung der Menge des Kristallwassers gegen die Konversionszeit bei der Konversion von Brushit in 0,025M Na_2CO_3 -Lösung bei 37°C .

Dadurch erfolgt in der ersten Phase eine schnelle und große Wasseraufnahme, die Menge des Kristallwassers steigt von 12,5 % bei reinem Brushit auf über 18 % nach 2 Stunden Konversionszeit in physiologischer Carbonat-Lösung an. In einer zweiten Phase erfolgt ein langsames Sinken dieses Wassergehalts auf ca. 5% innerhalb der nächsten 22 Stunden. Innerhalb dieser zweiten Phase erfolgt die gleichzeitige Konversion von Brushit zu nanokristallinem Apatit und die Reifung von apatitischen Nanokristallen zu größeren Verbänden. Demgemäß sinkt der Kristallwassergehalt mit dem Anteil an Brushit. Durch die nun nicht mehr in so großer Anzahl vorhandenen Mikropartikel wird außerdem die Okklusion mit zunehmender Konversionsdauer verhindert. Zusammenfallend mit dem in den Röntgenbeugungsmessungen gesehenden „Ende“ der Konversion sinkt im folgenden Zeitraum in der dritten Phase der Wassergehalt wesentlich langsamer. Die apatitischen Vorprodukte haben nun stabile mikrokristalline Aggregate gebildet; die Reifung hin zu größeren Kristalliten geht nun langsamer vonstatten [Boskey & Posner 73]. Dadurch bleiben kleinere Mengen Oberflächenwasser lange Zeit in gleichem Maße vorhanden. Wie in den hochauflösenden Röntgenpulverdiffraktogrammen gesehen, verbleibt ein kleiner Anteil OCP im Kristallverband. Dieses Kristallwasser und das Oberflächenwasser lassen sich nicht auseinanderhalten.

Thermisch verschieben sich die DTA-Signale bzw. der Beginn der Wasserabgabe des Kristallwassers, sichtbar an den TG-Stufen, von $190\text{-}210^\circ\text{C}$ am Anfang der Konversion (2-8 h) bis hin zu ca. $95\text{-}100^\circ\text{C}$ gegen Ende der Konversion (600 h). Dies

unterstreicht die Annahme, daß kaum noch Wasser in einen stabilen Kristallverband eingelagert ist. Ein ähnliches Bild bietet der Anteil des Reaktionswassers. Nach dem Ende der Konversion zum apatitischen Endprodukt nach ca. 24 Stunden ist dieser Gehalt auf ca. 1,5 Gew.-% abgesunken und verbleibt nahezu auf diesem Wert (Abb. 11.5). Thermisch steigt die Reaktionstemperatur mit der Konversionsdauer an (433°C bei Brushit, 490-500 °C nach 24 h Konversion).

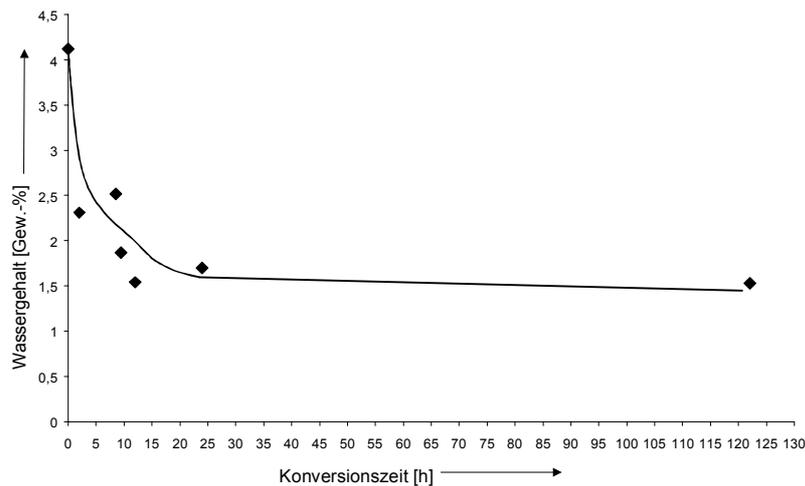


Abb. 11.7: Anteil des Reaktionswassers aus den TG-DTA-MS-Messungen der konvertierten Brushit-Proben

Nach längerer Konversionsdauer zeigt sich im Bereich zwischen 600 und 750°C ein weiterer endothermer Massenverlust, der durch die Massenspektren mit einem CO₂-Verlust in Verbindung gebracht werden kann (Abb. 11.6). Wie schon in den Infrarot-Spektren gesehen, erfolgt die Carbonataufnahme erst nach erfolgter Konversion zu einem apatitischen Calciumphosphat.

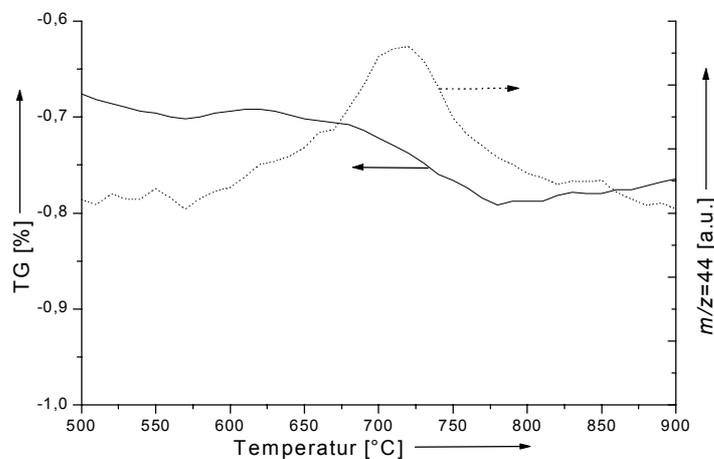


Abb. 11.8: Ausschnitt aus einer TG-Messung eines nach 24 Stunden in 0,025M Na₂CO₃-Lösung konvertierten Brushits zusammen mit dem MS-Signal $m/z=44$ (CO₂).

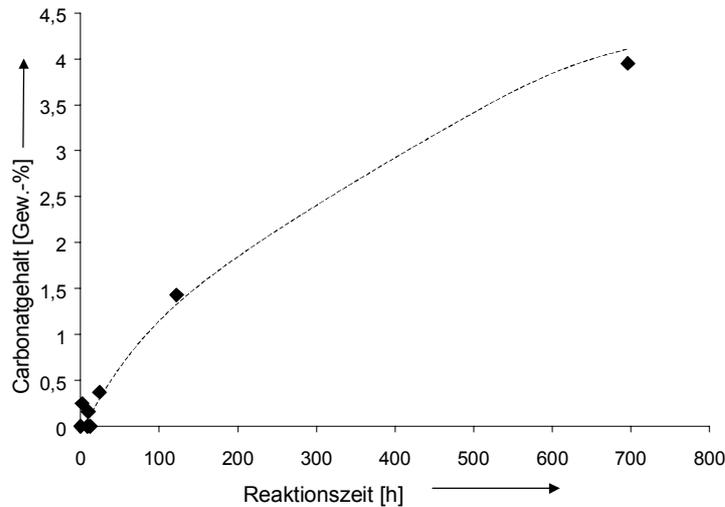


Abb. 11.9: Carbonatgehalt der in Natriumcarbonat-Lösung konvertierten Calciumphosphate.

Erst nach 24 Stunden Konversionszeit lassen sich meßbare Mengen Carbonat in dem apatitischen Festkörper ausmachen (0,37 Gew.-%). Nach 122 Stunden Konversionszeit ist dieser Anteil auf ca. 1,5 % gestiegen und auch danach erfolgt immer noch eine weiterer Einbau von Carbonat. Dies deutet, wie auch schon in den Infrarot-Spektren gesehen, darauf hin, daß zunächst ein ACP gebildet wurde, welches nach bekannten Lösungs-Rekristallisations-Mechanismen zu einem carbonathaltigen apatitischen Calciumphosphat kristallisiert.

Die Hydrolyse von ACPs in carbonathaltigen Lösungen wurde bereits in den frühen 70er Jahren untersucht. Dabei zeigte sich ein dramatischer Abfall der durch pyrolytische Methoden bestimmte Hydrogenphosphat-Gehalt nach obiger Reaktionsgleichung. Wie im Kapitel 7 ausgeführt, kann der Carbonatgehalt innerhalb dieser apatitischen Calciumphosphate gemäß den Reaktionsgleichungen [7.2] bis [7.4] die Bestimmung der aciden HPO_4^{2-} -Gruppen stören [Greenfield et al. 74]. Eine quantitative Aussage über den Hydrogenphosphat-Gehalt ist demnach durch eine Quantifizierung der Pyrophosphat-Gehalte im Endprodukt nach dem Erhitzen der konvertierten apatitischen Produkte ungenau.

Da jedoch bei jedem dieser Reaktionen von Hydrogenphosphat ein Moläquivalent Wasser frei wird, ist es möglich, den Anteil saurer Hydrogenphosphat-Gruppen durch thermogravimetrische Messungen zu bestimmen.

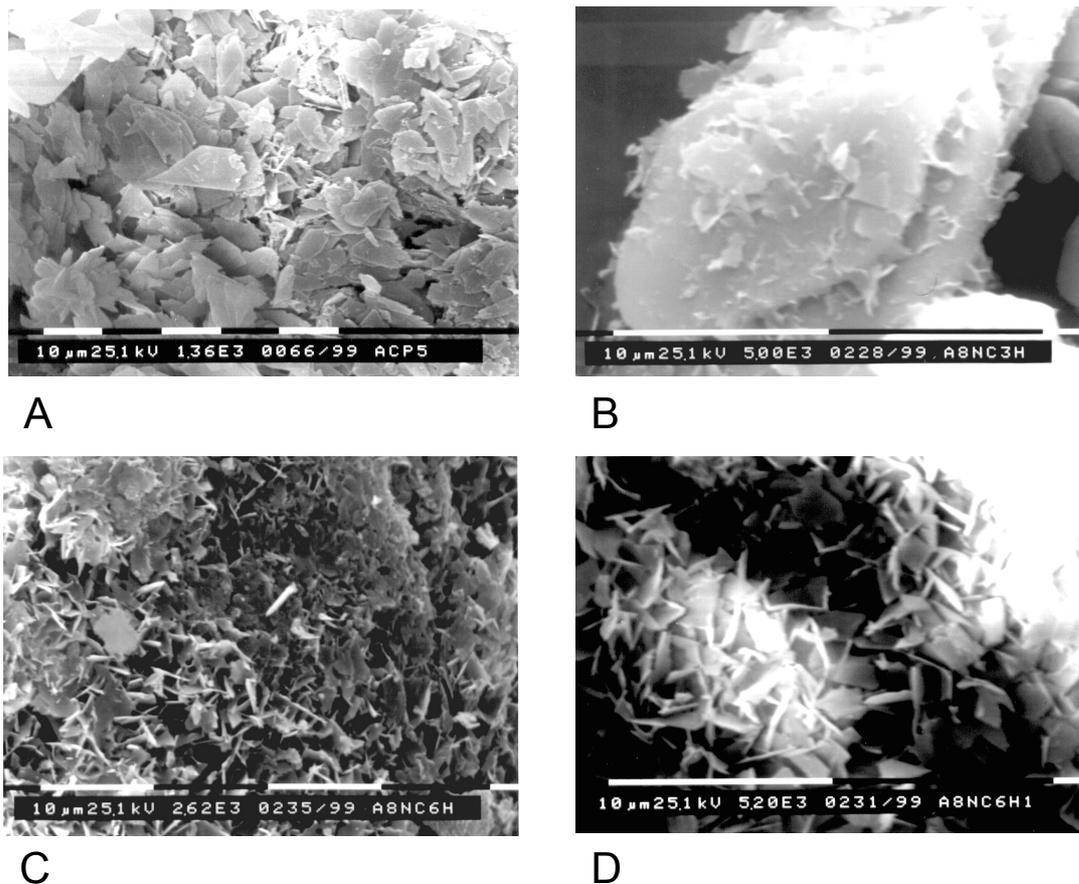


Abb. 11.10: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Konversionsprodukte in physiologischer Carbonat-Lösung. A: Brushit (Vergrößerung 1360X), B: Brushit nach 3 Stunden in Carbonat-Lösung (5000X), C: Nach 6 Stunden (2620X), D: Nach 6 Stunden, Nahaufnahme (5200X).

Im Rasterelektronenmikroskop erkennt man deutlich die rautenförmig-blättrige Struktur des Brushits mit Kristallen von ca. 3-10 µm Querschnitt (Abb. 11.10 A). Nach drei Stunden Inkubation in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung sind auf der Oberfläche einzelner Brushit-Kristalle erste Veränderungen erkennbar (B). Die Oberfläche des Brushits erscheint nicht mehr scharf abgegrenzt, sondern durch Auflösungsphänomene eher abgerundet. Kleine Keimkristalle mit einer Ausdehnung von 0.5-1 µm sind entstanden. Diese Kristalle wachsen auf Kosten der DCPD-Kristalle und bilden ihrerseits wiederum blättrige, regelmäßige HAP/OCP-Kristalle von 1.5-3 µm Ausdehnung. Diese Kristalle erscheinen ebenfalls scharfkantig. Die Wachstumsrichtung folgt keiner regelmäßigen Orientierung (C, D).

Die Bestimmung des Ca/P-Verhältnisses mittels Photometrie und AAS zeigt ebenfalls einen schnellen Verlauf der Konversion. Auch nach 696 Stunden scheint jedoch die Konversion nicht abgeschlossen.

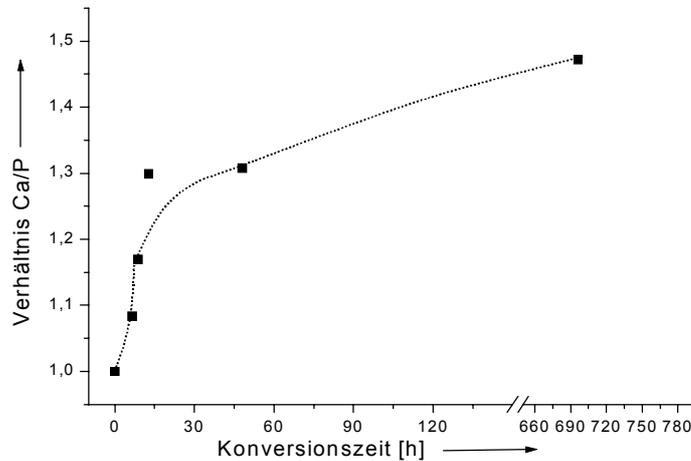


Abb. 11.11: Stöchiometrisches Ca/P-Verhältnis, bestimmt durch Photometrie und AAS aus den Konversionsprodukten in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung

Mit steigender Konversionszeit nähert sich das Ca/P-Verhältnis immer noch dem stöchiometrischen HAP-Verhältnis von 1.67 an. Werden ACPs konvertiert, die niedrige Ca/P-Verhältnisse aufweisen, so steigt der Phosphatgehalt in der Reaktionslösung an [Blumenthal et al. 81]. Ebenso muß der Phosphat-Gehalt der Carbonat-Lösung in diesem Fall ansteigen. Durch den vorliegenden Defektapatit, den nach wie vor vorhandenen OCP-Gehalt ($\text{Ca/P}=1.33$), den Anteil an sauren Hydrogenphosphat-Gruppen und die Carbonat-Inklusion, die ebenfalls Abweichungen von der Idealstruktur verursacht und die immer noch nicht abgeschlossen ist, unterliegt die Struktur weiterhin dynamischen Veränderungen.

11.2 Konversion in Zellnährmedium

Um mehr über die Inhibitoraktivität des Zellnährmediums zu erfahren (siehe Kapitel 10.2.4), wurden unter sterilen Bedingungen Konversionsversuche von Brushit in α -MEM mit und ohne FKS durchgeführt. Konversionsversuche von ACP in Tris-gepufferten Medium, in Albumin und in Serum (bovin und Pferdeserum) unter Beobachtung des *splitting factors* (siehe Kapitel 3.3.3) zeigten, daß die Konversion in serumhaltigen Medien wesentlich langsamer voran geht. Außerdem sinkt das Aus-

maß der Aufspaltung der Infrarot-Banden in der Reihe wäßriger Puffer>Albumin>Serum. Das deutet auf eine starke Adsorption der Seren und der Serumproteine auf den Calciumphosphat-Oberflächen hin. Mit steigendem Carbonatgehalt sinkt ebenfalls der Aufspaltungsfaktor.

Die Vorgehensweise richtete sich dabei streng nach den Vorgaben, die auch für Zellaufwuchsversuche einzuhalten sind. Jeweils 100 mg DCPD wurden in ein Well gefüllt und innerhalb von 5 min mit Ethanol sterilisiert. Daraufhin wurden die sterilen Brushitproben mit jeweils 4 ml α -MEM überschichtet, verschlossen und in dem auf 37°C temperierten Brutschrank mit 2% CO₂-Atmosphäre inkubiert. Täglich wurde jeweils eine Probe aus der serumhaltigen und serumfreien Versuchsreihe entnommen, mit Ethanol und Wasser gespült und mittels Lichtmikroskopie, Infrarot-Spektroskopie und Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Außerdem wurde der pH-Wert des Mediums gemessen. Genauso wie in den Konversionsversuchen von Carbonat-ACP wurde auch jeweils eine Probengefäß des *six-wells* nur mit Medium, ohne Calciumphosphat als Blindprobe gleichermaßen behandelt. Die pH-Werte sollten über den Fortschritt der Konversion Aufschluß geben. Der im Medium befindliche Indikator Phenolrot zeigte ebenfalls an, inwieweit acide Produkte die Pufferwirkung des Mediums senken. Die pH-Werte der Brushitproben in α -MEM ohne Serum sanken schneller und in niedrigere Regionen. Im Gegensatz zu den Versuchen im serumhaltigen Medium, wo der tiefste pH-Wert-Punkt nach 216 Stunden (pH 6.2) erreicht war, sank der pH-Wert im serumfreien Zellnährmedium bereits nach 81 Stunden auf pH 6.0.

Reaktionszeit [Stunden]	25	81	120	144	174	192	216	270	289	312
pH α -MEM mit Serum	7.92	7.72	6.94	7.00	6.52	6.32	6.29	7.10	7.70	7.46
pH α -MEM ohne Serum	7.27	6.09	5.97	6.37	6.47	6.38	6.55	7.46	7.70	7.54

Tabelle 11.1: pH-Werte der Brushit-Konversion in Zellnährmedien. Medienwechsel erfolgten nach 120 und 216 Stunden.

Bei beiden Medien konnte erst nach ca. 300 Stunden ein physiologischer pH-Wert erreicht werden. Der Blindwert verlief dagegen während der gesamten Zeit im physiologischen Bereich.

Optisch und lichtmikroskopisch konnten folgende Beobachtungen gemacht werden: Nach Beginn der Konversion sank die Größe der anfänglich großen und daher leicht filterbaren Kristalle (siehe Abb. 11.10 A) parallel mit den pH-Werten und der Gelb-

färbung des Mediums durch den niedrigeren pH-Wert. Diejenigen Proben, bei denen die Konversion stärker vorangeschritten war, waren wegen der zunehmenden Feinheit des Pulvers weit schwieriger zu behandeln. War die Konversion von Brushit zu einem nanokristallinen Calciumphosphat weitgehend abgeschlossen, so wuchs die Größe der Aggregate langsam wieder an und die Pulver waren wieder einfacher wasch- und filtrierbar.

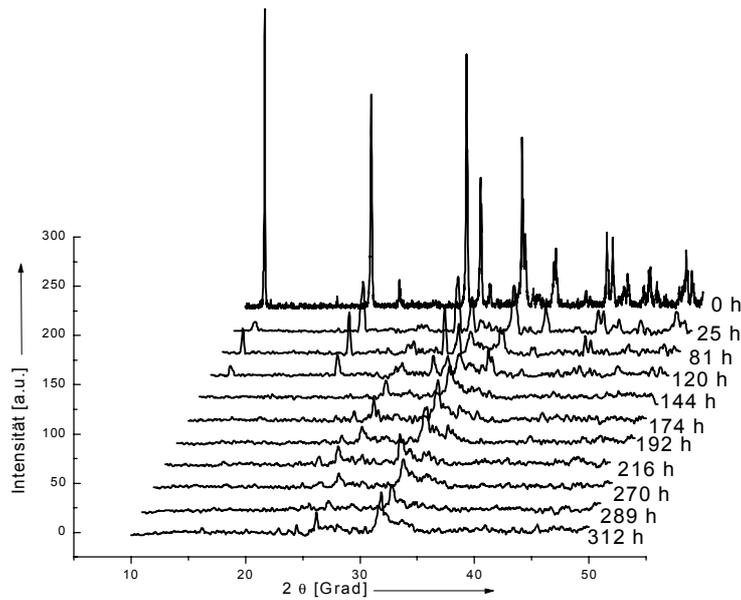


Abb. 11.12: Pseudo-3-dimensionale Darstellung der Konversion von Brushit in α -MEM ohne FKS.

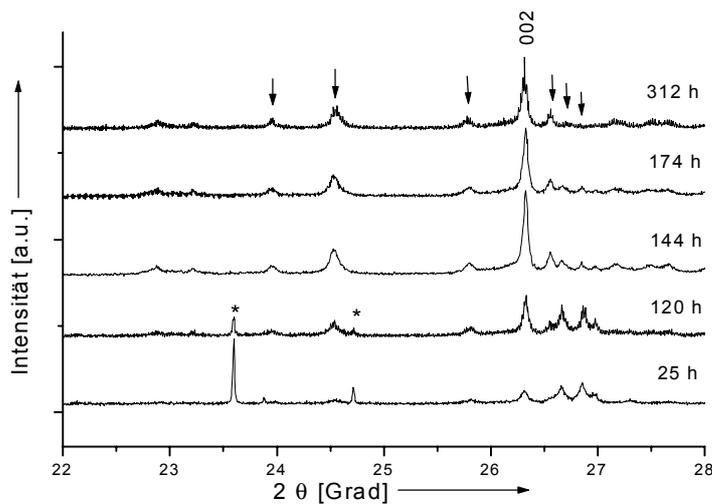


Abb. 11.13: Hochauflösende Röntgenbeugung der Konversionsprodukte von Brushit in α -MEM ohne FKS. Mit Sternchen (*) sind Brushit-Reflexe bezeichnet, mit den Pfeilen sind OCP-Reflexe markiert.

Aus Abb. 11.9. ist ersichtlich, daß die Konversion von Brushit in α -MEM ohne Serum erst nach ungefähr 144 Stunden abgeschlossen ist. Die Inhaltsstoffe des Zellnährmediums üben also eindeutig einen inhibierenden Effekt aus.

Hochauflösende Röntgenbeugung am HASYLAB zeigte, daß kein HAP, sondern OCP entstanden ist (Abb. 11.13). Im Gegensatz zu den Konversionsversuchen von DCPD in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung, bei denen in den hochauflösenden Röntgenpulverdiffraktogrammen neben viel HAP auch OCP gefunden wurde, sind hier keine Spuren eines apatitischen Calciumphosphats zu erkennen.

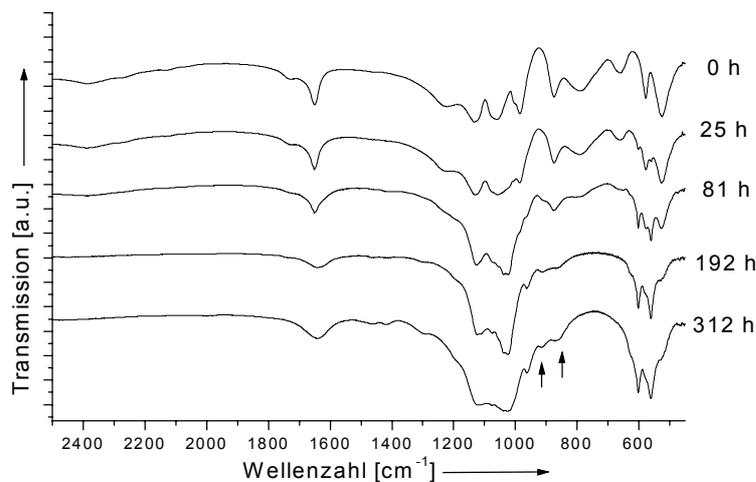
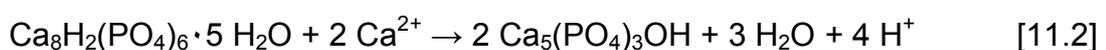


Abb. 11.14: Infrarot-Spektren der Konversionsprodukte von Brushit in serumfreiem Medium. Die Pfeile bezeichnen die für OCP charakteristischen Banden bei 865 und 910 cm^{-1} .

Die Infrarot-Spektren geben ebenfalls Auskunft über die Anwesenheit von OCP. Die Banden bei 865 und 910 cm^{-1} (Pfeile in Abb. 11.11) sind charakteristisch für OCP [Fowler et al. 66]. Obwohl durch Röntgenpulverdiffraktometrie OCP nach 81 h bereits erkennbar ist, sind in den IR-Spektren keine Banden zu erkennen. Offensichtlich erfolgte auch nach der Konversion in weiterem Verlauf keine Aufnahme von Carbonationen in das Kristallgitter.

OCP läßt sich durch Hydrolyse aus DCPD in pH-Bereichen zwischen 5 und 7 herstellen. Steigt der pH zu hoch, so entsteht als zweite Phase auch HAP [Elliott 94]. OCP hydrolysiert außerdem, abhängig von der Verfügbarkeit von Calcium-Ionen, u.a. nach folgender Formel zu HAP [Elliott 94]:



Diese Hydrolyse von OCP zu HAP wird beispielsweise durch die Anwesenheit von Magnesium inhibiert [LeGeros 94]. In diesem Fall sind sowohl Calcium als auch Magnesium als auch eine große Menge anderer bekannter Inhibitoren in dem Zellnährmedium vorhanden (siehe Anhang). OCP stellt im physiologischen pH-Bereich aber die stabile Calciumphosphatstruktur dar [Newesely 67]. Eine weitere Versuchsreihe, bei der untersucht wurde, ob OCP innerhalb längerer Zeiträume zu einem apatitischen Produkt hydrolysiert, führte zu der Schlußfolgerung, daß OCP in diesem Medium die stabilere Phase darstellt.

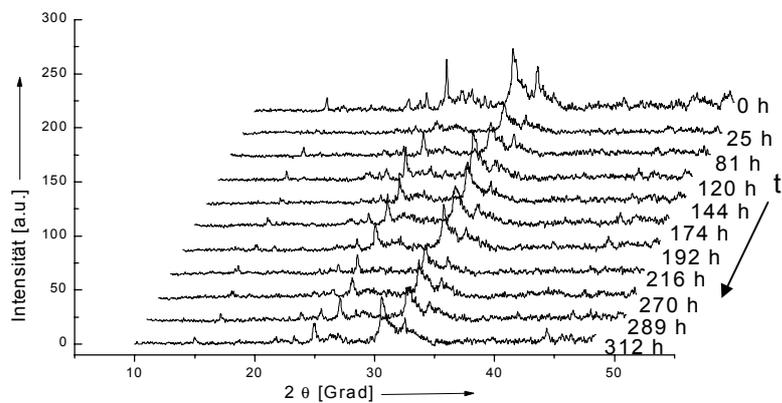


Abb. 11.15: Pseudo-3-dimensionale Darstellung der Konversionsversuche von OCP in α -MEM ohne Serum (Laborgerätemessung).

Spezifischer Röntgenbeugungsreflexe wurden integriert und auf den intensivsten Reflex normiert. Dies macht es möglich, Umsatzkurven zu erstellen (Abb. 11.16).

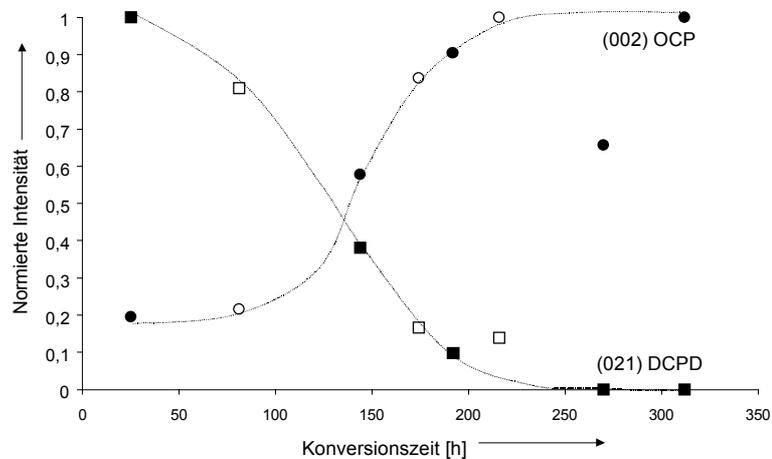


Abb. 11.16: Konversion von Brushit in serumhaltigen Zellnährmedium. Normierte integrale Intensitäten aus den HASYLAB-Daten des 021-Reflexes von Brushit (■) und des Laborgeräts (□). Der Anstieg der Intensität des 002-Reflexes von OCP ist sowohl in den HASYLAB-Daten (●) als auch im Laborgerät (○) deutlich erkennbar.

Dabei zeigt sich, daß im serumhaltigen Zellnährmedium die Konversion nach ca. 270 Stunden abgeschlossen ist. Auch in MEM mit FKS entsteht ausschließlich OCP (Abb. 11.17).

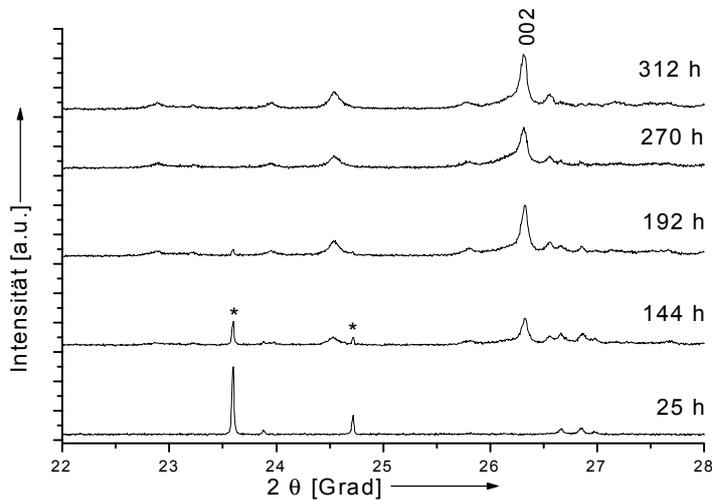


Abb. 11.17: Hochauflösende Röntgenpulverdiffraktogramme der Konversionsproben in serumhaltigen Zellnährmedium. Mit Sternchen (*) bezeichnete Reflexe sind Brushit-Reflexe. Der (002)-Reflex des OCP ist hervorgehoben.

IR-spektroskopisch zeigen sich dieselben Phänomene wie bei der Konversion im serumfreien Medium. Thermisch sind in beiden Konversionsprodukten keine Carbonatspuren nachweisbar. Der Kristallwassergehalt sinkt ähnlich wie bei den Konversionsprodukten in Na_2CO_3 von anfänglich 12% auf 2-3%. Der Anteil des Reaktionswassers verbleibt dagegen auf ca. 6% (Messung von reinem OCP zeigt ca. 3%). Die Temperatur des Beginns der Reaktionswasserabgabe sinkt von ca. 350°C bei reinem Brushit auf ca. 200°C bei den Konversionsprodukten im Zellnährmedium, was der Reaktionstemperatur bei reinem OCP entspricht [Newesely 67].

Ein Vergleich der durchschnittlichen Kristallitgrößen, mittels der Scherrer-Gleichung aus den (002)-Reflexen der Konversionsprodukte errechnet, zeigt erwartungsgemäß eine geringere Kristallitgröße des HAP/OCP-Gemischs aus der Konversion in Natriumcarbonat-Lösung. Dafür können die Ursachen einerseits in der höheren Reaktionsgeschwindigkeit, andererseits auch im Entstehen einer HAP/OCP-Mischphase gesehen werden, die mit nanokristallinen apatitischen Produkten einher geht.

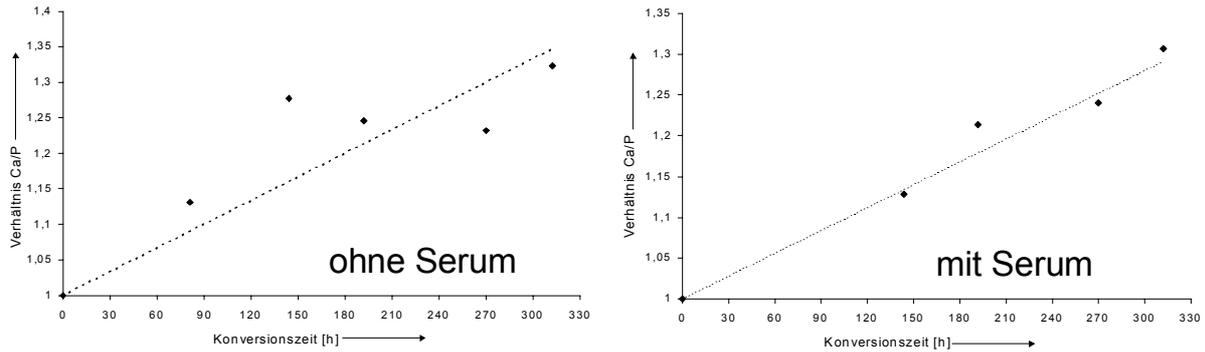
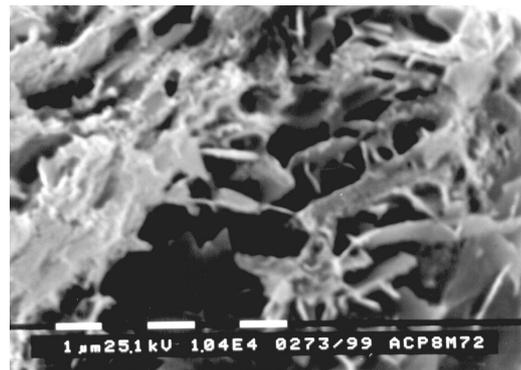


Abb. 11.18: Stöchiometrisches Ca/P-Verhältnis aus AAS- und Photometrie-Messungen der Konversionsprodukte in serumfreien und serumhaltigen Zellnährmedium.

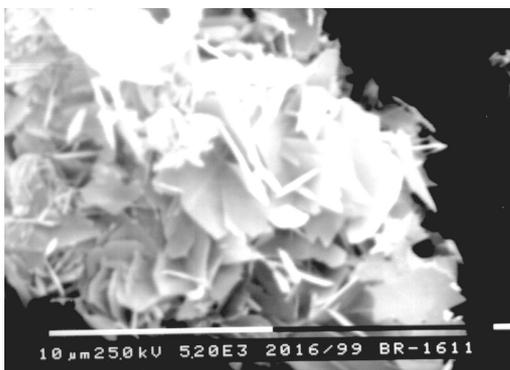
Die stöchiometrischen Ca/P-Verhältnisse, berechnet aus Photometrie-Werten und aus AAS-Messungen zeigen einen eher linearen Verlauf von Ca/P=1 für Brushit zu Ca/P=1.33 für OCP. Dabei zeigt sich wiederum die niedrigere Konversionsgeschwindigkeit des Brushits in α -MEM mit FKS. Die Steigung der linearen Regressionsgerade beträgt hier $9 \cdot 10^{-4}$ im Gegensatz zu $1.1 \cdot 10^{-3}$ im Zellnährmedium ohne FKS.



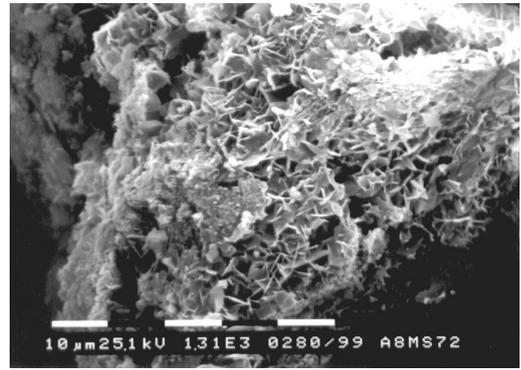
A



B



C



D

Abb. 11.19: REM-Aufnahmen der Konversionsprodukte in α -MEM. A: Ohne Serum nach 72 h (Vergrößerung 1310X); B: Nahaufnahme von A (10400X); C: Nach 312 h ohne Serum (5200X); D: Im serumhaltigen Medium nach 72 h (1310X).

Die stöchiometrischen Verhältnisse nähern sich letztendlich an die des OCP an. Die Fehlerhaftigkeit dieser Messungen erlaubt es jedoch nicht, stöchiometrisch einwandfreie Werte zu wiederzugeben. Vielmehr sollen diese Messungen nur einen Anhaltspunkt über das Geschehen vermitteln.

In den REM-Aufnahmen lassen sich schon nach 72 Stunden Konversionszeit regelmäßig geformte Kristallite des OCP erkennen. Runde, dünne, blättchenförmige Kristallite erscheinen verwoben neben unstrukturierten Brushit-Partikeln. Die Größe dieser Partikel bleibt auch nach 312 Stunden mit 5-10 μm nahezu konstant.

Im serumhaltigen Medium lassen sich optisch keine Unterschiede in Größe und Habitus der Kristallite ausmachen. Die nach 72 Stunden geringer fortgeschrittene Konversion läßt sich durch die größere Anzahl unstrukturierter Partikel, aus der die OCP-Kristalle herauswachsen, erkennen.

Die optisch im Vergleich mit den Konversionsprodukten in Natriumcarbonat-Lösung größer und regelmäßiger erscheinenden Kristalle lassen sich auch durch die durchschnittlichen Kristallitgrößen bestätigen. Diese wurden über die Halbwertsbreiten der (002)-Reflexe der Kristalle mittels der Scherrer-Gleichung (Gleichung 5.1) errechnet (Tabelle 11.1).

Die in den Zellenmedien konvertierten Kristalle sind im Vergleich weit größer und regelmäßiger. Auffällig ist jedoch die geringere Größe im serumhaltigen Medium. Obwohl die Wachstumsgeschwindigkeit geringer ist und damit größere und regelmäßige Kristalle entstehen sollten, sind diese im Vergleich mit dem serumfreien Medium kleiner. Beide Konversionsvorgänge wurden zur gleichen Zeit unterbrochen, laut Röntgenbeugung und IR-Messungen war die Konversion in beiden Fällen abgeschlossen. Jedoch hatten die Kristallite im serumfreien Medium nach schon nach 144 Stunden abgeschlossener Konversion einen größeren Zeitraum zur Verfügung, um im Sinne der Ostwald-Regel zu größeren und regelmäßigeren Kristalliten zu reifen.

<i>Medium</i>	<i>Ende Konversion [h]</i>	<i>Ca/P-Verhältnis¹</i>	<i>Durchschnittliche Kristallitgröße [Å]</i>
0.025 M Na ₂ CO ₃	24	1.47 (696)	511
α -MEM ohne FKS	144	1.32 (312)	1689
α -MEM mit FKS	270	1.31 (312)	1402

Tabelle 11.2: Vergleichende Zusammenfassung der Brushit-Konversion in Natriumcarbonat-Lösung und im Zellenmedium α -MEM. ¹ Das hier angegebene stöchiometrische Ca/P-Verhältnis entspricht der Messung nach der in Klammern angegebenen Konversionszeit.

Durch die unterschiedlichen Röntgenpulverdiffraktogramme und die hohe Kristallinität des Brushits liegt es nahe, auch die inhibierende Wirkung des Polyglycolids zu beobachten. Dazu wurden poröse Komposittabletten aus 100 mg Brushit und 200 mg mit NaCl beladenem Polyglycolid (ergibt nach dem Auswaschen 100 mg poröses PGA) hergestellt, das NaCl ausgewaschen und das Komposit in 200 ml 0.025 molarer Na_2CO_3 -Lösung bei 37°C inkubiert. Der pH-Wert verlief während der ganzen Konversionszeit zwischen 8.5 und 9.0.

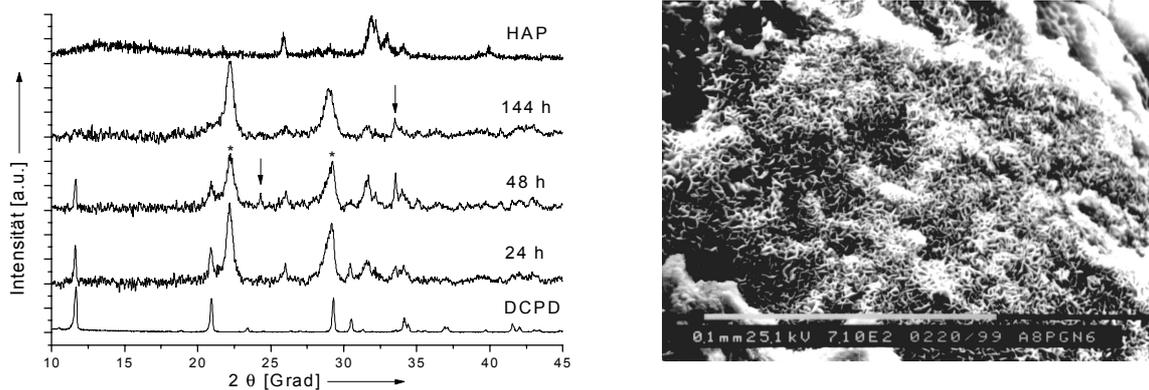


Abb. 11.20: Konversion von Brushit im 1:1-Gemisch mit porösem Polyglycolid. Links: Röntgenbeugungsmessungen. Mit Sternchen (*) sind die PGA-Reflexe markiert. Charakteristische OCP-Reflexe sind mit Pfeilen markiert.

Deutlich ist in den Röntgenpulverdiffraktogrammen in Abbildung 11.20 links erkennbar, daß die Umkristallisation stark verzögert abläuft. Erst nach 144 Stunden sind keine Brushit-Reflexe mehr erkennbar. Wiederum entstand OCP. Unter dem Rasterelektronenmikroskop erkennt man ein regelmäßiges Wachstum runder blättchenförmiger Kristallite aus der PGA-Oberfläche heraus. Vorzugsweise sind diese senkrecht zur Tablettenoberfläche orientiert. Die weit geringere Kristallisationsgeschwindigkeit führte zu einem sehr regelmäßigen und gleichförmigen Kristallwachstum.

12. Zusammenfassung und Ausblick

Die moderne Ära der Untersuchung von Biomineralisationsvorgängen begann in den dreißiger Jahren, in denen Methoden wie die Röntgenbeugung eingeführt wurden. Verbesserte optische Mikroskope und histologische Techniken eröffneten einen besseren Zugang zu den Zellen und zum Gewebe [Lowenstam & Weiner 89].

Neuartige Methoden zur Untersuchung von mineralischen Ablagerungen in lebendem Gewebe, wie sie hier eingesetzt wurden, eröffnen einen noch tieferen Einblick bis in atomare Dimensionen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst Beispiele aus der belebten Natur untersucht, indem unter anderem mit ausgefeilten Methoden der Synchrotron-Strahlung Informationen bezüglich Zusammensetzung, Kristallinität und Calciumphosphat-Phase verschiedener Proben gewonnen wurden. Hierbei wurden zwei Beispiele für Biomineralisationsvorgänge untersucht: Die Knochenmineralisation als „gewollte“ Biomineralisation und am Beispiel der Chondrocalcinose des Kniegelenksmeniskus ein Beispiel für „ungewollte“, pathologische (ektopische) Mineralisationsvorgänge.

Die Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien ergab, daß bezüglich Kristallinität und Zusammensetzung kein Unterschied verschiedener humaner Knochenproben erkennbar waren (vgl. Abb. 6.5). Sämtliche untersuchten Knochenproben zeigten ausnahmslos apatitische Calciumphosphate. Es konnten weder Anhaltspunkte für eine amorphe Calciumphosphat-Phase gefunden werden [Blumenthal et al. 75] noch für DCPD und OCP [Posner 85], [Legros et al. 87]. Thermogravimetrische und infrarotspektroskopische Ergebnisse ergaben darüber Aufschluß, daß die *Spongiosa*-Proben (schwammartiger Knochen im Inneren des *Femurs*) mit 26 bis 34 Gew.-% den geringsten Apatitgehalt aufwiesen. Tumor-befallener Knochen war dagegen hoch mineralisiert (68 Gew.-%), junger neu gebildeter *Callusknochen* lag mit 44 Gew.-% Mineralphase dazwischen.

Der Carbonatgehalt der Knochenproben schwankte zwischen 1 und 5 Gew.-%. Dabei wies wiederum der Tumorknochen den höchsten Carbonatgehalt auf.

Durch die geringe Anzahl der Proben ist jedoch die Aussagekraft dieser Meßreihe gering. Fest steht, daß die Mineralphase des Knochens aus nanometergroßen *Dahlit*-Blättchen besteht, deren Ausdehnung sich kaum unterscheidet [Posner 85].

Die in dieser Meßreihe gleichzeitig untersuchten Proben verschiedener Knochenersatzmaterialien zeigten strukturell große Unterschiede zu den Knochenproben. Einzig „Kieler Knochenspan“ wies ähnlich kleine Kristallite mit einem ähnlichen Carbonatgehalt wie nativer Knochen auf. Da die organische Matrix durch die Herstellungsweise des „Kieler Knochenspans“ nicht vollständig entfernt werden konnte [Boyde & Jones 96], wird das Material wegen Immunantwort des umgebenden Gewebes und neuerer Gefahren (BSE) heute nicht mehr eingesetzt. Das Knochenersatzmaterial Endobon[®] wies die höchste Kristallinität aller untersuchten Knochenersatzmaterialien dieser Reihe auf. Dies ist durch den Herstellungsprozeß (Sintern aus bovinen Knochen bei bis zu 1100°C) bedingt. Durch die Herstellungsweise aus Knochen ist jedoch die Porosität ähnlich der von nativem Knochen, was die Zellmigration, die Vaskularisierung und die Versorgung der Zellen fördern sollte; gleichzeitig entstand jedoch durch den Sinterungsprozeß alkalisches Calciumoxid, welches auch bei pH-Wert-Verläufen in Wasser (pH 9.8-10) erkennbar war. Der hochkristalline Apatit ist thermodynamisch wesentlich stabiler als die nanokristallinen Carbonatapatite, daher ist ein *remodeling* des Endobon[®] stark behindert [Linhart et al. 00]. Das Knochenersatzmaterial Algipore[®] wies eine niedrigere Kristallinität und –bedingt durch seine Herstellungsweise– einen geringen (1 Gew.-%) Carbonatgehalt auf. Beide Eigenschaften sollten sich positiv auf eine Resorbierbarkeit des Materials auswirken. Da das Material hydrothermal aus Algen hergestellt wurde, weist Algipore[®] außerdem eine Porosität auf, die die Zellversorgung fördern kann. Infrarot-Spektren des Materials zeigen außerdem Reste von Ammoniumsalzen im Kristall.

Pathologische Mineralisationsvorgänge in Kniegelenksmenisken werden hauptsächlich durch die polarisationsmikroskopische Analyse von Kristallen im *Synovialfluid* (Kniegelenksflüssigkeit) nachgewiesen. Weisen diese Kristalle die Eigenschaft der Doppelbrechung auf, so geht die Diagnostik von dem Vorhandensein von Calciumpyrophosphat-dihydrat- (CPPD-) Kristallen aus [Maddison et al. 98].

Die Untersuchung der schon mit bloßem Auge sichtbaren Kristallakkumulationen in humanen Kniegelenksmenisken zeigte dagegen eine amorphe Phase in frischem Meniskusgewebe (Abb. 7.4), welche mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie als eine carbonathaltige apatitische Phase identifiziert werden konnte (Abb. 7.5 ff.). Röntgenpulverdiffraktometrische Untersuchungen an Kristallablagerungen von im Exsikkator über P₄O₁₀ getrockneten Menisken zeigte die erwartete CPPD-Phase (Abb. 7.10). Erst nach dem Trocknen der Menisken konnten auch langgezogene,

blättchenförmige Kristallite im Rasterelektronenmikroskop beobachtet werden (Abb. 7.11). Röntgenbeugungsmessungen an den Glührückständen von Kniegelenksmenisken (800°C) zeigten neben dem erwarteten β -Calciumpyrophosphat auch Tetra-calciumphosphat (TTCP) und Tricalciumphosphat (TCP), was auf das Vorhandensein von aciden Hydrogenphosphat-Gruppen hinweisen kann. Pyrophosphat ist ein bekannter Inhibitor der Calciumphosphat-Kristallisation und verhindert das Auskristallisieren apatitischer Produkte aus amorphen Calciumphosphaten [Termine et al. 70]. Aus schwach alkalischen Lösungen gefällte Calciumpyrophosphate sind ebenfalls zunächst röntgenamorph und gehen bei Erhitzen auf 700°C in kristallines β -Calciumpyrophosphat über. Dies weist ebenfalls darauf hin, daß die Kristallablagerungen im humanen Meniskusgewebe anfänglich aus einer amorphen Phase bestehen.

Zur Simulation dieser hier untersuchten Mineralisationsvorgänge ist es nötig, homogene Bedingungen für die Kristallisation zur Verfügung zu stellen. Gleich einem biologischen System, welches durch enzymatische Regulation, Membranpumpen, Diffusion und Komplexbildung die äußeren Bedingungen (Ionenkonzentration, pH-Wert) konstant hält (vgl. Abb. 4.2), müssen auch unter Laborbedingungen diese Werte gleichermaßen konstant bleiben.

Um dieses Ziel zu erreichen, wurde 1978 die *Constant Composition* (CC)-Technik entwickelt [Tomson & Nancollas 78], welche es erlaubte, durch automatische Titration von Calcium- und Phosphat-Lösung, gesteuert durch den pH-Wert, die Kristallisation von Calciumphosphaten unter definierten Bedingungen zu simulieren. Diese dort simulierten Kristallisationsvorgänge erfolgten jedoch im Sinne einer schnellen Kristallisation, d.h. einer Fällung, und entsprachen so nicht den Vorgaben der langsamen Kristallisation, welche die Biologie vorgibt.

Die Verbindung einer langsamen Doppeldiffusionstechnik in Membranen (Gelatine [Kniep & Busch 96] oder Polyglycolid [Schwarz & Epple 98]) mit der CC-Technik führte zur Entwicklung der *Constant Composition Double Diffusion* (CCDD)-Anlage, welche beide Vorteile miteinander verband. Zwei thermostatisierte Diffusionsgefäße, zwischen die eine beliebige Membran eingebaut werden konnte, erlaubte Diffusionsversuche unter konstanten Bedingungen. Mittels einer Calcium-Elektrode und zweier pH-Metern, welche bei Bedarf Peristalticpumpen ansteuerten, die KOH, Calcium- oder Phosphat-Lösung zutitrierten, konnten die Ionenkonzentrationen in beiden Dif-

fusionsgefäßen konstant gehalten werden (siehe Abb. 9.1). Durch geeignete Programmierung konnte erreicht werden, daß die Phosphat-Konzentration durch die Calcium-Elektrode mit gesteuert werden konnte.

In einer ersten großen Versuchsreihe wurde der Einfluß verschiedener Faktoren (pH-Wert, Fluorid-Gehalt, Konzentration) auf die Morphologie von Fluorapatit-Kristallen, hergestellt durch Diffusion von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$ und KF in eine Polyglycolid-Tablette untersucht. Dabei galt es, die Frage zu klären, welcher Faktor Einfluß auf die Bildung von Hantelaggregaten hat, die sich im Verlauf der Kristallisation zu Kugeln schließen [Knip & Busch 96], [Schwarz & Epple 98]. Die Bildung dieser Hantelaggregate wurde gleichermaßen Matrixeffekten [Busch 98] und intrinsischen elektronischen Effekten [Busch et al. 99] zugeschrieben.

Neben den Hantelaggregaten, die sich hauptsächlich auf der Oberfläche der Phosphat-Seite bildeten, zeigten sich innerhalb der Tablette noch Kugelaggregate und hexagonale Stäbchen (vgl. Abb. 9.18 ff). Die Kugelaggregate waren dabei wesentlich kleiner als die auf der Oberfläche zu Hanteln ausgefächerten hexagonalen Stäbchen, so daß davon ausgegangen werden muß, daß diese Morphologien einen anderen Ursprung haben, beispielsweise gemäß Abbildung 9.33 aus kleinen, verzweigten Keimkristallen. Andere Beobachtungen deuten darauf hin, daß die Kugelaggregate aus flachen Keimkristallen über eine „Schüsselform“ zu den glatten Spärolithen kristallisieren können (Vgl. Abb. 9.22). Wird die Kristallisation durch niedrigere pH-Werte behindert, so entstehen kleinere Kugelaggregate und kleinere Hanteln. Bei höheren pH-Werten sind sowohl größere Kugeln im Inneren der Tablette als auch größere Hanteln außen auf der Tablettenoberfläche erkennbar (vgl. Tabelle 9.7).

Der Einfluß der Fluorid-Konzentration zeigte den Effekt auf die Hantelbildung. Wurde reines Hydroxylapatit ohne Fluoridzugabe kristallisiert, so bildeten sich große Kugeln, bestehend aus ineinander verwobenen, blättchenförmigen HAP-Aggregaten, die im weiteren Verlauf der Kristallisation die gesamte Tablettenoberfläche bedeckten. Geringe Fluorid-Zugabe führte zu sehr dünnen, stäbchenförmigen Kristalliten, die durch die Tablettenoberfläche zu brechen schienen. Ebenfalls traten erste, unregelmäßige Kugelaggragate auf der Oberfläche auf, die sich bei höherer Fluoridzugabe vergrößerten und bis ins Innere der PGA-Tablette erstreckten. Erst bei einem Fluoridgehalt, der der stöchiometrischen Formel für Fluorapatit entspricht, konnte Hantelbildung und die Bildung von regelmäßigen, hexagonalen Kristallen beobachtet werden. Dies

führt zu dem Schluß, daß Fluorid einen markanten Einfluß auf die Morphologie, Regelmäßigkeit und Kristallinität von Fluorapatit-Kristallen hat.

Erhöht man die Konzentration der Diffusionslösungen auf den 1.5-fachen Wert, so erstrecken sich die hexagonalen FAP-Kristalle, die zunächst nur im Tabletteninneren gefunden wurden, bis auf die Oberfläche der Polymertablette. Diese hexagonalen Kristalle verzweigen, zeigen jedoch kein Motiv der Hantelbildung. Die Kugelaggregate zeigten sich nur noch im Tabletteninneren und waren wesentlich kleiner. Bei zweifacher Standardkonzentration wurden neben ausgebildeten Hanteln auch Halbkugelaggregate mit tropfenförmigen Hohlräumen gefunden, die denen in einer Gelatinematrix diffundierten und in der Mitte zerteilten Kugelaggregaten ähnelten [Busch 98]. Jedoch zeigten sich keine Anhaltspunkte dafür, daß diese Aggregate (Abb. 9.28 B-D) aus einer zerteilten Kugel entstammten. Vielmehr ist von einem beschleunigten Hantelwachstum auszugehen, welches sich bei einem 3-Tage-Diffusionsversuch unter denselben Bedingungen bestätigte.

Allgemein können zur FAP-Diffusion in Polyglycolid folgende Aussagen getroffen werden:

1. Neben Hantelaggregaten können auch große, hexagonale Kristalle sowie glatte und kleinere Kugelaggregate beobachtet werden. Dies führt zu der Aussage, daß nicht zwangsweise eine Hantelbildung erfolgen muß.
2. Die Hantelaggregate weisen ein Verhältnis von Länge zu Durchmesser von etwa 5:1 auf. Jedoch sind die Längen und Durchmesser nicht immer gleich.
3. Die Tatsachen, daß ähnliche Hantelaggregate sowohl in ganz anderen Systemen ohne Polyglycolid oder Kollagen gefunden wurden (z.B. Carbonatapatit nach Konversion aus CO_3ACP , vgl. Abb. 10.22 A) als auch FAP-Hantelaggregate in weiter Entfernung von der Diffusionsmatrix beobachtet werden konnten, weisen darauf hin, daß ein Matrixeffekt weitgehend ausgeschlossen werden kann. Vielmehr erfolgt diese Bildung von Hantelaggregaten durch stark verlangsamte Kristallisationsphänomene, z.B. durch Diffusion. Desweiteren können Kristalldefekte für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden.

Weiterhin können über die Polyglycolid-Matrix folgende Aussagen getroffen werden:

1. Die Matrix zeigt markante Ähnlichkeiten mit einer Kollagenmatrix bezüglich Interdiffusionsexperimenten und Kristallisationsphänomenen und ist dabei wesentlich besser definierbar.
2. Die polyanionische Struktur des Polyesters fördert zunächst die Kristallisation auf der Phosphat-Seite der Polyglycolid-Oberfläche, da Calcium-Ionen leichter durch die Matrix diffundieren können.
3. Es gibt nach Beobachtung und Durchführung vieler Diffusionsversuche keinen Anhaltspunkt für ein Kristallwachstum aus den Poren des Polyglycolids. Einige Anhaltspunkte können auf das Gegenteil hinweisen: Eher war Kristallitbildung *um* die Poren *herum* beobachtbar.

In einer weiteren Versuchsreihe konnte gezeigt werden, daß sich die *CCDD*-Anlage nicht nur dazu eignet, Biomineralisationsvorgänge wie die FAP-Bildung zu untersuchen, sondern auch, um pathologische Mineralisationsvorgänge, beispielsweise unter dem Einfluß von Cholesterin, zu untersuchen. Inhibitionsphänomene wie beispielsweise durch Magnesium konnten bestätigt werden, indem eine drastische Morphologieänderung durch die Zugabe von Magnesium erreicht werden konnte. Dies macht es möglich, andere Inhibitoren zu untersuchen und auf ihre Wirksamkeit, z.B. bei der Vermeidung von Arteriosklerose, zu testen.

Polyglycolid wird schon seit den siebziger Jahren als Biomaterial eingesetzt. Seine Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit machen es möglich, es als chirurgisches Nahtmaterial einzusetzen [Gerngroß & Becker 94]. In mechanisch stabilisierter Form wird es auch als Knochenschraube verwendet. Das poröse Polyglycolid, welches in einer Festkörperreaktion aus Natriumchloracetat hergestellt werden kann [Epple & Herzberg 98] (vgl. Abb. 8.5), sollte die Zellversorgung fördern. Um eine Acidose durch die entstehenden sauren Degradationsprodukte zu vermeiden, wurden schon diverse Versuche unternommen, mittels Calciumphosphaten (HAP oder TCP) einen Pufferungseffekt zu erreichen [Mikos et al. 93]. Aufgrund der Ergebnisse der Knochenuntersuchungen wurde ein neues Calciumphosphat entwickelt, welches wesentlich nanokristalliner ist und thermodynamisch instabiler als der Knochenapatit. Dies sollte die Bioresorption unterstützen. Das Calciumphosphat wurde so modifiziert, daß die sauren Degradationsprodukte abgefangen werden können und –auch in reinem

Wasser– der pH-Wert im physiologischen Bereich verbleibt (vgl. Abb. 10.14). Die Zellkulturtestung auf Biokompatibilität, wobei Maus-Osteoblasten im Zellnährmedium α -MEM auf Polyglycolid-Calciumphosphat-Komposite aufgebracht wurden, zeigte proliferierende Zellen, die mineralisierte Kollagenfasern bildeten.

Die in diesem Zusammenhang entwickelten amorphen carbonathaltigen Calciumphosphate wurden weiter untersucht und die Herstellung verfeinert. Der Carbonatgehalt ließ sich bei der Herstellung variieren. Bei hohen Carbonatgehalten zeigte sich bei der Konversion dieser amorphen carbonathaltigen Calciumphosphate in wässriger Lösung das Auskristallisieren von Calcit. Diese Kristallisation konnte im Zellnährmedium α -MEM behindert, im Verbund mit Polyglycolid im Komposit sogar ganz unterdrückt werden.

Diese Konversionsphänomene in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung im Vergleich mit α -MEM wurden auch anhand von Brushit untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß sich in physiologischer Carbonatlösung ein Gemisch aus OCP und zunächst nanokristallinem HAP bildete, welches im weiteren Verlauf Carbonat aufnahm, während die Röntgenpulverdiffraktogramme keine Veränderung mehr zeigten. Die thermische Analyse zeigte im Verlauf dieser Reaktion innerhalb von 120 Stunden sinkende Wassergehalte. Erwartungsgemäß sank der Kristallwassergehalt bis auf ein Minimum, welches auf okkludiertes Wasser zurückzuführen ist. Der Anteil des Reaktionswassers aus aciden Hydrogenphosphat-Gruppen sank ebenfalls, jedoch nie bis auf den Nullwert. Dies läßt darauf schließen, daß ein gewisser Gehalt acider HPO_4^{2-} -Gruppen die stabilste Phase darstellt.

Im Zellnährmedium entstand kein carbonathaltiges Calciumphosphat, sondern OCP, welches im physiologischen pH-Bereich die stabilste Phase darstellt. Während die Umkristallisation im Carbonatlösung nach 24 Stunden beendet war, benötigte sie in serumfreien Zellnährmedium 144 Stunden und in serumhaltigen α -MEM 270 Stunden. Diese Unterschiede, sowohl bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit als auch bezüglich der entstehenden Calciumphosphat-Phasen, konnten ebenfalls mit der Ermittlung des analytischen Ca/P-Verhältnisses bestätigt werden.

Die Arbeit zeigt die Gewinnung von Erkenntnissen über Biomineralisationsphänomene und Versuche der Simulation der zuvor gewonnenen Kenntnisse. Bezüglich der Untersuchung von Knochen und Knochenersatzmaterialien zeigen die Ergebnisse

interessante Anhaltspunkte. Jedoch führt erst eine große Studie an Knochenproben zu statistisch einwandfreien Ergebnissen. Beispielsweise könnten bestätigende Untersuchungen darüber angestellt werden, ob die hohe Mineralisierung typisch für Tumorknochen ist.

Die Aufklärung der Zusammensetzung der Kristalle chondrocalcinotischer Menisken zeigt neue Ansätze, dieses pathologische Mineralisationsphänomen zu untersuchen. Amorphe und nanokristalline Materialien reagieren empfindlich auf die Behandlung mit ionisierenden Medien. Neue Methoden müssen gefunden werden, die Kristallablagerungen aus Gewebeproben zu entfernen, ohne daß diese dabei eine Veränderung erleiden. In einer größeren Studie könnten diese Methoden eruiert werden und würden die so gewonnenen Ergebnisse außerdem statistisch belegen.

Die Simulation von Biomineralisationsvorgängen des FAP und des HAP konnten erfolgreich mittels der CCDD-Anlage durchgeführt werden. Obwohl es durch eine geeignete Programmierung möglich wurde, auch den Phosphat-Gehalt im Diffusionsgefäß zu kontrollieren, ist diese Lösung auf Dauer unbefriedigend. In naher Zukunft soll eine Fluorid-Elektrode den F^- -Gehalt kontrollieren. Eine Möglichkeit der *in situ*-Steuerung der Phosphat-Gehalte kann beispielsweise die Kontrolle über optische Methoden, beispielsweise mittels eines optischen Sensors im Infrarot-Bereich (z.B. 1036 cm^{-1} , vgl. z.B. Abb. 3.9) darstellen.

Ein unumstößlicher Beweis dafür, daß kein Matrixeffekt für die Bildung der Hantelaggregate verantwortlich ist, steht noch aus. Andere Matrices, z.B unpolare Polymere oder flüssige, gering polare Medien getrennt durch zwei Membranen an beiden Diffusionsgefäßen sollten untersucht werden. Bei geeigneter Wahl der Geometrie (Entfernung zwischen den beiden Diffusionsgefäßen) sollte es so möglich sein, Kristallisationsphänomene inmitten dieses Mediums zu beobachten. Dadurch wäre auch die Möglichkeit gegeben, mittels einer Mikrosonde die pH-Wert-Änderung direkt am Ort der Kristallisation zu messen. Da die ionenselektiven Elektroden extrem empfindlich gegenüber organischen Verunreinigungen reagieren, können so auch organische Kristallisationsinhibitoren in diese flüssigen Matrix eingebracht werden, ohne daß sie mit einer ionenselektiven Elektrode in Berührung kommen.

Die Biokompatibilität von Polyglycolid mit Carbonat-ACP konnte gezeigt werden. Die geringe Stabilität und die schnelle Degradation des porösen Polyglycolids erschweren einen klinischen Einsatz in Zukunft. Daher sollten höhere Homologe der Poly-

ester erprobt und eingesetzt werden. Durch ihre unterschiedliche Degradationskinetik ist es dann wiederum nötig, andere Calciumphosphate zu verwenden. Erste Erfahrungen mit Polylactid zeigten, daß die Degradation dieses Polymers so langsam verläuft, daß auf keinem Fall ein so leicht lösliches ACP eingesetzt werden kann wie bei den PGA-Kompositen. Vielmehr sollte hier ein nanokristalliner Apatit mit geringem Carbonatgehalt, im neutralen pH-Bereich gefällt, eingesetzt werden. Dazu wurde eine kontinuierliche Calciumphosphat-Fällungsanlage erdacht und optimiert [Tadič 00].

Die Konversion von Brushit in Zellnährmedien führte zum Entstehen von OCP. Im carbonathaltigen Medium entstand ein OCP/HAP-Gemisch. OCP stellt offensichtlich im biologischen Milieu die stabilste Phase dar. Die Inhaltsstoffe des α -MEM verhinderten eine Inklusion von CO_3^{2-} -Ionen. Im Sinne der Grundlagenforschung und im Interesse der Entwicklung neuartiger Biomaterialien sollten solche Konversionsmechanismen weiter beobachtet werden.

Im Ganzen zeigt die Arbeit nicht nur das große und komplexe Gebiet der Biomineralisation, sondern auch, wie viel intensive Forschung seit den frühen 50er Jahren auf dem Gebiet der Calciumphosphate durchgeführt wurde und wie wenig oftmals bekannt ist. Acht Calciumphosphat-Phasen bilden die Grundlage des Biomaterials Calciumphosphat, wovon 6 (HAP, FAP, CIAP, OCP, DCPD, DCPA, ACP) in wäßriger Lösung entstehen können; die anderen beiden (TCP, TTCP) sind nur durch Herstellung aus der Hitze bekannt. Nimmt man dazu noch das Gebiet der Pyrophosphate und die zahlreichen Defektapatite, Carbonatapatite, alkalihaltigen Apatite hinzu, so wird das System schnell unübersichtlich. Gerade diese Vielfalt jedoch erlaubte es der Natur, für jeden Organismus und für jede Bedingung, die die Umwelt vorgab, ein optimales Material zu entwickeln. Die Untersuchung und Simulation dieser Phänomene steht erst am Anfang und doch zeigen die Ergebnisse, welch spannendes und neues Feld sich vor dem Forscher auftut und welche Möglichkeiten es gibt, die Kristallisation neu zu entdecken.

13. Summary

In the thirties, the modern era of biomineralization studies was founded by the introduction of new methods like x-ray diffraction.

A better access to the observation of cells and tissues was opened by improved optical microscopes and histological techniques [Lowenstam & Weiner 89].

New methods for examination of mineral deposition in living tissues used here provide a closer look down into atomic dimensions.

In the present work, a deeper knowledge of living nature was gained by the use of sophisticated methods as synchrotron radiation. Thereby, data about composition, crystallinity and the calcium phosphate phase could be collected. Two examples for biomineralization were examined: bone mineralization as "wanted" crystallization and, by the examination of chondrocalcinosis of knee menisci, "unwanted" pathologic (ectopic) mineralization.

The examination of bone and bone substitution materials showed no difference between the various bone samples as regards to crystallinity and composition (see figure 6.5). All examined bone samples without exception showed an apatitic calcium phosphate phase. Neither an amorphous phase [Blumenthal et al. 75] nor any other calcium phosphate phases like DCPD or OCP could be found [Posner 85], [Legros 87]. The results of thermogravimetric and infrared spectroscopic measurements disclosed that the samples of *spongiuous* bone contained the smallest amount of apatite (26-34 wt.%), the so-called *Tumor-bone* (spongiuous bone with bone-cancer) was highly mineralized (68 wt.% calcium phosphate), and young, newly formed *callus* bone had a 44 wt% mineral content.

The carbonate content of the bone samples varied between 1 and 5 wt.%. Again, the tumor-bone showed the highest content.

The small amount of samples reduces the significance of this series. It is, however a well-established fact that bone mineral consists of nanometer-sized platelets comparable to *Dahlite* (carbonated apatite) crystals which vary only slightly in their dimensions [Posner 85].

The simultaneous examination of bone substitution materials showed structurally remarkable structural differences to the bone samples. Only "Kiel bone" had small

crystallites and a carbonate content similar to native bone. The organic matrix could not be fully removed by extraction with $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ [Boyde & Jones 96]. Because of adverse reaction of the surrounding tissue and new potential dangers (BSE), this material is not in use any more.

The bone replacement material Endobon[®] showed the highest crystallinity among the examined samples due to its production process (sintering of bovine bone at 1100°C). The porosity of Endobon[®] is similar to native bone, therefore it can stimulate cell migration, vascularisation and cell supply. Simultaneously, calcium oxide is formed by the sintering process. This causes an alkaline burst around the implant. The highly crystalline apatite is thermodynamically much more stable than the nanocrystalline carbonated apatite in bone. Due to this fact, the biological remodeling of Endobon[®] is slow [Linhart et al. 00].

The bone substitution material Algipore[®] showed a smaller crystallinity and, because of the hydrothermal synthesis out of *algae*, a small carbonate content and a porosity which can support cell supply. Infrared spectra of this substance also showed a small ammonia content in the material.

Pathological mineralization in menisci of the knee joint was mainly found by polarization microscopy of crystals in the synovial fluid. The property of double refraction of these crystals is presently explained by the consistence of calciumpyrophosphate-dihydrate (CPPD) [Maddison et al. 98].

Crystal agglomerations in chondrocalcinotic menisci, visible to the bare eye (see fig. 7.4), showed an amorphous phase by x-ray diffraction. By x-ray absorption spectroscopy, this phase was identified as a carbonate-containing apatitic phase (fig. 7.5). Powder diffraction experiments with crystals from menisci dried in a desiccator with P_4O_{10} showed the expected CPPD phase (fig. 7.10). After drying of the menisci, elongated platelet-like crystals could be observed by SEM (fig. 7.11). X-ray powder diffractograms of the solid residues of the menisci after heating them in an oven overnight at 800°C showed the expected β -calcium pyrophosphate as well as tetracalciumphosphate (TTCP) and tricalciumphosphate (TCP). This can be a clue to the presence of acidic HPO_4^{2-} -groups. Pyrophosphate is known as an inhibitor of calcium phosphate crystallization and therefore hinders the crystallization of apatitic products from amorphous calcium phosphates [Termine et al. 70]. Calcium pyrophosphates precipitated from slightly basic solutions are also amorphous and convert to crystal-

line β -Calcium pyrophosphate under the influence of the mother liquid. This is also an indication for the theory that the depositions in chondrocalcinotic menisci are consisting of an amorphous phase.

For the simulation of such mineralization events as examined here it is necessary to provide homogeneous crystallization conditions. Like in a biological system in which by enzymatic regulation, mediation of transmembrane processes, interdiffusion and complexation, the crystallization conditions (pH-value, ionic concentrations) are maintained constant (see fig. 4.2). This constancy must also be provided under laboratory conditions.

To reach this target the "Constant composition" technique was developed in 1978 [Tomson & Nancollas 78]. By automatic titration of calcium and phosphate solutions by two mechanically coupled burettes, controlled by the pH value, the crystallization of calcium phosphates under constant conditions could be simulated. The crystallization experiments examined here were conducted under fast precipitation conditions. These experiments are different from real conditions of biology, where slow controlled crystallization occurs as a rule.

The connection between a slow double diffusion technique in membranes (collagen [Kniep & Busch 96] or polyglycolide [Schwarz & Epple 98] and the CC-technique led to the development of the *Constant Composition Double Diffusion* method. Two thermostatted glass vessels and any membrane clamped in between them allowed diffusion experiments under constant conditions. A calcium ion-selective electrode and two pH-meters which control peristaltic pumps can add KOH, Calcium- or Phosphate-solution if the concentrations in the vessels are decreasing. The ionic concentration in the vessels could be kept constant by this method. By suitable programming a control of the phosphate concentration by means of the Ca-electrode could be achieved.

In an experimental series, the influence of different factors (pH, F-content, concentration) on the morphology of fluoroapatite crystals, made by interdiffusion of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KH_2PO_4 and KF into a polyglycolide pellet, was examined. The aim was to find out which factor influences the formation of dumbbell-like aggregates [Kniep & Busch 96], [Schwarz & Epple 98]. The formation of this morphology was both interpreted as being caused by a matrix effect [Busch 98] as well as by intrinsic electronic effects [Busch et al. 99].

Dumbbell-like aggregates, which were formed on the surface of the pellet on the phosphate side, were not the only type of aggregate to be seen. Spherical aggregates and hexagonal rods were also found inside the pellet (see fig. 9.18). The spherical aggregates inside the polymer pellet were much smaller than the aggregates which had already started to become dumbbell-like shaped on the surface. Thus, these morphologies must be of another origin, for instance like those shown in figure 9.33 based on small branched-out nuclei. Other examinations showed that these spheres can grow out of flat round nuclei by forming a bowl-like shape during the crystallization (see fig. 9.22). When the crystallization had been constrained by a small pH value, smaller spheres and dumbbells were formed. High pH values led to bigger spheres inside the pellets and bigger dumbbells on the outside.

The fluoride concentration caused the biggest effect on the formation of the above-mentioned aggregates. Pure hydroxyapatite crystallized without fluoride, showing big spherulithic aggregates consisting of interwoven platelet-like HAP crystals and covering the whole surface during the crystallization (see fig. 9.30). Small fluoride content led to very thin rod-like crystals which seemed to break through the surface of the pellet (see fig. 9.31). First irregular spherical aggregates could be seen on the surface which increased with higher fluoride content; then, the spheres could also be observed inside the pellet. Only at a fluoride content which matched the stoichiometric formula of fluoroapatite, the forming of dumbbell-like aggregates and regular hexagonal rods were observed. This led to the conclusion that fluoride has an essential influence on the morphology, regularity and crystallinity of the FAP aggregates.

An increase of the concentration by 1.5 times caused the growth of hexagonal FAP rods, which initially could only be seen inside the polymer and subsequently on the surface of the pellet as well. These hexagonal crystals are branching out but do not show any inclination to form dumbbell-like crystals. The spherical aggregates were visible only inside the pellet and much smaller. Experiments with doubled standard concentration showed dumbbell-like crystals on the surface after three days and hemispheric aggregates with a drop-like cavity after 7 days. These aggregates showed a similarity to spherical aggregates formed by interdiffusion in a gelatinous matrix and cut in the middle [Busch 98]. However, there were no clues that these aggregates originated from cut spheres (fig. 9.28 B-D). It rather resembled an accelerated dumbbell growth.

The following statements can be made about the interdiffusion of FAP into polyglycolide:

1. In addition to the dumbbell-like aggregates also big hexagonal rods and spherical aggregates could be observed. This led to the conclusion that the formation of dumbbell-like crystals does not automatically take place.
2. The dumbbell-like aggregates show a length-diameter proportion of 5:1, but the lengths and diameters are not always the same.
3. Similar dumbbell-like aggregates were found in other systems, e.g. carbonated apatites after conversion from amorphous carbonated calcium phosphate (see fig. 10.22 A). Dumbbell-like FAP-aggregates were also found far away from the polyglycolide surface. This leads to the assumption that a matrix effect can be excluded. Crystal defects and the remarkably lowered crystallization speed caused by interdiffusion could be responsible for this morphology.

The following statements can be made for the polyglycolide matrix:

1. With regard to the interdiffusion experiments and the crystallization phenomena, the polyglycolide matrix shows a high similarity to a collagen matrix and moreover is better definable.
2. The polyanionic structure of the polyester initially supports the crystallization onto the surface of the phosphate side of the pellet. The calcium ions are diffusing faster through the polymer.
3. After carrying out numerous interdiffusion experiments there is no support of the statement of crystal growth out from the pores of the polymer. The scanning electron micrographs rather reveal the opposite phenomenon: crystallization did not occur *in*, but *around* the pores.

In following experiments it was shown that the *CCDD*-device can also be used for the simulation of pathological mineralization phenomena. The influence of cholesterol and magnesium was examined. A dramatic change of crystal morphology could be observed after magnesium was added. This shows the possibility for the examination

of other inhibitors and the testing of substances preventing diseases such as arterosclerosis.

Since the seventies, polyglycolide has been used as biomaterial. The biocompatibility and bioresorbability of this polymer opens the possibility for the use as a suture material in surgery [Gerngroß & Becker 94]. Mechanically reinforced, it is used as bone screw material. Porous polyglycolide, which can be synthesized in a solid-state reaction from sodium chloroacetate [Epple & Herzberg 98] (see fig. 8.5), supports the cell supply. To avoid acidosis caused by the acidic degradation products of the bioresorbable polymer, several experiments were carried out to neutralize the released protons by calcium phosphates (HAP or TCP) [Mikos et al. 93]. After examination of the bone samples, a new calcium phosphate phase was developed. This carbonated calcium phosphate is nanocrystalline; it is, therefore, less thermodynamically stable than bone apatite. This would support a biological resorption. The mixture of the calcium phosphate and the porous polyglycolide was modified in a way that the acidic degradation products could be buffered. The pH value of the new composite material was within the physiological area even in pure water (see fig. 10.14). The biocompatibility test with murine osteoblasts in α -MEM medium showed proliferating cells forming extracellular matrix [Linhart et al. 01].

The amorphous carbonated calcium phosphate, which was developed in connection with the biocompatibility experiments, was examined and a variety of samples were synthesized. The carbonate content could be adjusted by the synthesis conditions. The conversion of amorphous carbonated calcium phosphates with high carbonate contents in pure water showed calcite crystallization. This crystallization speed could be slowed down in α -MEM; in the polyglycolide composite it was completely inhibited.

These conversion phenomena in α -MEM compared to physiological sodium carbonate solution were also examined with respect to brushite. In physiological Na_2CO_3 -solution, a mixture of OCP and HAP originated from $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. At first, nanocrystalline HAP was formed, which later on converted into a HAP/OCP mixture. Subsequently, an uptake of carbonate ions could be observed, although there was no visible change in the powder diffractograms. Thermal analysis showed a decreasing water content within 120 hours. The crystal water content decreased to a minimum, which can be explained by the existence of occluded water. The content of

reaction water (resulting from the decomposition of acidic HPO_4^{2-} groups) decreased as well, but it was always observable. This leads to the assumption that a small content of acidic hydrogen phosphate groups in this calcium phosphate may be the most stable phase.

No carbonated apatite was formed by conversion from brushite in cell nutrition medium, except for OCP, which is the most stable phase in the physiological pH-range. The conversion was completed within 24 hours in α -MEM without fetal bovine serum. The reaction in a serum-containing medium was completed within 270 hours. These differences of the crystallization kinetics could also be confirmed by measuring the analytical Ca/P-relation.

14. Literatur

- [Abbona et al. 86] F. Abbona, H. E. Lundager Madsen, R. Boistelle, "The initial phases of calcium and magnesium phosphates precipitated from solutions of high to medium concentrations", *J. Cryst. Growth*, **1986**, 74, 581-590
- [Agrawal & Athanasiou 97] C. M. Agrawal, K. A. Athanasiou, "Technique to control pH in vicinity of biodegrading PLA-PGA implants", *J. Biomed. Mater. Res.* **1997**, 38, 105-114
- [Amjad 82] Z. Amjad, "The influence of mellitic acid on the crystal growth of hydroxyapatite", in: *Adsorption on and surface chemistry of hydroxyapatite*, ACS-Meeting **1982**, 1-11
- [Amjad 89] Z. Amjad, "Constant-composition study of dicalcium phosphate dihydrate crystal growth in the presence of Poly(acrylic acids)", *Langmuir* **1989**, 5, 1222-1225
- [Andersen & Brečević 91]. F. A. Andersen, L. Brečević, "Infrared spectra of amorphous and crystalline calcium carbonate", *Acta Chem. Scand.* **1991**, 45, 1018-1024
- [Barralet et al. 98] J. Barralet, S. Best, W. Bonfield, "Carbonate substitution in precipitated hydroxyapatite: an investigation into the effects of reaction temperature and bicarbonate ion concentration", *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, 41, 79-86
- [Baddiel & Berry 66] C. B. Baddiel, E. E. Berry, "Spectra structure correlations in hydroxy and fluorapatite", *Spectrochim. Acta* **1966**, 22, 1407-1416
- [Betz et al. 99] O. Betz, A. Ignatius, D. Reif, B. Leuner, L. Claes, "New resorbable composites made of TCP/polylactide and B14N/polylactide as bone graft substitutes in a loaded implant model: a histological analysis", In: *25th Annual Meeting Transactions of the Society for Biomaterials*, Providence, RI **1999**, 453

- [Blackwelder & Watabe 77] P. Blackwelder, N. Watabe, "Studies on shell regeneration. II. The fine structure of normal and regenerated shell of the freshwater snail *Pomacea paludosa*", in: *Biominalisation, Forschungsberichte Band 9*, Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz F. K. Schattauer Verlag, Stuttgart New York **1977**
- [Blumenthal et al. 75] N. C. Blumenthal, F. Betts, A. S. Posner, "Effect of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite", *Calcif. Tiss. Res.* **1975**, *18*, 81-90
- [Blumenthal et al. 81] N. C. Blumenthal, F. Betts, A. S. Posner, "Formation and structure of Ca-deficient hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Int.* **1981**, *33*, 111-117
- [Boskey & Posner 73] A. L. Boskey, A. S. Posner, "Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent solution-mediated solid-solid conversion", *J. Phys. Chem.* **1973**, *77*, 2313-2317
- [Brandes & Müller 95] A. Brandes, K.-M. Müller, "Kalzinosen des Meniskus", *Pathologie* **1995**, *16*, 269-277
- [deBruijn et al. 94] J. D. deBruijn, Y. P. Bovell, C. A. van Blitterswijk, "Osteoblast and osteoclast responses to calcium phosphates", *Bioceramics* **1994**, *7*, 293-298
- [Brown et al. 82] W. E. Brown, M. Mathew, L. C. Chow, "Roles of octacalcium phosphates in surface chemistry of apatites", in: *Adsorption in and surface chemistry of hydroxyapatite*, ACS-Meeting **1982**, 13-28
- [Boyde & Jones 96] A. Boyde, S. J. Jones, "Scanning electron microscopy of bone: instrument specimen and issues", *Microsc. Res. Techn.* **1996**, *33*, 92-120
- [Brown & Martin 99] P. W. Brown, R. I. Martin, "An analysis of hydroxyapatite surface layer formation", *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 1671-1675

-
- [Burke et al. 2000] A. P. Burke, A. Taylor, A. Farb, G.T. Malcom, R. Virmani, "Coronary calcification: insights from sudden coronary death victims", *Z. Kardiol.* **2000**, *89 (Suppl. 2)*, II/49-II/53
- [Busch 98] S. Busch, „Selbstorganisation und Morphogenese von Apatit-Gelatine-Kompositen unter biomimetischen Bedingungen“, Dissertation, Technische Universität Darmstadt **1998**
- [Busch et al. 99] S. Busch, H. Dolhaine, A. DuChesne, S. Heinz, O. Hochrein, F. Laeri, O.Podelbrad, U. Vietze, T. Weiland, R. Kniep, „Biomimetic morphogenesis of fluorapatite-gelatin composites: fractal growth, the question of intrinsic electric fields, core/shell assemblies, hollow spheres and reorganisation of denatured collagen“, *Eur. J. Inorg. Chem.* **1999**, 1643-1653
- [Cammann 73] K. Cammann, *Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York **1973**
- [Cammenga & Eppe 95] H. K. Cammenga, M. Eppe, „Grundlagen der Thermischen Analysetechniken und ihre Anwendungen in der präparativen Chemie“, *Angew. Chem.* **1995**, *107*, 1284-1301
- [Chhetry et al. 99] A. Chhetry, Z. Wang, J. L. Fox, A. A. Baig, H. Zhuang, W. I. Higuchi, "Use of dicalcium phosphate dihydrate as a probe in a approach for accurate calculations of solution equilibria in buffered calcium phosphate systems", *J. Colloid Interface Sci.* **1999**, *218*, 47-56
- [Chou et al. 99] L. Chou, B. Marek, W. R. Wagner, "Effects of hydroxylapatite coating crystallinity on biosobubility, cell attachment efficiency and proliferation in vitro", *Biomaterials* **1999**, *20*, 977-985
- [Constantz et al. 95] B. R. Constantz, I. C. Ison, M. T. Fulmer, R. D. Poser, S. T. Smith, M. VanWagoner, J. Ross, S. A. Goldstein, J. B. Jupiter, D. I. Rosenthal, , „Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone“, *Science* **1995**, *267*, 1796-1799

- [Daculsi et al. 90] G. Daculsi, R.Z. LeGeros, M. Heughebaert, I. Barbieux, "Formation of carbonate-apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics", *Calcif. Tissue Int.* **1990**, *46*, 20-27
- [Dee & Bizios 96] K. C. Dee, R. Bizios, "Mini-Review: Proactive biomaterials and bone tissue engineering", *Biotechnol. Bioeng.* **1996**, *50*, 438-442
- [De Maeyer et al. 93] E. A. P. De Maeyer, R. M. H. Verbeeck, D. E. Naessens, "Stoichiometry of Na⁺ and CO₃²⁻-containing apatites obtained by hydrolysis of monetite", *Inorg. Chem.* **1993**, *32*, 5709-5714
- [De Maeyer et al. 96] E. A. P. De Maeyer, R. M. H. Verbeeck, I. Y. Pieters, "Effect of K⁺ on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of monetite", *Inorg. Chem.* **1996**, *35*, 857-863
- [Doi et al. 98] Y. Doi, T. Shibutani, Y. Moriwaki, T. Kajimoto, Y. Iwayama, "Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes", *J. Biomed. Mater. Res.* **1998**, *39*, 603-610
- [Dowker & Elliott 79] S. E. P. Dowker, J. C. Elliott, "Infrared absorption bands from NCO⁻ and NCN²⁻ in heated carbonate-containing apatites prepared in the presence of NH₄⁺ ions", *Calcif. Tissue Int.* **1979**, *29*, 177-178
- [Durst 69] R. A. Durst, "Ion selective electrodes", *Proceedings of a symposium held at the National Bureau of Standards Gaithersburg* **1969**
- [Eagle 76] H. Eagle, "Media for animal cell culture", *Tissue culture association manual* **1976**, *3*, 517-520
- [Eanes & Hailer 98] E. D. Eanes, A. W. Hailer, The effect of fluoride on the size and morphology of apatite crystals grown from physiologic solutions, *Calcif. Tissue Int.* **1998**, *63*, 250-257

- [Ebbinghaus 98] S. Ebbinghaus, „Struktur und physikalische Eigenschaften perowskit-verwandter Metalloxide vom Typ $\text{La}_{2-x}\text{Sr}_x\text{Ru}_y\text{O}_{4-\delta}$ “, Dissertation, Hamburg **1998**
- [Eidelman et al. 87] N. Eidelman, L. C. Chow, W. E. Brown, “Calcium phosphate saturation levels in ultrafiltered serum”, *Calcif. Tissue Int.* **1987**, *40*, 71-78
- [El Feki et al. 91] H. El Feki, C. Rey, M. Vignoles, “Carbonate ions in apatites: Infrared investigations in the ν_4 CO_3 domain“, *Calcif. Tissue Int.* **1991**, *49*, 269-274
- [El Feki et al. 00] H. El Feki, J. M. Savariault, A. Ben Salah, M. Jemal, “Sodium and carbonate distribution in substituted calcium hydroxyapatite“, *Solid State Sciences*, **2000**, *2*, 577-586
- [Elliott 94] J. C. Elliott, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Studies in inorganic chemistry 18, Elsevier Amsterdam, London, New York, Tokyo **1994**
- [Elliott et al. 73] J. C. Elliott, P. E. Mackie, R. A. Young, “Monoclinic hydroxyapatite“, *Science* **1973**, *180*, 1055-1057
- [Epple & Herzberg 98] M. Epple, O. Herzberg, “Porous polyglycolide“, *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)* **1998**, *43*, 83-88
- [Epple & Kirschnick 97] M. Epple, H. Kirschnick, “Oligomerization and polymerization in sodium salts of chlorocarboxylic acids“, *Liebigs Ann./Recueil* **1997**, 81-85
- [Faller 99] A. Faller, *Der Körper des Menschen*, 13. Auflage, Deutscher Taschenbuch Verlag Stuttgart **1999**
- [Fisseler-Eckhoff et al. 89] A. Fisseler-Eckhoff, P. M. Königs, K.-M. Müller, “Pathogenetische Aspekte der Chondrocalcinose des Kniegelenkmeniskus“, *Pathologe* **1989**, *10*, 340-348
- [Fleisch & Bisaz 62] H. Fleisch, S. Bisaz, “Mechanism of calcification: inhibitory role of pyrophosphate“, *Nature* **1962**, *195*, 911
- [Fowler et al. 66] B. O. Fowler, E. C. Moreno, W. E. Brown, “Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate“, *Arch. Oral. Biol.* **1966**, *11*, 477-492

- [Fratzl et al. 91] P. Fratzl, N. Fratzl-Zelman, K. Klaushofer, G. Vogl, K. Koller, "Nucleation and growth of mineral crystals in bone studied by small-angle x-ray scattering", *Calcif. Tissue Int.* **1991**, *48*, 407-413
- [Gassmann 28] Th. Gassmann, „Über die künstliche Darstellung des Hauptbestandteiles der Knochen und der Zähne“, *Hoppe-Seyl Z.* **1928** 62-66
- [Gerngroß & Becker 94] H. Gerngroß, H. P. Becker, *Biofix*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, ;London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest **1994**
- [Gerthsen et al. 92] C. Gerthsen, H. O. Kneser, H. Vogel, *Physik*, 16. Auflage Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest **1992**, 728ff.
- [Gilman & Hukins 94] H. Gilman, D. W. L. Hukins, "Seeded growth of hydroxyapatite in the presence of dissolved albumin", *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *55*, 21-30
- [Gollasch et al. 00] M. Gollasch, M Löhn, M. Fürstenau, M. T. Nelson, F. C. Luft, H. Haller, "Ca²⁺ channels, Ca²⁺ sparks, and regulation of arterial smooth muscle function", *Z. Kardiol.* **2000**, *89 (Suppl. 2)*, II/15-II/19
- [Greenfield et al. 74] D. J. Greenfield, J. D. Termine, E. D. Eanes, "A chemical study of apatites prepared by hydrolysis of amorphous calcium phosphates in carbonate-containing aqueous solutions", *Calcif. Tissue Res.* **1974**, *14*, 131-138
- [Gron et al. 66] P. Gron, H. G. McCann, D. Bernstein, "Effect of fluoride on human osteoporotic bone mineral", *J. Bone Joint Surg.* **1966**, *48A*, 892-898
- [Grynepas 93] M. Grynepas, "Age and disease-related changes in the mineral of bone", *Calcif. Tissue Int.* **1993**, *53 (Suppl. 1)*, S57-S64
- [Grynepas et al. 84] M. D. Grynepas, L. C. Bonar, M. J. Glimcher, "Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: a radial distribution function study", *Calcif. Tissue Int.* **1984**, *36*, 291-301

- [Grynpas & Cheng 88] M. D. Grynpas, P.-T. Cheng, "Fluoride reduces the rate of dissolution of bone", *Bone and Mineral* **1988**, 5, 1-9
- [Hach 91] DR/2000 Spektrophotometer Handbook, Firma Hach **1991**
- [Halverson et al. 90] P. B. Halverson, H. S. Cheung, R. Johnson, J. Struve, "Simultaneous occurrence of calcium pyrophosphate dihydrate and basic calcium phosphate (hydroxyapatite) crystals in a knee", *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1990**, 257, 162-165
- [Harries et al. 87] J. E. Harries, D. W. L. Hukins, C. Holt, S. S. Hasnain, "Conversion of amorphous calcium phosphate into hydroxyapatite investigated by EXAFS spectroscopy", *J. Cryst. Growth* **1987**, 84, 563-570
- [Harries et al. 87-2] J. E. Harries, S. S. Hasnain, J. S. Shah, "EXAFS study of structural disorder in carbonate-containing hydroxyapatite", *Calcif. Tissue Int.* **1987**, 41, 346-350
- [Harries et al. 88] J. E. Harries, D. W. L. Hukins, S. S. Hasnain, "Calcium environment in bone mineral determined by EXAFS spectroscopy", *Calcif. Tissue Int.* **1988**, 43, 250-253
- [Hay et al. 86] D. I. Hay, S. K. Schluckebier, E. C. Moreno, "Saturation of human salivary secretions with respect to calcite and inhibition of calcium carbonate precipitation by salivary constituents", *Calcif. Tissue Int.* **1986**, 39, 151-160
- [Hemmerle et al. 97] J. Hemmerle, A. Öncag, S. Ertürk, "Ultrastructural features of the bone response to a plasma-sprayed hydroxyapatite coating in sheep", *J. Biomet. Mater. Res.* **1997**, 36, 418-425
- [Hesse et al. 95] M. Hesse, H. Meier, B. Zeeh, *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York **1995**
- [Heyde 97] M. Heyde, "ecological considerations on the use and production of biosynthetic and synthetic biodegradable polymers", *Polym. Degrad. Stab.* **1998**, 59, 3-6
- [Hofmann 97] G. O. Hofmann, "Biologisch abbaubare Knochenimplantate" *Spektrum der Wissenschaft* **1997**, 2, 46-50
- [Hough & Webber 90] A. J. Hough Jr., R. J. Webber, "Pathology of the meniscus", *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1990**, 252, 32-40

- [Iijima et al. 96] M. Iijima, D. G. A. Nelson, Y. Pan, A. T. Kreinbrink, M. Adachi, T. Goto, Y. Moriwaki, "Fluoride analysis of apatite crystals with a central planar OCP inclusion: concerning the role of F⁻ ions on apatite/OCP/apatite structure formation", *Calcif. Tissue Int.* **1996**, *59*, 377-384
- [Iijima et al. 98] M. Iijima, H. Kamemizu, N. Wakamatsu, T. Goto, Y. Doi, Y. Moriwaki, "Effects of Ca addition on the formation of octacalcium phosphate and apatite in solution at pH 7.4 and at 37°C", *J. Cryst. Growth* **1998**, *193*, 182-188
- [Ikoma et al. 99] T. Ikoma, A. Yamazaki, S. Nakamura, M. Akao, "Preparation and structure refinement of monoclinic hydroxyapatite" *J. Solid State Chem.* **1999**, *144*, 272-276
- [Ishikawa & Eanes 93] K. Ishikawa, E. D. Eanes, "The hydrolysis of anhydrous dicalcium phosphate into hydroxyapatite", *J. Dent. Res.* **1993**, *72*, 474-480
- [Jemal & Khattech 89] M. Jemal, I. Khattech, "Simultaneous Thermogravimetry and gas chromatography during decomposition of carbonate apatites", *Thermochim. Acta* **1989**, *152*, 65-76
- [Kaim & Schwederski 91] W. Kaim, B. Schwederski, *Bioanorganische Chemie*, B.G. Teubner Stuttgart **1991**
- [Khan & Hackett 94] S. R. Khan, R. L. Hackett, "Pathological crystallization of calcium oxalate and calcium phosphate", in: *Hydroxyapatite and related materials* (Hrsg.: P. W. Brown, B. Constantz), CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo **1994**, 83-92
- [Klein et al. 89] C. P. Klein, P. Patka, W. den Hollander, "Macroporous calcium phosphate bioceramics in dog femora: a histological study of interface and biodegradation", *Biomaterials* **1989**, *10*, 59-62

- [Knierp & Busch 96] R. Knierp, S. Busch, „Biomimetisches Wachstum und Selbstorganisation von Fluorapatit-Aggregaten durch Diffusion in denaturierten Kollagen-Matrices“, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2788-2791; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2624-2626
- [Koutsoukos et al. 80] P. Koutsoukos, Z. Ahmjad, M. B. Tomson G.H. Nancollas, „Crystallisation of calcium phosphates a constant composition study“, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102* (5), 1553-1557
- [Koutsoukos & Nancollas 81] P.G. Koutsoukos, G.H. Nancollas, „Crystal growth of calcium phosphates – epitaxial considerations“, *J. Cryst. Growth* **1981**, *53*, 10-19
- [Koutsoukos & Nancollas 81-2] P. G. Koutsoukos, G. H. Nancollas, „Influence of strontium ion on the crystallization of hydroxyapatite from aqueous solution“, *J. Phys. Chem.* **1981**, 2403-2408
- [Krischner 90] H. Krischner, *Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse*, Vieweg Braunschweig **1990**
- [Kühl & Nebergall 63] G. Kühl, W. H. Nebergall, „Hydrogenphosphat- und Carbonatapatite“, *Z. Anorg. Allgem. Chem.* **1963**, *324*, 313-320
- [Küther et al. 98] J. Küther, R. Seshadri, W. Tremel; „Kristallisation von Calcitkugeln durch maßgeschneiderte Nucleationskeime“; *Angew. Chem.* **1998**, *110* (21), 3196-3199
- [Küther et al 98-2] J. Küther, G. Nelles, R. Seshadri, M. Schaub, H.-J. Butt, W. Tremel; „Templated crystallisation of calcium and strontium carbonates on centred rectangular self-assembled monolayer substrates“, *Chem. Eur. J.* **1998**, *4* (9), 1834-1842
- [Küther et al. 98-3] J. Küther, R. Seshadri, W. Knoll, W. Tremel, „Templated growth of calcite, vaterite and aragonite crystals on self-assembled monolayers of substituted alkylthiols on gold“, *J. Mater. Chem.* **1998**, *8* (3), 641-650
- [Kumar et al. 99] M. Kumar, J. Xie, K. Chittur, C. Riley, „Transformation of modified brushite to hydroxyapatite in aqueous solution: effects of potassium solution“, *Biomaterials* **1999**, *20*, 1389-1399

- [Laurencin et al. 96] C. T. Laurencin, M. A. Attawia, H. E. Elgendy, K. M. Herbert, "Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices", *Bone* **1996**, *19* (1), 93S-99S
- [Legros et al. 87] R. Legros, N. Balmain, G. Bonel, "Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone", *Calcif. Tissue Int.* **1987**, *41*, 137-144
- [LeGeros 65] R.Z. LeGeros, "Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite", *Nature* **1965**, *206*, 403-404
- [LeGeros 68] R.Z. LeGeros, O. R. Trautz, J. P. LeGeros, E. Klein, "Carbonate substitution in the apatite structure (1)", *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1968**, 1712-1718
- [LeGeros 85] R. Z. LeGeros, "Preparation of octacalcium phosphate (OCP): a direct fast method", *Calcif. Tissue Int.* **1985**, *37*, 194-197
- [LeGeros 94] R. Z. LeGeros, "Biological and synthetic apatites", in: *Hydroxyapatite and related materials* (Hrsg.: P. W. Brown, B. Constantz), CRC Press Boca Ranton, Ann Arbor, London, Tokyo **1994**, 3-28
- [Lendlein 99] A. Lendlein, "Polymere als Implantatwerkstoffe", *Chemie in unserer Zeit* **1999**, *33* (5), 279-295
- [Linhart et al. 00] W. Linhart, N. M. Meenen, J. M. Rueger, "Knochenersatzmaterialien: Neue Möglichkeiten und Techniken", *OP-Journal* **2000**, *3*, 294-299
- [Linhart et al. 01] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, A. F. Schilling, M. Amling, J. M. Rueger, M. Epple, "Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials", *J. Biomed. Mat. Res.* **2001**, *54*, 162-171
- [Lohmander et al. 89] L. S. Lohmander, L. Dahlberg, L. Ryd, D. Heinegård, "Increased levels of proteoglycan fragments in knee joint fluid after injury", *Arthr. and Rheum.* **1989**, *32* (11), 1434-1442
- [Lowenstam & Weiner 89] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press New York, Oxford **1989**

- [Maddison et al. 98] P. J. Maddison, D. A. Isenberg, P. Woo, D. N. Glass, "Calcium pyrophosphate dihydrate (CPPD) disease", in: *Oxford textbook of rheumatology* second edition **1998**, 2 (Sections 5-6 and index), 1567-1581
- [Mann 95] S. Mann, "Biom mineralization and biomimetic materials chemistry", *J. Mater. Chem.* **1995**, 5 (7), 935-946
- [Mann 96] S. Mann, *Biomimetic materials chemistry*, VCH Publishers inc. Weinheim, New York, Cambridge **1996**
- [Mann 97] S. Mann, "Biom mineralisation: the form(id)able part of bioinorganic chemistry!", *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1997**, 3953-3961
- [Martin & Brown 97] R. I. Martin, P. W. Brown, "The effects of magnesium on hydroxyapatite formation in vitro from CaHPO_4 and $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ at 37.4°C ", *Calcif. Tissue Int.* **1997**, 60, 538-546
- [Mayer 97] C. Mayer, „Keimbildungsuntersuchungen von NaClO_3 mit Hilfe der Assymetrischen Kristallisation“, Dissertation, Braunschweig **1997**
- [McCarty et al. 66], D. J. McCarty, H. M. Hogan, R. A. Gatter, M. Grossmann, "Studies on pathological calcifications in human cartilage", *J. Bone Jt. Surg.* **1966**, 48 A, 309-317
- [Meyer & Fleisch 84] J. L. Meyer, H. Fleisch, "Determination of calcium phosphate inhibitor activity", *Mineral Electrolyte Metab.* **1984**, 10, 249-258
- [Mikos et al. 93] A. G. Mikos, G. Sarakinos, M. D. Lyman, D. E. Ingber, J. P. Vacanti, R. Langer, "Prevascularisation of porous biodegradable polymers", *Biotechnol. Bioeng.* **1993**, 42, 716-723
- [Misra 86] D. N. Misra, "Water on apatites", *Calcif. Tissue Int.* **1986**, 38, 333-338
- [Moeller & Bodnar 53] T. Moeller, S. J. Bodnar, "A. Calcium hydrogen orthophosphate 2-hydrate (brushite)", in: *Inorg. Synth.* **1953**, VI, 20-21

- [Moeller et al. 53] T. Moeller, M. Kondzella, R. Lokken, "Calcium hydrogen orthophosphate (Monetite), in: *Inorg. Synth.* **1953**, VI, 22
- [Mohr et al. 74] W. Mohr, J. Hersener, W. Wilke, G. Weinland, G. Beneke, "Pseudogicht (Chondrocalcinose)", *Z. Rheumatol.* **1974**, 33, 107-129
- [Mohr et al. 79] W. Mohr, K. Oehler, J. Hersener, W. Wilke, "Chondrocalcinose der Zwischenwirbelscheiben", *Z. Rheumatol.* **1979**, 38, 11-26
- [Moskowitz 86] D. W. Moskowitz, "The tension between work and growth: a cellular concern", *Calcif. Tissue Int.* **1986**, 39, 215-217
- [Nackenhorst & Schröder 96] U. Nackenhorst, U. Schröder, „Numerische Simulation des beanspruchungsadaptiven Knochenumbaus endoprothetisch versorgter Femura“, *Bericht aus dem Institut für Mechanik, Universität der Bundeswehr Hamburg Fachbereich Maschinenbau* September **1996**
- [Nancollas & Tomažič 74] G. H. Nancollas, B. Tomažič, "Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals. Effect of supersaturation and ionic medium", *J. Phys. Chem.* **1974**, 78 (22), 2218-2224
- [Nancollas & Zawacki 84] G.H. Nancollas, S. J. Zawacki, "Inhibitors of crystallization and dissolution", *Industrial Crystallization* **1984**, 84, 51-59
- [Nelson & Featherstone 82] D.G.A. Nelson, J.D.B. Featherstone, "Preparation, analysis and characterisation of carbonated apatites", *Calcif. Tiss. Int.* **1982**, 34, 569-581
- [Nelson et al. 89] L. S. Nelson Jr., C. Holt, J. E. Harries, D. W. L. Hukins, "Amorphous calcium phosphates of different composition give very similar EXAFS spectra", *Physica B* **1989**, 158, 105-106
- [Newesely 60] H. Newesely, „Darstellung von „Oktacalciumphosphat“ (Tertacalciumhydrogentrisphosphat) durch homogene Kristallisation“, *Mh. Chem.* **1960**, 91, 1020-1023
- [Newesely 67] H. Newesely, „Thermische Umwandlungsreaktionen der Calciumhydrogenphosphate und des Octacalciumphosphats“, *Mh. Chem.* **1967**, 98 (2), 379-389

-
- [Nývlt & Ulrich 95] J. Nývlt, J. Ulrich, *Admixtures in crystallization*, VCH Weinheim, New York **1995**
- [Oonishi 91] H. Oonishi, "Orthopaedic applications of hydroxyapatite", *Biomaterials* **1991**, 12, 171-178
- [Orion 96] *Calcium electrode instruction manual*, Orion Research Inc. **1996**
- [Okazaki & Takahashi 99] M. Okazaki, J. Takahashi, "Synthesis of functionally graded CO₃ apatite as surface biodegradable crystals", *Biomaterials* **1999**, 20, 1073-1078
- [Paschalis et al. 96] E. P. Paschalis, E. DiCarlo, F. Betts, P. Sherman, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, "FTIR microspectroscopic analysis of human osteonal bone", *Calcif. Tissue Int.* **1996**, 59, 480-487
- [Paschalis et al. 97] E. P. Paschalis, F. Betts, E. DiCarlo, R. Mendelsohn, A. L. Boskey, "FTIR microspectroscopic analysis of human iliac crest biopsies from untreated osteoporotic bone", *Calcif. Tissue Int.* **1997**, 61, 487-492
- [Peter et al. 99] S. J. Peter, P. Kim, A. W. Yasko, M. J. Yaszemski, A. G. Mikos, "Crosslinking characteristics of an injectable poly(propylene fumarate)/ β -tricalcium phosphate paste and mechanical properties of the crosslinked composite for use as a biodegradable cement", *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, 44, 314-321
- [Peters et al. 00] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, "The structure of bone studied with x-ray diffraction, x-ray absorption spectroscopy and thermal analysis", *Thermochim. Acta* **2000**, 361, 131-138
- [Plate et al. 96] U. Plate, T. Tkotz, H. P. Wiesmann, U. Stratmann, U. Joos, H. J. Höhling, "Early mineralization of matrix vesicles in the epiphyseal growth plate", *Journal of Microscopy* **1996**, 183, 102-107
- [Posner 85] A. S. Posner, "The mineral of bone", *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1985**, 2000, 87-99

- [Posner & Betts 75] A. S. Posner, F. Betts; "Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure"; *Accts. Chem. Res.* **1975**, *8*, 273-281
- [Posner & Diorio 58] A. S. Posner, A. F. Diorio, "Refinement of the hydroxyapatite structure", *Acta Cryst.* **1958**, *11*, 308-309
- [Puech et al. 82] J. Puech, J.-C. Heughebaert, G. Montel, "A new mode of growing apatite crystallites", *J. Cryst. Growth.* **1982**, *56*, 20-24
- [Reddi 97] A. H. Reddi; "BMPs: Actions in flesh and bone", *Nature Med.* **1997**, *3* (8), 837-839
- [Rehr et al. 92] J. J. Rehr, R. C. Albers, S. I. Zabinsky, "High ordered multiple-scattering calculations of X-ray absorption fine structure", *Phys. Rev. Lett.* **1992**, *69*, 3397-3400
- [Rodgers & Spector 86] A. L. Rodgers, M. Spector; "Pancreatic calculi containing brushite: ultrastructure and pathogenesis", *Calcif. Tissue Int.* **1986**, *39*, 342-347
- [Romo 54] L. A. Romo; "Synthesis of Carbonato-apatite"; *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76*, 3924-3925
- [Rueger 98] J. M. Rueger; "Knochenersatzmittel - heutiger Stand und Ausblick"; *Orthopäde* **1998**, *27*, 72-79
- [Rueger et al. 98] J. M. Rueger, W. Linhart, D. Sommerfeldt; "Biologische Reaktionen auf Kalziumphosphatkeramik-Implantationen"; *Orthopäde* **1998**, *27*, 89-95
- [Salimi et al. 85] M. H. Salimi, J.C. Heughebaert, G.H. Nancollas; "Crystal growth of calcium phosphates in the presence of magnesium ions"; *Langmuir* **1985**, *1*, 119-122
- [Savarino et al. 98] L. Savarino, S. Stea, D. Granchi, M. E. Donati, M. Cervellati, A. Moroni, G. Paganetto, A. Pizzoferrato; "X-ray diffraction of bone at the interface with hydroxyapatite-coated versus uncoated metal implants"; *J. Mater. Sci.-Mat. Med.* **1998**, *9*, 109-115
- [Schinke et al. 99] T. Schinke, M. D. McKnee, G. Karsenty; "Extracellular matrix calcification: where is the action ?", *Nature Genet.* **1999**, *21*, 150-151

-
- [Schwarz & Epple 98] K. Schwarz, M. Epple; "Biomimetic crystallisation of apatite in a porous polymer matrix"; *Chem. Eur. J.* **1998**, *4 (10)*, 1898-1903
- [Schwarz & Epple 98-2] K. Schwarz, M. Epple; "Hierarchically structured polyglycolide - a biomaterial mimicking natural bone"; *Macromol. Rapid Commun.* **1998**, *19*, 613-617
- [Sharma et al. 92] V. K. Sharma, M. Johnsson, J. D. Sallis, G.H. Nancollas; "Influence of citrate and phosphocitrate on the crystallization of octacalcium phosphate"; *Langmuir* **1992**, *8*, 676-679
- [Smith 98] B. L. Smith; "Studying shells: a growth industry"; *Chemistry & Industry* **1998**, 649-653
- [Stary 00] H. C. Stary; "Natural history of calcium deposits in arteriosclerosis progression and regression"; *Z. Kardiol.* **2000**, *89 (Suppl. 2)*, II/28-II/35
- [Stern et al. 95] E. A. Stern, M. Newville, B. Ravel, Y. Yacoby, D. Haskel, "The UWXAFS analytical package: philosophy and details", *Physica B* **1995**, *117*, 208-209
- [Sudarsanan & Young 78] K. Sudarsanan, R. A. Young, "Structural interactions of F, Cl and OH in apatites", *Acta Cryst.* **1978**, *B34*, 1401-1407
- [Sun et al. 97] J.-S. Sun, Y.-H. Tsuang, W. H.-S. Chang, J. Li, H.-C. Liu, F.-H. Ling, "Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts", *Biomaterials* **1997**, *18*, 683-690
- [Suzuki et al. 98] S. Suzuki, M. Ohgaki, M. Ichyanagi, M. Ozawa, "Preparation of needle-like hydroxyapatite", *J. Mat. Sci. Lett.* **1998**, *17*, 381-383
- [Tadič 00] D. Tadič, "Synthese und Charakterisierung von Calciumphosphat-Keramiken", Diplomarbeit Universität Hamburg **2000**
- [Taylor et al. 98] M. G. Taylor, K. Simkiss, J. Simmons, L. N. Y. Wu, R. E. Wuthier, "Structural studies of a phosphatidyl serine-amorphous calcium phosphate complex", *Cell. Mol. Life Sci.* **1998**, *54*, 196-202

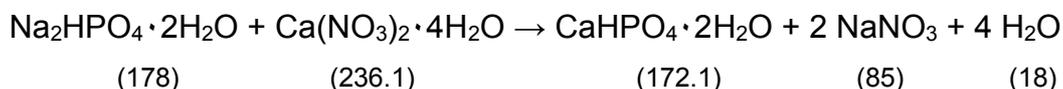
- [Teitelbaum et al. 97] S. L. Teitelbaum, M. M. Tondravi, F. P. Ross, "Osteoclasts, macrophages and the molecular mechanisms of bone resorption", *J. Leucocyte Biol.* **1997**, *61*, 381-388
- [Termine et al. 70] J. D. Termine, R. A. Peckauskas, A. S. Posner, "Calcium phosphate formation in vitro. II Effects of environment on amorphous-crystalline transformation", *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, *140*, 318-325
- [Termine & Posner 66] J. D. Termine, A. S. Posner, "Infra-red determination of the percentage of crystallinity in apatitic calcium phosphates", *Nature* **1966**, *211*, 268-270
- [Törmälä & Rokkanen 95] P. Törmälä, P. Rokkanen, "Biodegradable polymers in orthopaedics: experimental and clinical", *Materials in Clinical Applications* **1995**, 639-651
- [Tomazic 94] B. B. Tomazic, "Characterization of mineral phases in cardiovascular calcification", in: *Hydroxyapatite and related materials* (Hrsg. P. W. Brown, B. Constanz), CRC Press Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo **1994**, 93-115
- [Tomson & Nancollas 78] M. B. Tomson, G. H. Nancollas, "Mineralization Kinetics: A Constant Composition Approach", *Science* **1978**, *200*, 1059
- [Tortet et al. 97] L. Tortet, J. R. Gavarri, G. Nihoul, "Study of protonic mobility in $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Brushite) and CaHPO_4 (Monetite) by infrared spectroscopy and neutron scattering", *J. Solid State Chem.* **1997**, *132*, 6-16
- [Umegaki et al. 89] T. Umegaki, G. H. Nancollas, T. Kanzawa, "Effect of supporting electrolytes on the crystal growth of hydroxyapatite", *Memoirs of Faculty of Tech. Tokyo Metropolitan University* **1989**, *39*, 151-156
- [van den Hoek 80] W. G. van den Hoek, T. P. Feenstra, P. L. de Bruyn,, "Influence of fluoride on the formation of calcium phosphates in moderately supersaturated solutions", *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 3312-3317
- [Vasserman & Silant'eva 65] I. M. Vasserman, N. I. Silant'eva, "Preparation of calcium hydrogen phosphate of stoichiometric composition", *Russ. J. Inorg. Chem.* **1965**, *10* (6), 717-721

-
- [Vignoles et al. 87] M. Vignoles, G. Bonel, R. A. Young, "Occurrence of nitrogenous species in precipitated B-Type carbonated hydroxyapatites", *Calcif. Tissue Int.* **1987**, *40*, 64-70
- [Vignoles et al. 88] M. Vignoles, G. Bonel, W. D. Holcomb, R. A. Young, "Influence of preparation conditions on the composition of type B carbonated hydroxyapatite and on the localization of the carbonate ions", *Calcif. Tissue Int.* **1988**, *43*, 33-40
- [Volkmer 99] D. Volkmer, "Von Biomineralien zu biomimetischen Materialien: der Weg ist das Ziel", *Chemie in unserer Zeit* **1999**, *1*, 6-19
- [Vuola et al. 96] J. Vuola, H. Göransson, T. Böhling, S. Asko-Seljavaara, "Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants", *Biomaterials* **1996**, *17*, 1761-1766
- [Webster et al. 99] T. J. Webster, R. W. Siegel, R. Bizios, "Osteoblast adhesion on nanophase ceramics", *Biomaterials* **1999**, *20*, 1221-1227
- [Weiner & Addadi 97] S. Weiner, L. Addadi, "Design strategies in mineralized biological materials", *J. Mater. Chem.* **1997**, *7* (5), 689-702
- [Weiner et al. 97] S. Weiner, T. Arad, I. Sabanay, W. Traub, "Rotated plywood structure of primary lamellar bone in the rat: orientations of the collagen fibril arrays", *Bone* **1997**, *20* (6), 509-514
- [Weiner & Wagner 98] S. Weiner, H. D. Wagner, "The material bone: Structure-mechanical function relations", *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 271-298
- [Weng & Baptista 98] W. Weng, J. L. Baptista, "Sol-gel derived porous hydroxyapatite coatings", *J. Mat. Sci. - Mat. Med.* **1998**, *9*, 159-163
- [Westbroek & Marin 98] P. Westbroek, F. Marin, "A marriage of bone and nacre", *Nature* **1998**, *392*, 861-862
- [Wippermann 96] B. W. Wippermann, „Hydroxylapatitkeramik als Knochenersatzstoff“, in *Der Unfallchirurg/Hefte* (Hrsg.: L. Schweiberer, H. Tscherne), Springer-Verlag Berlin, Heidelberg **1996**

-
- [Yaszemski et al. 96] M. J. Yaszemski, R. G. Payne, W. C. Hayes, R. Langer, A. G. Mikos, "Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone", *Biomaterials* **1996**, *17*, 175-185
- [Yuan et al 00] H. Yuan, K. Kurashina, J. D. de Bruijn, Y. Li, K. De Groot, X. Zhang, "A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics", *Biomaterials* **2000**, *20*, 1799-1806
- [Zawacki et al. 86] S. J. Zawacki, P.B. Koutsoukos, M. H. Salimi, G. H. Nancollas, "The growth of calcium phosphates", *ACS Symposium Series* **1986**, *322*, 650-660
- [Ziv et al. 96] V. Ziv, H. D. Wagner, S. Weiner, "Microstructure-Microhardness relation in parallel fibered and lamellar bone", *Bone* **1996**, *18* (5), 417-428

15. Präparativer Teil

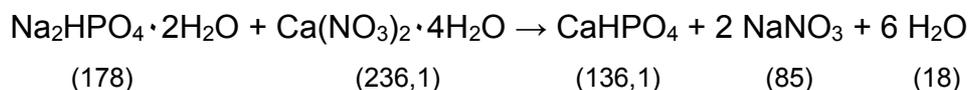
15.1 Darstellung von Calciumhydrogenorthosphat – 2 – hydrat (Brushit)



45 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (250 mmol) und 2,5 g Kaliumdihydrogenorthosphat (18,5 mmol) wurden in 500 ml Wasser aufgelöst. Eine Calciumnitrat-Lösung wurde hergestellt, indem 55 g des Calciumnitrats (250 mmol) in 500 ml Wasser aufgelöst wurden. Diese beiden Lösungen wurden bei Raumtemperatur mittels Tropftrichtern langsam und möglichst gleichzeitig innerhalb von 2-3 Stunden in eine Vorlage, bestehend aus einer Lösung von 5 g Kaliumdihydrogenphosphat in 250 ml Wasser getropft. Mittels eines pH-Meters wurde der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls durch Zutropfen von Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung im Bereich von 4-5 gehalten. Die Kristalle wurden abfiltriert, dreimal mit destilliertem Wasser und einmal mit Ethanol gewaschen. Die Substanz wurde über Nacht im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet [Moeller & Bodnar 53].

Ausbeute: 41.5 g (95.0 %).

15.2 Darstellung von Calciumhydrogenphosphat (Monetit)

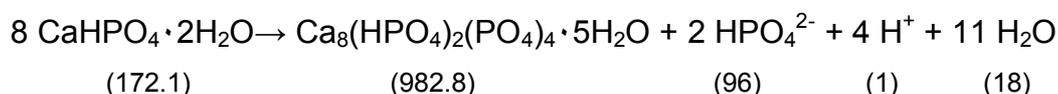


45 g Dinatriumhydrogenphosphat-2-hydrat (250 mmol) und 2,5 g Kaliumdihydrogenorthosphat (18,5 mmol) wurden in 500 ml Wasser aufgelöst. Eine Calciumnitrat-Lösung wurde hergestellt, indem 55 g des Calciumnitrats (250 mmol) in 500 ml Wasser aufgelöst wurden. Diese beiden Lösungen wurden bei 70°C mittels Tropftrichtern langsam und möglichst gleichzeitig innerhalb von 2-3 Stunden in eine Vorlage, bestehend aus einer Lösung von 5 g Kaliumdihydrogenphosphat in 250 ml Wasser ge-

tropft. Mittels eines pH-Meters wurde der pH-Wert gemessen und gegebenenfalls durch Zutropfen von Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung im Bereich von 4-5 gehalten. Die Kristalle wurden abfiltriert, dreimal mit destilliertem Wasser und einmal mit Ethanol gewaschen. Die Substanz wurde über Nacht im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet [Moeller et al. 53].

Ausbeute: 29.8 g (87.6 %).

15.3 Darstellung von Octacalciumphosphat



10 g Calciumhydrogenorthosphat-2-hydrat (Brushit, 58 mmol) wurden in einem auf 35 - 40°C thermostatisierten Gefäß zu 100 ml einer 0.1 molaren Natriumacetat-Lösung zugegeben und gerührt. Mittels eines pH-Meters wurde der pH-Verlauf überwacht. Die Natriumacetat-Lösung wurde ausgetauscht, sobald der pH-Wert unter pH 4.5 gefallen war. Nach 12 Stunden Reaktionszeit war keine Veränderung des pH-Werts mehr beobachtbar. Die konvertierte Substanz wurde abfiltriert, zweimal mit destilliertem Wasser und einmal mit Ethanol gewaschen und über Nacht im Exsikkator über Calciumchlorid getrocknet [Newesely 60].

Ausbeute: 5.5 g (77.1 %).

15.4 Darstellung von amorphem carbonathaltigen Calciumphosphat (Carbonat-ACP)

Eine Vorlage aus 250 ml 0,0108 M KH_2PO_4 -Lösung (0,356 g) mit wechselnden Anteilen K_2CO_3 (berechnet nach C/P: C/P=1 bedeutet 100% K_2CO_3 gemessen am Anteil Phosphat-Lösung, also 0,0108 M K_2CO_3) wurde mittels 0,1 M KOH auf pH 10 gebracht. In diese Vorlage wurde schnell 250 ml 0,018 M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,063 g) – Lösung gegeben. Der Niederschlag wurde über einen Blaubandfilter abfiltriert, wobei das Filtrat weitere zwei mal durch den Filterkuchen filtriert wurde. Die Substanz wurde anschließend 12 h bei 80°C getrocknet.

Ausbeute: 478 mg. Eine prozentuale Ausbeute war nicht bestimmbar, da das Produkt nicht eindeutig stöchiometrisch definierbar war (vgl. Kap. 3.3.3. und Kap. 3.3.4).

15.5 Herstellung einer übersättigten Calciumphosphat-Lösung

In ein sehr sorgfältig gesäubertes thermostatisierbares Gefäß (zunächst mit Salzsäure, dann mit Aceton gesäubert und mit einem fusselreien Tuch getrocknet) wurde 24 ml 0,1 N KNO_3 -Lösung eingefüllt. Mittels eines Thermostaten wurde die Lösung auf 37°C erwärmt. Danach wurde mittels einer Eppendorf-Pipette 3 ml 18 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ -Lösung in diese Vorlage eingebracht und auf dem Magnetrührer bei mittlerer Geschwindigkeit gerührt. Nach wenigen Minuten wurde dazu, ebenfalls mit einer Eppendorf-Pipette, 3 ml 10,8 mM KH_2PO_4 -Lösung gegeben. Daraufhin wurde die Lösung mittels Zugabe von 0,01 M KOH oder verdünnter HNO_3 (p.a.) auf den gewünschten pH-Wert (7.4) gebracht.

15.6 Durchführung eines CC-Versuchs

Nach dem Einschalten des VISIDAQ-Programms „CC-HALB“ wurde der gewünschte pH-Wert und der Wert der Calcium-Elektrode (in mV) eingestellt. Nach schneller Zugabe von 100 mg Keimkristallen (HAP von Merck) startete die Kristallisation unverzüglich, sichtbar am Absinken des pH-Wertes und der Spannung der Calcium-Elektrode. Mittels zweier Peristaltic-Pumpen (eine zum Zugeben von 0.01 M KOH zum Konstanthalten des pH-Werts, die zweite zum Zutitrieren von 18 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ und 10.8 mM KH_2PO_4 , jeweils in 0.1 N KNO_3 -Lösung) wurden die Konzentrationen im Reaktionsgefäß stets konstant gehalten.

Nach einer Stunde Reaktionszeit wurde das Programm abgeschaltet, die Kristalle abfiltriert, zweimal mit destilliertem Wasser und einmal mit Ethanol gewaschen. Das Produkt wurde 12 Stunden lang im Trockenschrank bei 80°C getrocknet.

15.7 Phosphat-Bestimmung mittels Photometrie

Zur Bestimmung des Phosphat-Gehaltes einer Lösung mittels Photometrie wurden drei Lösungen hergestellt und im Kühlschrank aufbewahrt:

Lösung 1: In 20 ml Wasser wurden 10 ml HNO_3 (65% p.a.) gegeben.

Lösung 2: 2.5 g Ammonium-*meta*-vanadat (NH_4VO_3 , p.a.) wurden in 500 ml siedendem Wasser gelöst. Nach dem Erkalten wurden 20 ml HNO_3 (65% p.a.) zugegeben und auf 1000 ml aufgefüllt.

Lösung 3: 50 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, p.a.) wurden in 800 ml Wasser gelöst, welches zuvor auf 50°C erhitzt wurde. Nach dem Abkühlen wurde die Lösung auf 1000 ml aufgefüllt.

Zu Beginn der Phosphat-Bestimmung wurden jeweils 5 ml der Lösungen 1, 2 und 3 in dieser Reihenfolge zusammengegeben. Die Lösung war klar und schwach gelblich gefärbt. 1 ml der zu untersuchenden Lösung wurden in eine 25 ml-Küvette gegeben und mit destilliertem Wasser auf 25 ml aufgefüllt. Dazu wurde 1 ml der Molybdovanadat-Reagenz gegeben. Nach einer Reaktionszeit von drei Minuten wurde die Lösung bei 430 nm Wellenlänge mit einem programmierbaren Spektrophotometer vermessen. Die Nachweisgrenzen lagen bei 1-25 mg/l PO_4^{3-} [Hach 91].

16. Beschreibungen und Unterprogramme von VISIDAQ

Dieser Teil beschreibt detailliert die verschiedenen Unterprogramme (im VISIDAQ-Jargon „*Strategy*“ genannt), die im Rahmen der computerkontrollierten Calciumphosphat-Kristallisationsversuche entstanden sind. Sie sollen darüber hinaus auch eine Gebrauchsanweisung für die Bedienung derselben darstellen.

16.1 Das Programm „KALIBRA“

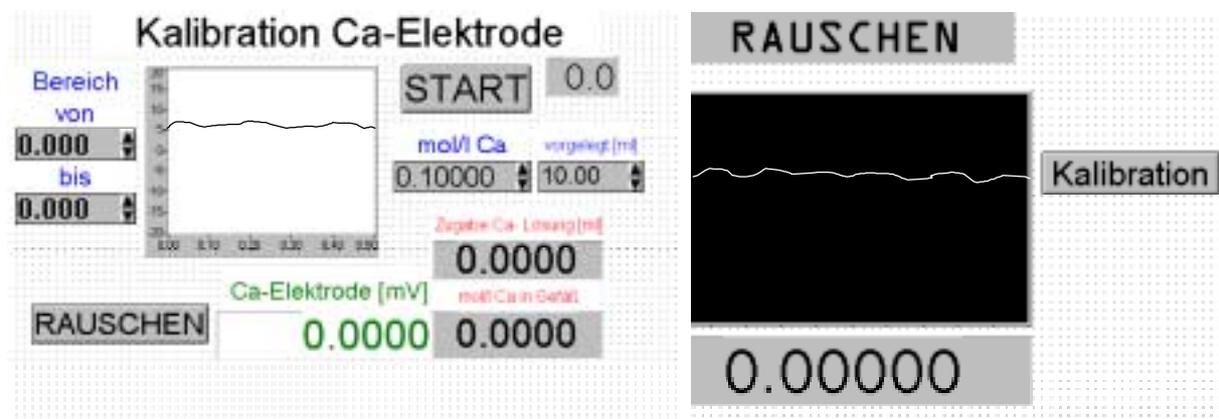


Abb. 16.1: Benutzeroberflächen der Strategie KALIBRA. Links: Eingaben der Kalibrationsbereiche und Lösungsmolaritäten, rechts: Anzeige des Ca-Elektrodenrauschens.

Mit dem Programm KALIBRA ist es möglich, die Calcium-Elektrode automatisch zu kalibrieren. Dabei wird eine definierte Menge destilliertes Wasser oder Calcium-Lösung vorgelegt und in diese die Ca-Elektrode eingetaucht. Eine Peristalticpumpe mit einer Calcium-Kalibrationslösung pumpt alle 10 Sekunden eine kleine Menge Ca^{2+} -Lösung in die Vorlage hinein, deren Calcium-Konzentration sich dadurch erhöht. Diese Konzentrationserhöhung wird von dem Programm automatisch berechnet. Der Calcium-Elektrodenwert in mV und die Molarität der Vorlage werden auf die Computerfestplatte gespeichert (Abb. 9.4). Mit Hilfe einer Tabellenkalkulation lassen sich aus diesen Daten sehr einfach genaue logarithmische Darstellungen der Calcium-Kalibration gewinnen (Abb. 9.5).

16.1.1 Arbeitsanweisung

1. An die Peristalticpumpe, die zur Zugabe der Calciumlösung benutzt wird, wird eine Calcium-Lösung definierter und genau eingewogener Molarität angeschlossen.
2. Die Konzentration dieser Ca^{2+} -Lösung (in mol/l) wird in den Nummernblock „mol/l Ca“ (Abb. 16.1 linkes Bild, rechts oben) eingetragen.
3. In ein 100 ml Becherglas wird eine beliebige Vorlage gegeben. Soll ab 0 mol Ca^{2+} kalibriert werden, so werden 10 ml Wasser vorgelegt. Sollte ab einem beliebigen anderen Wert kalibriert werden, so werden 10 ml der gewünschten Ca^{2+} -Lösung in Startkonzentration vorgelegt.
4. In die Nummernblocks „Bereich von“ (Abb. 16.1 links oben) wird die Molarität der Vorlage eingegeben, in den Nummernblock „bis“ der Bereich in mol/l, bis zu dem kalibriert werden soll. In den Nummernblock „vorgelegt [ml]“ wird die Menge der Vorlage eingetragen.
5. Danach wird die Calcium-Elektrode in die Lösung eingetaucht und der Auslaß-Schlauch der Peristalticpumpe in das Becherglas gehängt.
6. Nach dem Drücken des „START“-Knopfes verläuft die Kalibration automatisch. Die Nummernblocks rechts unten auf der linken Abbildung zeigten die zugepumpte Menge Calcium-Lösung und die aus der Verdünnung durch die Vorlage berechnete Molarität. Das Kurvendisplay in der Mitte zeigte den gedämpften Verlauf der Calcium-Elektrode. Ein Mausklick auf den Knopf „RAUSCHEN“ führt zu der zweiten Bildschirmoberfläche, auf der man das ungedämpfte Signal der Calcium-Elektrode verfolgen konnte. War dieses Rauschen zu groß, so können Maßnahmen dagegen ergriffen werden. Ein Mausklick auf den Knopf „Kalibration“ führt zurück zur Kalibrationsoberfläche.
7. Ist der Soll-Calcium-Wert (eingetragen im Nummernblock „bis“) erreicht oder überschritten, so schaltet sich das Programm automatisch aus. Die Kalibrationsdaten sind unter den Unterverzeichnissen: D:\LOG_FILES\TEMP\KALI###.LOG zu finden. Die sogenannten *wildcards* (###) bedeuten dabei eine dreistellige fortlaufende Nummer. Die erste Kalibration auf dem Unterverzeichnis hat demnach den Filenamen KALI000.LOG. Sobald ein Dateiname mit einer solchen Wildcard-Nummer besetzt ist, wird die Datei unter der nächsten fortlaufenden Nummer ab-

gespeichert. Die Daten des Rauschens der Calcium-Elektrode sind unter dem Unterverzeichnis D:\LOG-FILES\TEMP\RAU###.LOG zu finden.

Für die Kalibration wird alle 10 Sekunden ein Wert gespeichert, danach Calcium-Lösung zugepumpt und wiederum nach 10 Sekunden ein weiterer Wert gespeichert. Für die Aufnahme des Rauschens wird alle 55 ms der Spannungswert der Calcium-Elektrode gespeichert.

16.1.2 Die Programmierung

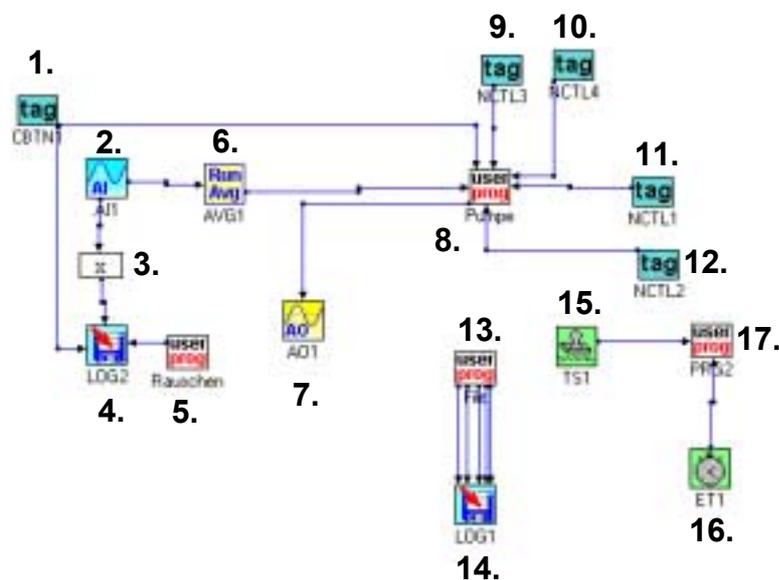


Abb. 16.2: Die ICON-Steuerung des KALIBRA-Programmes

Ist der Startknopf **1.** gedrückt, so werden von dem Analogeingang **2.** die Werte der Calcium-Elektrode in **3.** mit 1000 multipliziert. Alle 55 ms wird mittels des Datenspeicherblocks **4.** ein mV-Wert der Calcium-Elektrode auf die Computerfestplatte geschrieben. Gleichzeitig wird durch den Programmblock **5.** die fortlaufende Nummer dieses Ca-Elektrodenwertes geschrieben (Anzahl der Datenzeilen). Ein AVERAGE-Block **6.** berechnet den gleitenden Durchschnitt aus 10 Werten, bevor diese Werte in den Programmblock gelangen. Die eingegebenen Werte des Bereiches der Calcium-Kalibration von (**9.**) bis (**10.**), gemessen in mol sowie die ebenfalls über die Nummernblocks in Abb. 11.1 eingegebenen Werte des Vorlagevolumens (**11.**) und der Zugabekonzentration (**12.**) werden im Programmblock **8.** miteinander verglichen und

entsprechende Signale an die Peristalticpumpe **7.** gegeben. Aus dem Zeitblock **15.**, der Werte im Tageszeit-Format („14:32:15,38“) übergibt, werden im Programmblock **17.** ab der 7. Stelle 5 Werte entnommen (Aus „14:32:15,38“ wird somit „15,38“) und diese in eine Fließkommazahl umgewandelt. Diese wird im Programmblock **8.** daraufhin überprüft, ob sie durch 10 teilbar ist, was in allen 10 Sekunden der Fall ist. Ist diese Zahl durch 10 teilbar, werden, gesteuert über eine Kontrollvariable, im Programmblock **13.** die Kalibrationswerte nach dem Format von Abbildung 9.4 dem Dateiblock **14.** übergeben, der diese Werte, inklusive der Laufzeit des Programmes aus dem Zeitblock **16.** auf die Computerfestplatte schreibt.

16.1.2.1 Inhalte der Benutzerprogrammblöcke

1. Pumpensteuerung (8.)

```

s=TAG2;           // START-Knopf (1.)
m=TAG1;           // Molarität Ca-Lösung (11.)
u=AVG1;           // Spannung aus Ca-Elektrode (6.)
u1=u*1000;        // aus 0,001V mache 1mV
v=TAG3;           // Vorlagemenge (12.)
v1=TAG5;          // Kalibration VON (10.)
b1=TAG4;          // Kalibration BIS (9.)
output(#3,u1);    // Ausgabe des mV-Wertes auf Display
if (v1>0 && n<v1) // ist Kalibration VON > 0
{
  k4=0;           // und Molarität in Vorlagegefäß < Kalibration BIS ?
  u2=1;           // Kontrollvariable, die bestimmt ob Daten gespeichert werden
}                 // Voltzahl für Peristalticpumpe (7.) auf 1 setzen
else              // Ende IF Kalibration von>0<BIS
  k4=1;           // Ist dem nicht so ?
if (s==1)        // Kontrolle 4 auf 1 (=TRUE) setzen ==> keine Bewegung der Pumpe
  // Start betätigt ?
  {
    // Anfang Sequenz IF Start betätigt
    if (k4==0)    // ist Kontrolle 4 auf null (=FALSE)?
    {
      // Anfang Sequenz IF Kontrolle 4 auf null
      output(#5,u2); // u2 Volt auf Peristalticpumpe geben
      z=z+(3.014/60)*0.055*u2; //zugegebene Menge in ml (aus Kalibration)
      output(#0,z); // Wert z [ml] wird auf Display geschrieben in „Zugabe Ca-Lösung [ml]“
      n=((z*m)/(v+z)); // mol/l nun in Vorlage aus diesen Werten berechnet
      output(#1,n); // Schreiben des mol/l-Wertes der Vorlage auf Display
      if (n>=v1) // ist mol/l gleich Vorgabe, bis zu welchem Wert kalibriert werden
      {
        // soll (Bereich bis) ? Dann... Anfang IF mol/l gleich Vorlage
        k4=1; // Kontrolle 4 auf 1 (=TRUE)
        output(#5,0); // Peristalticpumpe STOP
      }
    } // Ende IF mol/l gleich Vorlage
  } // Ende Sequenz IF Kontrolle 4 auf null

```

```

if (d1==0) // Wenn Anzahl der gespeicherten Daten = 0
{ // Dann mV-Wert für 0 mol Calcium abspeichern
  k=1; // Kontrollvariable null auf 1 (=TRUE) ==> es kann gespeichert werden
  t4=1; // Zeitvariable 4 auf 1 setzen
} // Ende Sequenz IF Anzahl gespeicherte Daten = 0
if ((t2<(t3+t4)) && (k4==1)) // Ist die Zeit 2 kleiner als Zeit 3+Zeit 4 und Kontrolle 4 auf TRUE
{ // Anfang IF
  if (k3==0) // Wenn Kontrolle 3 auf FALSE
  { // Anfang Kontrolle 3 auf FALSE
    u2=1; // Spannung u2 für Ca-Pumpe auf 1 Volt
    if (u2>5) // Wenn Spannung u2 größer 5
    { // Anfang IF u2 größer 5
      u2=5; // Dann Spannung gleich 5
      t4=t4+1; // Zeitvariable 4 plus eine Sekunde
    } // ende IF u2 größer als 5
    else // wenn Spannung nicht größer als 5 V sein soll
      t4=1; // Zeitvariable 4 auf 1 Sekunde
    k3=1; // Kontrolle 3 auf TRUE
  } // Ende IF Kontrolle 3 auf FALSE
  k=0; // Kontrollvariable null auf null (FALSE) ==> nicht speichern
  z=z+(3.014/60)*0.055*u2; // zugegebene Menge in ml pro Sekunde aus Pumpenkalibration
  output(#5,u2); // 1 sec lang mit u2 V zutropfen
  output(#0,z); // Wert z in ml auf Bildschirm schreiben
  n=((z*m)/(v+z)); // Berechnung mol/l nun in Lösung
  output(#1,n); // mol/l in Lösung auf Bildschirm schreiben
} // Ende Zeitvariablenabfrage
else // wenn Zeitvariablenabfrage nicht erfüllt ist
{
  output(#5,0); // Ca-Pumpe auf 0 Volt
  output(#2,u1); // mV der Ca-Elektrode auf Display schreiben
  k3=0; // Kontrolle 3 auf FALSE
  if(t2==(t3+(t4+10))) // Wegen Rauschen der Ca-Elektrode 10 Sekunden warten
  { // dann...
    k=1; // Kontrolle 0 auf TRUE
    t3=t2; // Wert Zeitvariable 2 auf Zeit 3 setzen
    if(n>=b1) // wenn mol/l in Lösung größer oder gleich Kalibration BIS
    {
      stop; // Programmstop
    }
  } // Ende IF 10 Sekunden warten
}
}
}
else // wenn START nicht betätigt
{
  t3=t2; // Wert Zeitvariable 2 auf Zeit 3 setzen
  output(#5,0); // 0 Volt auf Pumpe
}
}

```

2. Ausgabe des Elektrodenrauschens (5.)

```
output(#1,n);           // Ausgabe des mV-Wertes der Calcium-Elektrode auf Festplatte
```

3. Speicherung der Kalibrationswerte (13.)

```
if (k==1)              // Ist Kontrolle 0 auf 1 gesetzt (TRUE)?
{
  d1=d1+1;             // Kontrollvariable Anzahl der Daten gespeichert
  k=0;                 // Kontrollvariable 0 auf Null (FALSE) setzen
  output(#0,1);        // (open control) Öffnen der Datei
  output(#1,1);        // (data logging LOG ON File) Einschalten der Speichersequenz
  output(#2,t2);       // Programmlaufzeit in Datei schreiben
  output(#3,n);        // Molarität der Vorlage in Datei schreiben
  output(#4,u1);       // Spannung der Calcium-Elektrode [mV] in Datei schreiben
}
else
{
  output(#1,0);        // (close control) Schließen der Datei
  k1=k1+1;
  output(#2,k1);
}
```

4. Steuerung der Zeitkontrollen 17.

```
a=TS1;                // Realzeit aus 15. in Format (hh:mm:ss,zh) in a übergeben
b=substr(a,7,5);      // Aus Wert a an Stelle 7 fünf Zeichen entnehmen und b übergeben (=“ss,zh“)
t=float(b);           // b (STRING-Format) in eine Fließkommazahl überführen
t2=ET1;              // Programmlaufzeit aus 16. in t2 übergeben
```

16.2 Das Programm „pH-MESS“

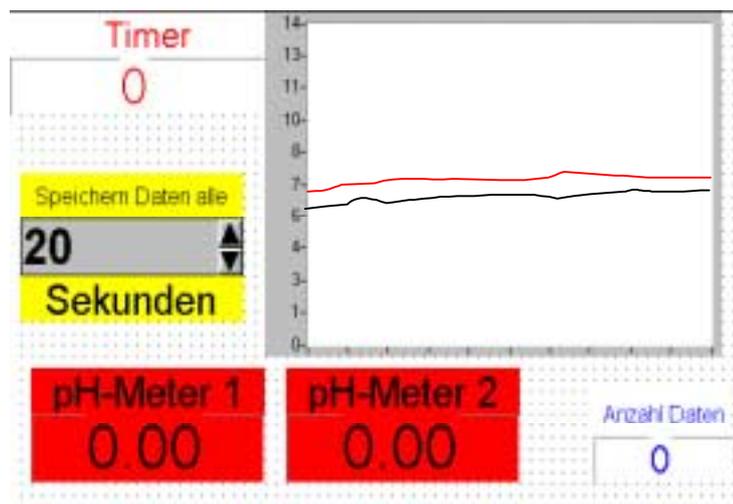


Abb. 16.3: Benutzeroberfläche des pH-MESS-Programms

Das Programm PH-MESS dient dazu, Langzeit-pH-Verläufe von zwei unabhängigen Meßgütern automatisch zu erfassen und zu dokumentieren. Mittels eines Thermostaten können diese pH-Verläufe temperaturstabil aufgezeichnet werden. Je nachdem, welche Zeitauflösung erforderlich ist, kann die Zeitperiode, die verstreicht, ohne daß Daten auf die Computerfestplatte gespeichert werden, länger oder kürzer eingestellt werden. Ein Trenddisplay (Abb. 16.3 rechts oben) zeigt die pH-Werte der letzten 2 Stunden an. Ein Nummerndisplay (rechts unten) ergibt Aufschluß über die Anzahl der bisher auf die Computerfestplatte gespeicherten Daten. Neben der Zeit und den zwei pH-Wert-Verläufen werden auch die Temperaturverläufe unter D:\LOG-FILES\PH####.LOG gespeichert.

16.2.1 Arbeitsanweisung

1. Ein Aliquot Wasser, in welchem die Glasmembran der pH-Elektrode voll benetzt ist (50-100 ml), wird in ein thermostatisierbares Glasgefäß eingefüllt und auf die gewünschte Temperatur gebracht (meist physiologische 37°C).
2. Das Meßgut (z.B. pulverförmiges Calciumphosphat, Polymer-Preßlinge) wird nach dem Temperieren des Wassers dazugegeben.
3. Nachdem die pH-Elektroden eingetaucht worden waren, wird das Programm gestartet und mittels des Nummernblocks „Speichere Daten alle 20 Sekunden“ (Abb. 13.3 links oben) eingestellt, wie oft Daten gespeichert werden sollen.

4. Am Ende der Messung wird das Programm abgeschaltet.

16.2.2 Die Programmierung

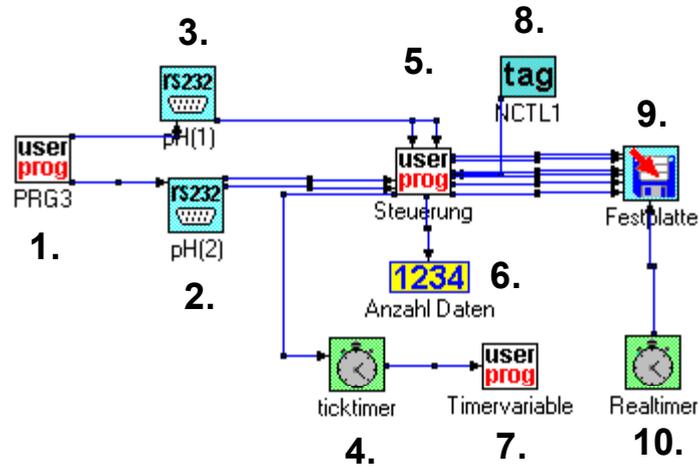


Abb. 16.4: Icon-Steuerung des Programmes PH-MESS.

Durch den Programmblock **1.** wird gewährleistet, daß die pH-Meter nötigenfalls eingeschaltet werden. Weiterhin werden von dort aus auch die Signale zur Übermittlung des pH-Wertes und der Temperatur zu den beiden RS 232-Blocks **2.** und **3.** übergeben. Dabei werden Signale erzeugt, die einen Tastendruck auf das jeweilige pH-Meter simulieren. Gesteuert durch den Nummernblock **8.** wird in der Steuerung **5.** die Frequenz festgelegt, mit der die Daten auf die Computerfestplatte **9.** gespeichert werden. Dabei wird ein Sekundentimer **4.**, der bei Programmstart auf Null zurückgesetzt wird, als Vergleich verwendet. Auf der Festplatte **9.** werden die Daten der pH-Meter und die Realzeit aus **10.** in der von **8.** festgelegten Zeitperiode gespeichert. Ein Ereigniszähler **6.** addiert die Anzahl der Festplattenzugriffe auf und gibt so Aufschluß über die Anzahl der Daten. Die Daten werden in numerischer Reihenfolge auf D:\LOG-Files\pH####.log gespeichert.

1. Die Steuerung der pH-Meter **1.**

```
x="K.7";           // „K.7“ in x übergeben = Tastendruck auf Taste 7 (stimuliert Datenübertragung)
y="K.9";           // „K.9“ in y übergeben = Druck auf Taste 9 (stimuliert Einschalten pH-Meter)
sprintf(x1,"%s\r",x); // an x noch ein <ENTER> anhängen und in x1 übergeben
sprintf(y1,"%s\r",y); // an y noch ein <ENTER> anhängen und in y1 übergeben
if (p1==0 & t>(v-2)) // ist der pH-Wert des Gerätes 1 nicht null (also pH-Meter EIN) UND die Zeit
output(#0,y1);      // zwei Sekunden vor Vorgabe Speicherfrequenz (Anlaufzeit), dann y1 an pH-
```

```

// Meter senden
else // wenn dem nicht so ist (also pH-Meter 1 AUS)
output (#0,x1); // EINSCHALTEN pH-Meter 1
if (p2==0 & t>(v-2)) // ist der pH-Wert des Gerätes 2 nicht null (also pH-Meter EIN) UND die Zeit
output (#1,y1); // zwei Sekunden vor Vorgabe Speicherfrequenz (Anlaufzeit), dann y1 an pH-
// Meter senden
else // wenn dem nicht so ist (also pH-Meter 2 AUS)
output (#1,x1); // EINSCHALTEN pH-Meter 2

```

2. Die Steuerung der Speichersequenz 5.

```

p1=FLOAT(SER1[2]); // Fließkommazahl aus zweiter Zeichenfolge des pH-Meters 1 (=pH-Wert)
p2=FLOAT(SER2[2]); // Fließkommazahl aus zweiter Zeichenfolge des pH-Meters 1 (=pH-Wert)
v=TAG1; // Vorgabe der Speicherfrequenz aus Nummernblock in v übergeben
if (t>=TAG1) // Ist die Zeit des Timers 4. größer oder gleich dieser Vorgabe?
{ // d.h. ist es Zeit, eine Zeile pH-Wert zu speichern?
if (p1!=0 & p2!=0) // sind beide pH-Werte nicht null, also pH-Meter angeschaltet?
{
output (#3,1); // (LOG ON FILE) Einschalten Speichersequenz
output (#4,1); // (OPEN FILE) Öffnen der Datei
output (#1,p2); // pH(2) auf Datei
output (#2,p1); // pH(1) auf Datei
output (#5,SER1[3]); // Temperatur(2) auf File
output (#6,SER2[3]); // Temperatur(1) auf File
}
output (#0,1); // Timer 4. auf Null zurückstellen (reset)
} // Ende der Speichersequenz
else // Ist es NICHT Zeit zu speichern?
{
output (#3,0); // (LOG OFF FILE) Ausschalten Speichersequenz
output (#0,0); // Timer 4. Signal geben
} // Ende If-Sequenz wenn nicht gespeichert wird

```

3. Übergabe der Timervariable 7.

```

t=ET1; // Übergabe der Zeit in Sekunden von Zeitgeber 4. in die Variable t

```

16.3 Das Programm „CC-HALB“

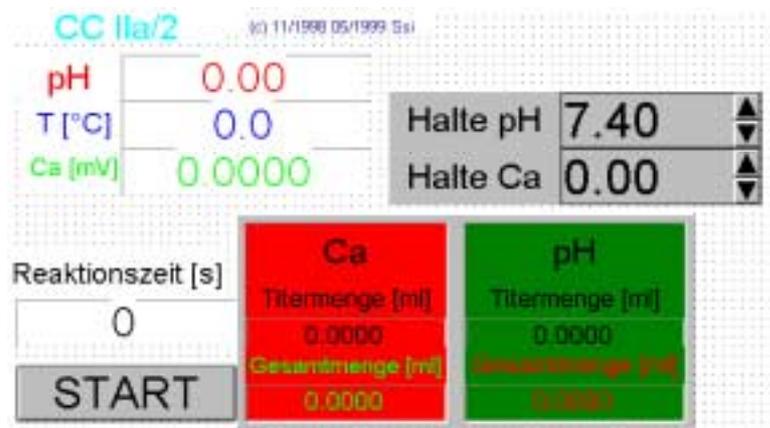


Abb. 16.5: Graphische Benutzeroberfläche des VISIDAQ-Programmes „CC-HALB“

Mit dem Programm „CC-HALB“ können Kristallisationsversuche unter *Constant Composition* (CC) Bedingungen durchgeführt werden. Eine bezüglich eines schwerlöslichen Calciumsalzes (Calciumcarbonat, Calciumphosphat) übersättigte Lösung wird vorgelegt. Mittels eines Starters (zugegebene Keimkristalle, Eintauchen von Metalloberflächen) wird die Kristallisation eingeleitet. Dadurch sinkt der Calcium-Wert und der pH-Wert unter die Vorgabe und Peristalticpumpen führen der Vorlage frische $\text{Ca}^{2+}/\text{PO}_4^{3-}$ - und KOH-Lösung zu, um die Werte wieder in den Vorgabebereich zu bringen. Über den Vergleich des Sollwertes der Calcium-Elektrode mit dem Istwert wird über eine zweikanalige Peristalticpumpe auch Phosphat-Lösung im Verhältnis $\text{Ca}/\text{P} = 5:3$ zugepumpt. Die Menge der zugepumpten Lösungen, der pH- und der Calcium-Elektrodenwert (in mV) werden ständig in eine Datei geschrieben. Aus diesen so gewonnenen Kurven (Abb. 8.2 rechts) lassen sich halbquantitativ Aussagen über die Kristallwachstumsgeschwindigkeit und/oder Inhibitionseffekte zugesetzter Additive gewinnen.

16.3.1 Arbeitsanweisung für einen Calciumphosphat-CC-Versuch

1. Zunächst wird eine übersättigte Calciumphosphat nach den Anweisungen im präparativen Teil (Kapitel 15.5) in einem sorgfältig gesäuberten, thermostatisierten Glasgefäß hergestellt.
2. In diese übersättigte Calciumphosphat-Lösung werden die ebenfalls sehr sorgfältig gesäuberten pH- und Ca-Elektroden getaucht.

3. Mittels stark verdünnter HNO₃- und/oder 0.01 M KOH-Lösung wird der gewünschte pH-Wert eingestellt.
4. Der durchschnittliche Calcium-Wert in mV, der auf dem Bildschirm nun zu sehen ist (die Werte schwanken um einen durchschnittlichen Wert, siehe auch Kapitel 9.1.3.2) wird in den Nummernblock „Halte Ca“ eingetragen.
5. Der gewünschte pH-Wert, den das Programm konstant halten soll, wird in den Nummernblock „Halte pH“ eingetragen.
6. Nachdem der pH-Wert nochmals von Hand auf den gewünschten Wert eingestellt wurde, wird mittels Druck auf den START-Knopf die Steuerung eingeschaltet.

Zugabelösungen bei einer übersättigten Calciumphosphat-Lösung, hergestellt nach dem präparativen Teil:

pH-Pumpe: 0,01 M KOH

Ca²⁺-Pumpe: 18 mM Ca(NO₃)₂·4H₂O + 0,1 N KNO₃

PO₄³⁻-Pumpe: 10,8 mM KH₂PO₄ + 0,1 N KNO₃

16.3.2 Die Programmierung

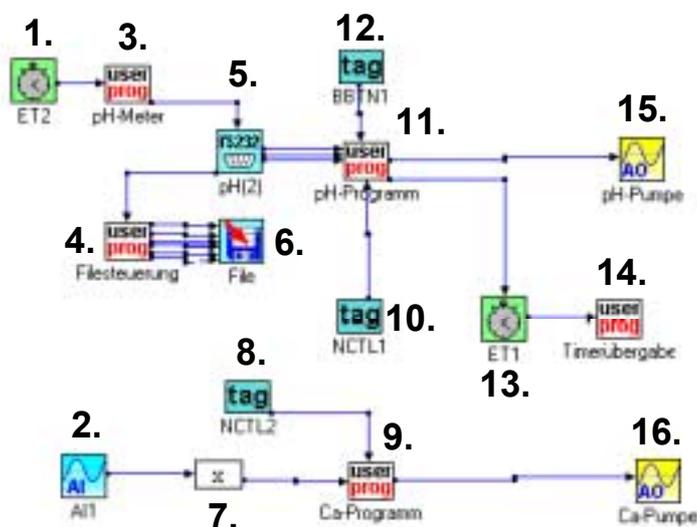


Abb. 16.6: Icon-Steuerung des Programmes „CC-HALB“

Da das pH-Meter **5.** durch Datenüberlauf bei zu hohen Datenmengen ausfallen kann, ist es nötig, eine ständige Kontrolle über die einwandfreie Funktion des Gerätes aus-

zuüben. Gesteuert durch die Zeituhr **1.** werden im pH-Meter-Steuerprogramm **3.** Signale generiert, die das pH-Meter, welches über einen RS 232-Block **5.** angeschlossen ist, ein- und ausschalten sowie kontrollieren und Datenübermittlung initiieren. Weiterhin wird abgefragt, ob sich die interne Uhrzeit des pH-Meters verändert, was nicht der Fall ist, wenn die Funktion des pH-Meters nicht korrekt ist (dazu näheres in den Kommentaren der Steuerungsprogrammssyntax). Ist der Startknopf **12.** gedrückt, wird der pH-Wert aus **5.** mit dem eingegebenen Soll-pH-Wert aus **10.** verglichen, um gegebenenfalls beim Sinken des pH-Wertes gemäß der Reaktionsgleichung [8.6] (Kapitel 8.2) ein Signal an die KOH-Pumpe **15.** zu geben. Das Signal der Calcium-Elektrode **2.** wird im Rechenblock mit 1000 multipliziert, um aus dem Volt-Signal einen Millivolt-Wert zu erhalten. Im Programmblock **9.** wird das Signal mit dem Sollwert aus **8.** verglichen und gegebenenfalls ein Signal an die Ca/PO₄-Pumpe **16.** gegeben, um das Calcium-Elektrodensignal wieder auf den Sollwert zu bringen. Ist der Startknopf **12.** nicht gedrückt, so wird über den Programmblock **11.** die Zeituhr **13.** ständig auf den Nullwert gesetzt. Sobald das Programm gestartet wurde, werden jede Sekunde die Werte über den Programmblock **4.** auf die Computerfestplatte **6.** gespeichert.

1. Die Steuerung des pH-Meters (**3.**)

```

t2=ET2;           // Übergabe Zeituhr 1. in t2
a = "K.7";        // Signal „K.7“ (Knopfdruck auf Knopf 7 des pH-Meters) auf a
if (k!=1)         // START-Knopf betätigt ? Wenn nein, dann...
  t5=t;           // Zeitvariable t aus 13. in t5 übergeben
if (t>(t5+100))   // Sind 100 Sekunden vergangen seit Zeitvariable übergeben?
{
  // Beginn IF-Prozedur
  a="K.18";       // alle 100 sec zur Kontrolle Gerätekennung senden lassen
  output (#7,"K.18"); // Es kommt bei einwandfreier Funktion des Geräts „K.18“ zurück
  t5=t;           // Übergabe t in t5
  z1=1;           // Kontrolle z1 auf 1 (TRUE) setzen
  t4=t;           // Übergabe t in t4
}
// Ende IF-Prozedur
else
{
  // Beginn ELSE-Prozedur
  if (t>t4+3)     // Sind seit Übergabe t4 3 Sekunden vergangen?
    z1=0;         // Kontrolle z1 auf null setzen (FALSE)
  // Ende ELSE-Prozedur
}
if (t>(t1+60))   // Sind 60 Sekunden vergangen seit Übergabe von t in t1?
{
  // Beginn IF-Prozedur
  if (y==x1 && z1==0) // Hat sich Uhrzeit des pH-Meters bei letzter Abfrage vor 60 sec nicht verändert

```

```

    {
        a = "K.9";
    }
t1=t;
y=x1;
}
if (p==0 && t2>(t3+5))
{
if (z1==0)
{
a="K.9";
t3=t2;
}
}
sprintf(a1,"%s\r",a);
output (#1,a1);
x1=substr (x,18,5);

```

// UND Ist Kontrolle z1 auf FALSE, d.h. kein Konflikt mit 100 sec-Abfrage?
// Dann pH-Meter ausschalten!
// Ende IF-Prozedur Uhrzeitabfrage
// Zeitvariable t aus 13. in t1 übergeben
// Zeit aus pH-Meter (=x1) in y übergeben
// Ende IF-Prozedur der 60-Sekunden-Abfrage
// Ist pH-Meter aus UND 5 Sekunden vergangen (pH-Meter braucht beim Ein
schalten Zeit)?
// Beginn IF pH-aus
// Ist Kontrolle z1 auf FALSE (d.h. keine andere Abfrage z.Zt. im Gange?)
// Beginn IF der Kontrolle z1
// Dann pH-Meter einschalten
// Zeit t2 in Variable t3 übergeben
// Ende IF Kontrolle z1
// Ende IF pH-Meter aus
// an STRING-Variable a ein <ENTER> anfügen und in a1 übergeben
// Signal „K.7“, K.9“ oder „K.18“ + <ENTER> an pH-Meter 5. übergeben
// Aus Uhrzeit/Datum an 18. Stelle 5 Werte herausnehmen (=mm:ss)

2. Dateisteuerung (4.)

```

t5=SER1[3];
if (k==1 && p!=0)
{
output (#0,1);
m=(2.993*s)/60;
g=g+m;
c2=(3.014*c1)/60;
g1=g1+c2;
output (#1,t);
output (#2,p);
output (#3,t5);
output (#4,c);
output (#5,g1);
output (#6,g);
}
else
{
output (#0,0);
}

```

// Temperatur vom pH-Meter
// Ist START-Knopf gedrückt und Signal vom pH-Meter vorhanden?
// Beginn IF-Prozedur
// Einschalten der Speichersequenz (LOG ON File)
// ml-Menge der pH-Pumpe im 1sec-Scan schreiben
// gesamte ml-Menge pH-Pumpe PO4-Seite bisher zutitriert
// ml-Menge im 1sec-Scan Ca-Pumpe
// gesamte ml-Menge Ca bisher zutitriert
// Reaktionszeit auf Disk
// pH auf Disk
// Temperatur auf Disk
// U[mV] von Ca-Elektrode auf Disk
// Gesamttitermenge Ca-Pumpe auf Disk
// Gesamttitermenge pH-Pumpe auf Disk
// Ende IF-Prozedur
// wenn Startknopf nicht gedrückt und/oder pH-Meter aus ist
// Speichersequenz ausschalten (LOG OFF File)

3. Programmeinheit zum Konstanthalten des Calcium-Wertes (9.)

```

c=SOC1;
w=TAG3;
output(#3,m);
output(#2,g1);

```

// U Ca-Elektrode in mV
// Vorgabespannung Ca-Elektrode
// Zutitrierte Menge KOH auf Display
// Zutitrierte Menge Ca auf Display

```

if(k==1)           // START-Knopf betätigt?
{                 // Beginn IF Startknopf
if (c<w)          // Ist Spannung Ca-Elektrode kleiner Vorgabewert?
{               // Beginn IF Ca kleiner Vorgabe
c1=c1+0.5-d1;    // Ca-Pumpenspannung um 0,5 V minus Dämpfung (aus pH-Sequenz) steigern
output (#0,c1); // Wert c1 als Volt an Ca-Pumpe geben
}              // Ende IF Ca kleiner Vorgabe
else
{               // Ist Ca-Wert nicht kleiner Vorgabe?
if (c>w)       // Ist Ca-Wert etwa höher als Vorgabe, wurde also übertitriert?
{             // Beginn IF übertitriert
d1=d1+0.1;    // Dämpfungskonstante um 0.1 V steigern
}           // Ende IF übertitriert
output (#0,0); // Ca-Pumpe AUS, wenn Ca-Wert nicht ungleich Vorgabe
}          // Ende IF Ca-Wert nicht kleiner Vorgabe
}        // Ende IF START-Knopf betätigt
else
output (#0,0);  // Wenn START-Knopf nicht betätigt, dann Ca-Pumpe AUS

```

4. Programmeinheit zum Konstanthalten des pH-Werts (11.)

```

p=FLOAT(SER1[2]); // RS 232 pH-Wert
l=SER1[0];        // Signal-Geräteerkennung
x=SER1[1];        // RS 232 Uhrzeit/Datum
v=TAG1;          // pH - Vorgabe
k=TAG2;          // START-Knopf
if (k==1 && p!=0) // START-Knopf betätigt UND pH-Wert ungleich null?
{               // Beginn IF-Prozedur
if (p>v)       // hat er übertitriert (gemessener pH größer Vorgabe)?
{             // Beginn Reaktion gegen Übertitration
d1=d1+((p-v)); // Dämpfung um Wert pH minus Vorgabe erhöhen (=Prop.-Regelung)
if (d1<0)     // Ist Dämpfung jetzt kleiner null?
d1=0;        // dann Dämpfung auf null setzen
}           // Ende Reaktion gegen Übertitration
output (#4,0); // TIMER Einschaltsignal
if (v>p)       // Ist Vorgabe größer als pH-Wert (also nur gegen Säure titrieren)?
{             // Beginn Titrationswert (=Spannung KOH-Pumpe) berechnen
if (p1==0)    // gab es schon Übergabe eines "alten" pH in p1?
s=v-p;       // wenn nein, dann Spannung=Vorg-pH
else         // wenn ja...
{           // Beginn Berechnung mit früherem pH
if (d>0)    // pH-Änderung bei letzter Titerzugabe >0 (ist etwas passiert)?
{         // Beginn Berechnung wenn pH-Änderung
r=s*d*4.8; // Proportionalität zur Spannung, pH-Differenz 4.8 ist empirisch ermittelt
s=s-r-d1; // Pumpenspannung um Faktor r und um Dämpfung d1 senken
}       // Ende Berechnung, wenn pH-Änderung
else     // Der pH-Wert bei der letzten Zugabe nicht geändert oder kleiner?

```

```

{ // Beginn Berechnung bei keiner oder negativer pH-Änderung
  r=v-p; // Pumpenspannung proportional zum Unterschied pH/Vorgabe steigern
  if (r<0.1) // wenn Spannungssteigerung kleiner als 0.1 V, dann
    r=0.1; // Spannungssteigerung gleich 0.1 V
    s=s+r-(d1/100); // Spannung um Steigerungsfaktor r minus 1/100 d1 steigern (empirisch)
  } // Ende Berechnung bei kleiner oder negativer pH-Änderung
  d=p-p1; // Differenz zwischen altem und neuem pH-Wert in d übergeben
} // Ende Berechnung mit früherem pH
if (s>5) // Ist Spannung für Pumpe größer 5 Volt?
  s=5; // Dann auf 5 Volt senken
if (s<0) // Ist Spannung für Pumpe negativ?
  s=0; // Dann auf Null setzen
output (#1,s); // Spannung in s [Volt] an Pumpe anlegen
p1=p; // Übergabe alter pH-Wert in p1
}
else // Ist Vorgabe kleiner oder gleich aktuellem pH-Wert?
{ // Beginn If Vorgabe <= Aktueller pH
  s=0; // Spannung für Pumpe gleich null
  output (#1,s); // Null Volt an Pumpe anlegen
} // Ende If Vorgabe <= Aktueller pH
} // Ende Prozedur, wenn Start-Kopf betätigt und pH-Wert ungleich null
else // pH-Meter aus UND/ODER Start-Knopf nicht eingeschaltet?
{ // Beginn If Start nicht gedrückt und/oder pH-Meter aus
  output (#1,0); // Null Volt an Pumpe anlegen
  if (k!=1) // Ist Startknopf betätigt ?
  {
    output (#4,1); // TIMER 13. auf Null zurücksetzen
    s=0; // Spannung für Pumpe=0
    s1=0; // Kontrolle S1 auf Null (FALSE)
    d1=0; // Dämpfungskonstante auf Null
  }
}
}

```

5. Übergabe der Zeitvariable (14.)

```

t=ET1; // Zeit des Timers 13. in Sekunden in t übergeben

```

16.4 Das Programm „CC“

Mit dem Programm „CC“ können die *CCDD*-Versuche, das sind Doppeldiffusionsversuche unter konstanten Bedingungen, durchgeführt werden.

Zwei thermostatisierte Glasgefäße mit seitlich angebrachten Schraubflanschen werden mittels einer Klemmkonstruktion so zusammengefügt, daß zwischen diesen beiden eine Diffusionsmatrix (im hier vorliegenden Fall ausschließlich poröse Polyglycolid-Tabletten) spannungsfrei eingeklemmt werden kann (siehe Abb. 16.7 C).

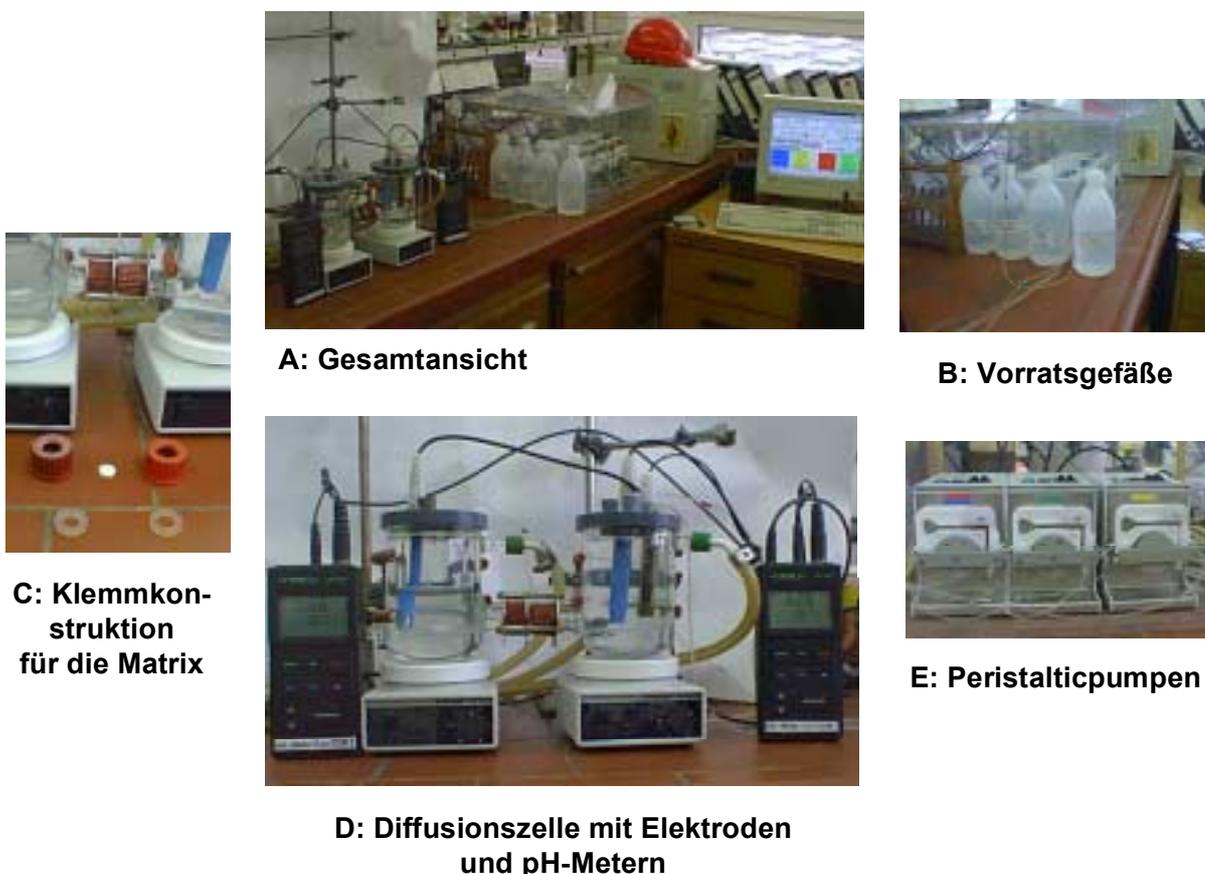


Abb. 16.7: Photographien der *CCDD*-Anlage. Deutlich sind die Elektroden und das Verkabelungssystem erkennbar. Alle Vorratsgefäße, Pumpen und Benutzeroberflächen am Computer sind farblich markiert, um jederzeit die Vorgänge zurückverfolgen zu können (z.B. ist die Ca^{2+} -Pumpe rot, die PO_4^{3-} -Pumpe blau gekennzeichnet).

Getrennt durch diese Diffusionsmatrix werden in die beiden thermostatisierten Glasgefäße die Lösungen für die Kristallisation eines schwerlöslichen Festkörpers eingefüllt (z.B. für die Herstellung von Calciumphosphaten auf einer Seite $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, auf der anderen Seite KH_2PO_4). Durch die Kontrolle von pH-Metern und die Ca-Elektrode ist es daraufhin möglich, den Verlauf der Konzentrationen und der pH-Werte zu ver-

folgen. Durch Zupumpen von KOH und/oder $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ und KH_2PO_4 kann die Konzentration auf beiden Seiten immer konstant gehalten werden.

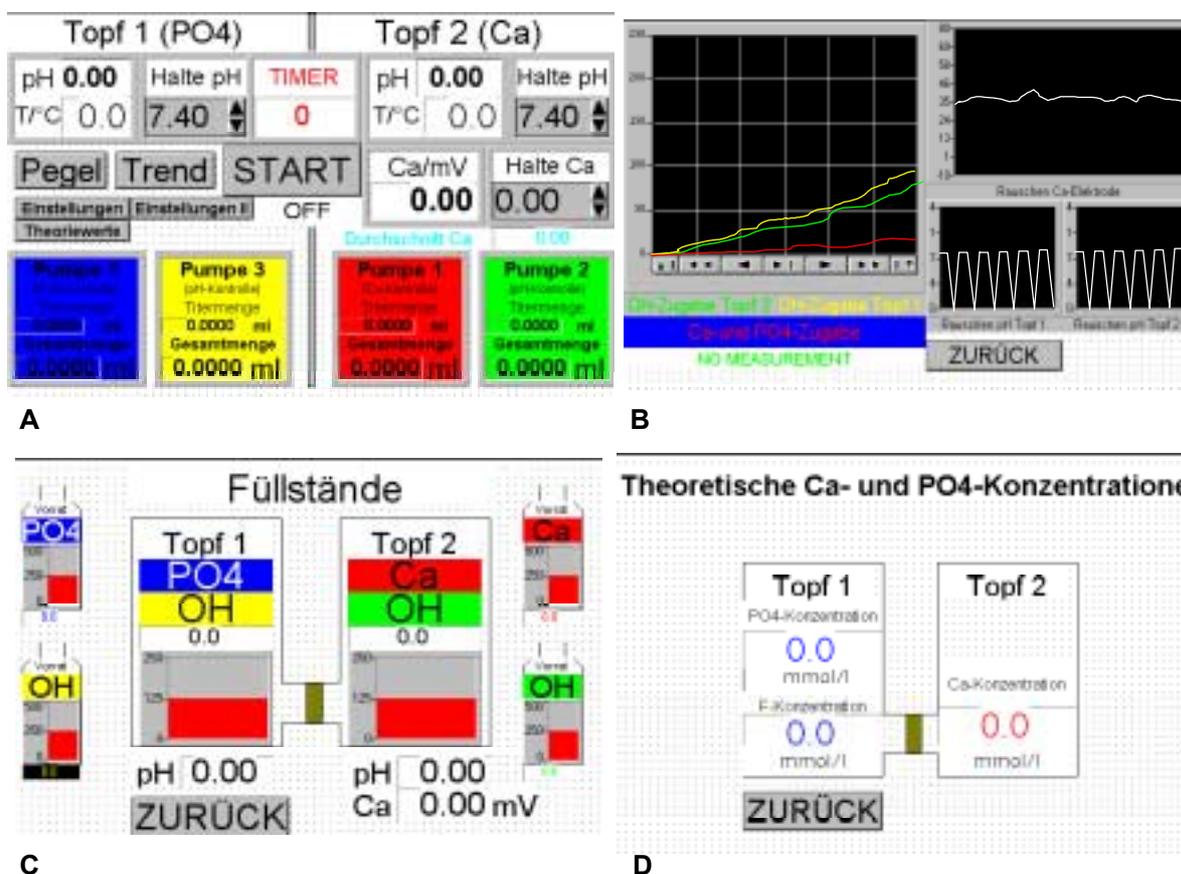


Abb. 16.8: Graphische Benutzeroberflächen des Programmes „CC“. A: Hauptschirm, B: Trenddisplay, C: Füllstandsanzeige der Diffusions- und Vorratsgefäße, D: Berechnete, theoretische Konzentrationen an Calcium und Phosphat in den thermostatisierten Reaktionsgefäßen, berechnet aus der Verdünnung durch KOH -Zugabe und Konzentrationserhöhung durch Calcium- bzw. Phosphat-Zugabe.

Diverse Anzeigen, zwischen denen jederzeit gewechselt werden kann, erlauben es, jeden Wert zu beobachten, der für die Reaktion von Belang sein kann. Die pH-Werte und Elektrodenspannungen werden genauso beobachtet wie die momentanen und insgesamt zugegebenen Titermengen (Abb. 16.8 A). Eine Trendanzeige (B) bildet die Meßwerte und die zugegebenen Mengen an Ca^{2+} -, PO_4^{3-} und KOH -Lösung der letzten Stunden ab. Die Kontrolle der Füllstände sowohl der Reaktionsgefäße als auch der Vorratsflaschen (C) führt dazu, daß jederzeit Überblick über die Situation in den Vorratsflaschen herrscht. Das Gerät schaltet sich automatisch aus, wenn ein Reaktionsgefäß überzulaufen droht. Die theoretischen Molaritäten an Calcium und Phosphat, welche durch die Verdünnung durch KOH und durch die Zugabe an Calcium- und Phosphat-Lösung berechnet werden, zeigen an, inwieweit diese Werte stabil gehalten werden. Erst dann, wenn die Spannung der Calcium-Elektrode 10 Se-

kunden unter dem geforderten Wert bleibt und auch der theoretische Calcium-Wert unter einem Mindestmaß gefallen ist, wird Calcium- und Phosphat-Lösung in die Reaktionsgefäße zutitriert.

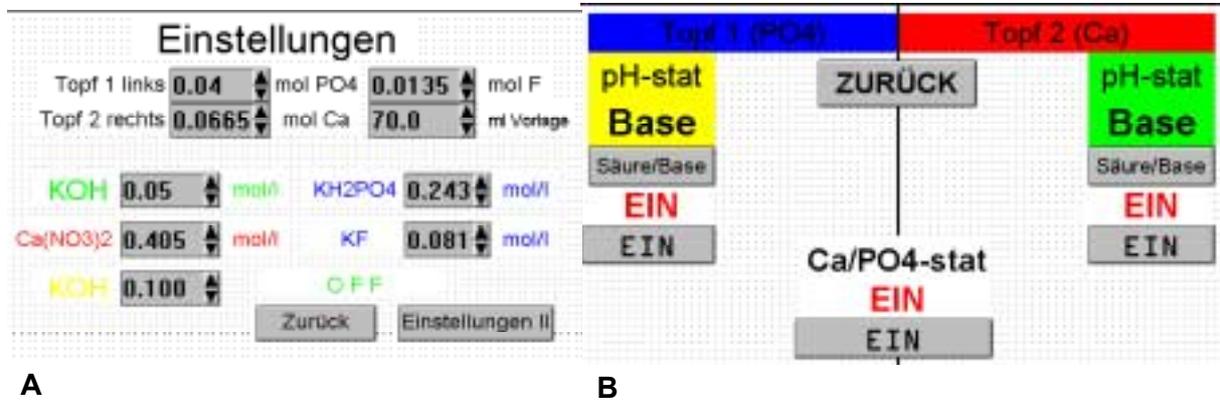


Abb. 16.9: Anzeigen der Einstellungen (A) und der Aktionen, die das Programm „CC“ ausüben soll (B).

In den Einstellungen (Abb. 16.9 A) werden sämtliche Molaritäten der Reaktionsgefäße und der Vorratsflaschen sowie die Vorlagenmengen in den Reaktionsgefäßen eingegeben, aus denen z.B. die theoretischen Molaritäten von Calcium und Phosphat aus den Verdünnungen berechnet werden können. In einem weiteren Einstellungsfenster (Abb. 16.9 B) können weiterhin die Aktionen bestimmt werden, die das Programm ausführen soll. So können mit dem Programm „CC“ auch nur die pH-Werte konstant gehalten werden, wenn man die Ca-stat-Einheit ausschaltet. Ebenso kann man mit den pH-stat-Einheiten beider Seiten der Diffusionszelle verfahren. Somit ist es mit dem Programm auch möglich, nur pH- und Ca-Werte zeitaufgelöst zu messen. Die Werte der Einstellungen werden unter D:\LOG-FILES\CC-ZWEITOPF\EIN####.LOG gespeichert. Die pH-Werte, der Calcium-Wert (in mV), die Temperaturen und die zugegebenen Mengen an Titrand werden alle 10 Sekunden in die Datei D:\LOG-FILES\CC-ZWEITOPF\CCZ#####.LOG geschrieben.

16.4.1 Arbeitsanweisung für einen CCDD-Versuch

1. Eine vorher in Wasser durchfeuchtete Diffusionsmatrix wird zwischen die beiden thermostatisierbaren Glasgefäße gespannt und mittels Dichtungsringen und der Klemmkonstruktion fixiert (Abb. 16.7 C). Mittels Wasserzugabe wird die Dichtigkeit überprüft.

2. Auf beiden Seiten werden die Diffusionslösungen eingefüllt und die Glasgefäße thermostatisiert.
3. Nach Auflegen der Deckel auf die Diffusionsgefäße werden die pH-Elektroden in die Diffusionslösungen eingetaucht und die Magnetrührer eingeschaltet.
4. Die Calcium-Elektrode wird eingeführt und das Programm gestartet. Der START-Knopf jedoch noch nicht gedrückt. Als nächstes werden die Auslaß-Schläuche der Pumpen in die Deckel eingefügt.
5. Die Molaritäten sämtlicher Lösungen und die geforderten pH-Werte werden in die Benutzeroberfläche des Programmes eingegeben. Damit sich der Ca-Wert in mV stabilisieren kann, wird dazu 5-10 Minuten gewartet.
6. Durch Zugabe von verdünnter HNO_3 und/oder verdünnter KOH werden beide Reaktionsgefäße von Hand auf den gewünschten pH-Wert (± 0.2 pH) eingestellt.
7. Ein Mittelwert des stabilisierten Wertes der Calcium-Elektrode wird als geforderter Calcium-Wert in die Benutzeroberfläche eingegeben.
8. Der START-Knopf wird gedrückt. Die Diffusionsversuche wurden in den durchgeführten Versuchsreihen ca. 7 Tage lang durchgeführt. Während dieser Zeit wurden sämtliche Meß- und Regeldaten alle 10 Sekunden auf die Computerfestplatte geschrieben.

16.4.2 Die Programmierung

Die Einheiten zur Steuerung der pH-Meter und zur Konstanthaltung der pH-Werte sind für jede Diffusionszelle vorhanden und sind dieselben, die schon im Programm „CC-HALB“ zum Einsatz kamen. Diese sind in Kapitel 16.3.2 dokumentiert. Daher werden hier nur die Ca-stat-Einheit, die Berechnung der theoretischen Werte und die Speicherung der Meß- und Regelwerte dokumentiert.

16.4.2.1 Die Ca-stat-Einheit und die Theoriewertberechnung

Eine Timervariable wird von einem Realzeitmesser (2.) in einen Programmblock (1.) übergeben. Die Werte (in V) der Calcium-Elektrode (3.) werden in zwei Blöcken zunächst mit 100000 multipliziert (4.) und daraufhin durch 100 dividiert (5.), bevor sie in den Programmblock 6. übergeben werden. Im Programmblock wird dieser aktuelle Wert der Ca-Elektrode mit dem geforderten Wert aus dem Nummernblock 7. vergli-

chen. Wenn die Ca-stat-Einheit durch den Einschaltknopf **8.** (Abb. 16.9 B Mitte unten) eingeschaltet ist sowie der START-Knopf **10.** gedrückt wurde, so wird bei Bedarf zur Konstanthaltung der Calcium-Konzentration die Ca-Pumpe **9.** in Betrieb gesetzt.

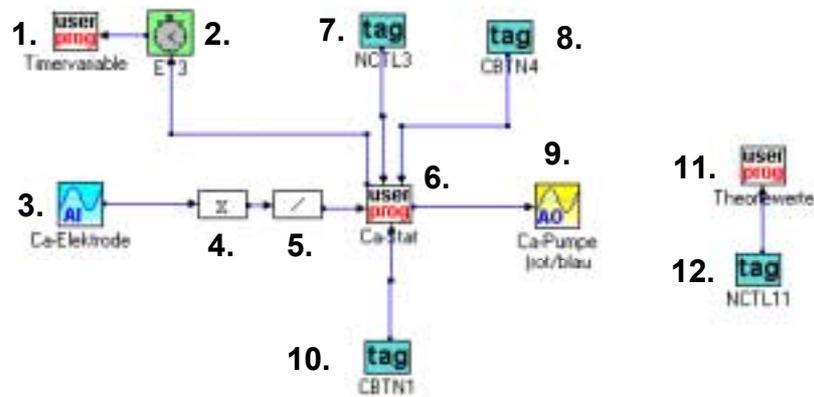


Abb. 16.10: Die Icon-Steuerung der Ca-stat-Einheit und der Errechnung der Theoriewerte des „CC“-Programmes.

Die theoretischen Werte werden aus den eingestellten Konzentrationen (Abb. 16.9 A) in den Reaktionsgefäßen, den Zugabevolumina und dem Füllstand am Beginn in den Reaktionsgefäßen (**12.**) berechnet.

1. Übergabe der Zeitvariable (1.)

```
t=ET3;
```

2. Die Steuerung der Calcium- und Phosphat-Pumpe (6.)

```
c=FLOAT(SOC4);           // Fließkommazahl aus dem mV-Wert der Ca-Elektrode in c übergeben
e9=TAG19;                 // Einschaltknopf Ca-stat-Einheit (8.)
v2=TAG13;                 // Ca-Vorgabewert aus 7.
k=TAG14;                  // START-Knopf 10.
if (c5<((v3*1000)+10) && c6<((v5*1000)+15)
  l3=1;                    //KONTROLLE, theoret. Konz. in den Reaktionsgefäßen
else
  l3=0;                    // darf nach Verdünnung durch KOH usw. nicht
                          // höher sein als Sollkonz. Ca+10 und Sollkonz. PO4+15
if (z9==1)                 // Schutzfunktion, damit nichts überläuft. Wenn 230ml überschritten,
  output(#0,0);           // dann 0 V auf Ca/PO4-Pumpe
else
{
  if (k==1)                // START-Knopf betätigt?
  {
    if (e9==0)             // Ca-stat-Einheit EIN?
    {
```

```

if (c<(v2-2) & l3==1) // Ca-Konz kleiner Vorgabewert minus zwei?
{ // in Vorversuchen zeigte sich, daß Ca-stat sonst zu empfindlich
  if (k9==0) // Ist Kontrollvariable auf null?
  {
    t9=t; // Übergabe Timerzeit t aus 1. in t9
    k9=1; // Kontrollvariable 9 auf 1 (TRUE)
  } // Ende Timerübergabe wenn Kontrollvariable auf null ist
  if (t>=t9+4) // sind seit der letzten Übergabe der Timerzeit im t9 4 sec. vergangen?
  { // d.h. ist Ca-Wert 4 Sekunden lang mindestens 2 mV unter Soll?
    d2=v2-c; // Dämpfung 2 ist Vorgabe minus Ca-Wert
if(c3==0) // wurde bisher KEIN "alter" Ca-Wert übergeben?
    u3=u3+(d2/5); // dann Pumpenspannung um 1/5 Dämpfung steigern
    else // WURDE ein Ca-Wert übergeben von letzter Titration?
    if (c3>c) // ist die Spannung der Ca-Elektrode durch Titerzugabe gestiegen?
      u3=u3-(d2/100); // Pumpenspannung um 1/100 Dämpfung senken
    else // Ist trotz Ca-Zugabe keine mV-Änderung der Elektrode eingetreten?
      u3=u3+(d2/5); // Pumpenspannung um 1/5 Dämpfung steigern
  } // Ende Aktion, wenn Ca-Wert 4 Sekunden unter Soll
} // Ende wenn Ca-Wert mindestens 2 mV unter Soll
else // Ist Ca-Wert NICHT unter Soll ?
{
  u3=0; // Pumpenspannung 0 V
  k9=0; // Kontrollvariable 9 auf null (FALSE)
}
if (u3>5) // Wenn Pumpenspannung>5 (Pumpe kann nur 0-5 V aufnehmen)
  u3=5; // dann u3 auf 5
if(u3<0) // wenn u3 kleiner als 0
  u3=0; // u3 gleich 0
c3=c; // Übergabe Wert Ca-Elektrode aus c in c3
} // Ende IF Ca-Stat EIN
if(k1==0) // Wenn Kontrolle 1 auf null (FALSE) (Timerkontrolle)
{
  z=0; // TIMER einschalten und laufen lassen
  k1=1; // Kontrolle 1 auf TRUE
}
} // Ende IF START-Knopf gedrückt
else // Wenn Startknopf nicht gedrückt, dann
{
  u3=0; // Ca-Pumpe auf 0V
  z=1;
  k1=0; // Kontrollvariable 1 für Timer auf FALSE
  c3=0; // Calcium-Übergabevariable auf null
}
output(#0,u3); // Spannung u3 an Ca-Pumpe
output(#5,z); // Timer Reset wenn Startknopf nicht gedrückt oder laufen lassen
m3=0.08*u3; // ml-Menge im 1sec-Scan Ca aus Kalibration berechnet
g3=g3+m3; // gesamte Ca-ml-Menge bisher zutitriert
m4=0.091*u3; // ml-Menge im 1sec-scan PO4
g4=g4+m4; // gesamte PO4-ml-Menge bereits zutitriert
output(#2,m3); // Ca-Menge auf Hauptschirm
output(#3,g3); // gesamte Ca-Menge auf Hauptschirm

```

```

output(#1,m4);           // PO4-Menge auf Hauptschirm
output(#6,g4);           // gesamte PO4-Menge auf Hauptschirm
}

```

3. Die Berechnung der theoretischen Konzentrationen (11.)

```

v3=e3;                   // EINSTELLUNGEN Ca-Wert Vorgabe in mmol/ml
v4=TAG4;                 // EINSTELLUNGEN ml Vorlage
n3=(v3*v4)+(e6*g3);     // Stoffmenge im Ca-Topf [mmol] = Ursprungszustand + zugegebene Menge Ca
v5=e1;                   // EINSTELLUNGEN PO4-Wert in Vorlage in mmol/ml
n5=(v5*v4)+(e7*g4);     // Stoffmenge auf PO4-Seite [mmol]
n6=(e2*v4)+(e4*g4);     // Stoffmenge Fluorid auf PO4-Seite [mmol]
c5=n3/(f5/1000);        // Ca-Konz auf Ca-Seite [mmol/l]
c6=n5/(f6/1000);        // PO4-Konz auf PO4-Seite [mmol/l]
c7=n6/(f6/1000);        // F-Konz auf PO4-Seite [mmol/l]
output(#0,c5);           // Ca-Konz. auf Display (Abb. 16.8 D)
output(#1,c6);           // PO4-Konz auf Display
output(#2,c7);           // F-Konz auf Display

```

16.4.2.2 Die Berechnung der Füllstände und das Speichern der Einstellungen

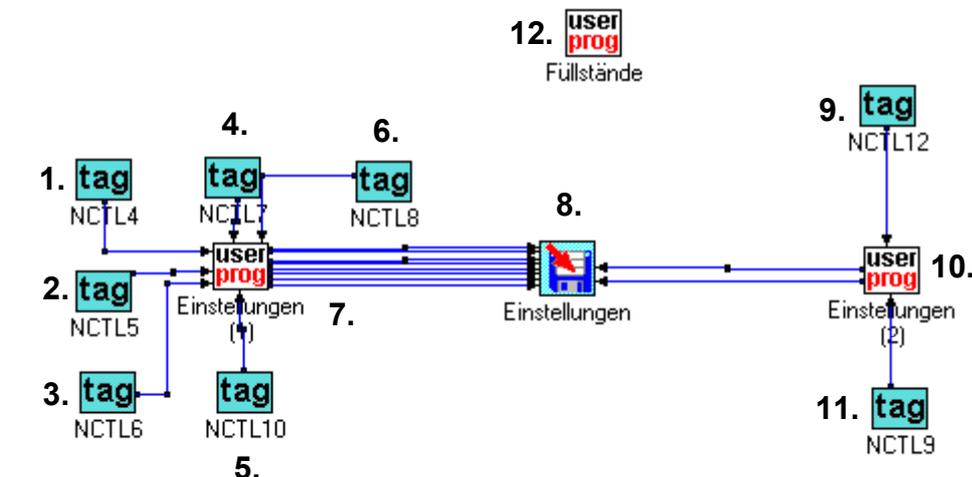


Abb. 16.11: Icon-Steuerung der Füllstandsrechnung und der Speicherung der Einstellungen auf die Computerfestplatte.

Die Ausgabekanäle (output #) sind auf 8 Stück pro Programmblock begrenzt (0 bis 7). Zwei Kanäle eines Programmblocks (in diesem Fall 7.) sind belegt, um die Datei anzulegen und das Schreiben zu aktivieren. Daher müssen die einzelnen Werte mit Hilfe zweier Programmblöcke auf die Computerfestplatte gespeichert werden. Die Werte für die PO_4^{3-} -Konzentration (1.), die F^- -Konzentration (2.) und der Ca^{2+} -Konzentration (3.) sowie die KOH -Zugabekonzentration der Ca^{2+} -Seite (4.), die F^- -Zugabekonzentration (5.) und die Ca^{2+} -Zugabekonzentration (6.) werden über den

Programmblock **7.** formatiert und an die Computerfestplatte **8.** geleitet. Gleiches geschieht im zweiten Programmblock **10.**, wo die KOH-Zugabekonzentration auf der Phosphat-Seite (**9.**) und die Phosphat-Zugabekonzentration (**11.**) formatiert wird. Im Programmblock **12.** werden die Füllstände aus der Vorlagemenge und den aktuell zugegebenen Titermengen berechnet. Gleichzeitig wird hier kontrolliert, ob die Reaktionsgefäße nicht überlaufen. Diese Speicherung soll einmalig zu Beginn einer neuen Messung erfolgen. Somit wird durch eine Kontrollvariable (w9) gesichert, daß dies nur einmal geschieht.

1. Die Aktivierung der Schreibfunktion und Speichern der ersten Einstellungen (**7.**)

```
e1=TAG5;           // mol PO4 im Reaktionsgefäß (1.)
e2=TAG6;           // mol F im Reaktionsgefäß (2.)
e3=TAG7;           // mol Ca im Reaktionsgefäß (3.)
e4=TAG8;           // mol KF im Vorratsgefäß (5.)
e5=TAG9;           // mol KOH im Vorratsgefäß Ca-Seite (4.)
e6=TAG10;          // mol Ca im Vorratsgefäß (6.)
if (k==1)          // START-Knopf betätigt?
{
  if (w9==0)       // Kontrollvariable: wurde schon gespeichert?
  {
    // wenn nicht, dann...
    output(#7,1);   // Einschalten Schreibfunktion (LOG ON File)
    output(#6,1);   // Öffnen der Datei (OPEN)
    output(#0,e1);  // mol PO4 in Reaktionsgefäß speichern
    output(#1,e2);  // mol F im Reaktionsgefäß speichern
    output(#2,e3);  // mol Ca im Reaktionsgefäß speichern
    output(#3,e4);  // mol KF im Vorratsgefäß speichern
    output(#4,e5);  // mol KOH im Vorratsgefäß Ca-Seite speichern
    output(#5,e6);  // mol Ca im Vorratsgefäß speichern
    w9=1;           // Kontrolle auf TRUE, d.h. es wurde schon einmal gespeichert
  }
  else              // wenn schon einmal gespeichert wurde
  {
    output(#6,0);   // Schließen der Datei (CLOSE)
    output(#7,0);   // Ausschalten der Speicherfunktion (LOG OFF)
  }
}
else                // Wenn START-Knopf nicht betätigt wurde
w9=0;               // Kontrolle, ob schon mal gespeichert wurde, auf null (FALSE)
```

2. Speichern der restlichen Einstellungen **10.**

```
e7=TAG11;          // mol PO4 im Vorratsgefäß 11.
```

```
e8=TAG3;           // mol KOH Vorratsgefäß 9.
output(#0,e7);     // Speichern mol PO4
output(#1,e8);     // Speichern mol KOH
```

3. Berechnung der Füllstände 12.

```
f1=500-g1;        // Füllstand KOH-Vorratsgefäß Ca-Seite
f2=500-g2;        // Füllstand KOH-Vorratsgefäß PO4-Seite
f3=500-g3;        // Füllstand CaNO3-Vorratsgefäß
f4=500-g4;        // Füllstand KH2PO4-Vorratsgefäß
f5=g2+g3+v4;      // Reaktionsgefäß Zugabe von Ca und OH
f6=g1+g4+v4;      // Reaktionsgefäß Zugabe von PO4 und OH
if (f5>230)        // Ist Reaktionsgefäß Ca-Seite voll?
  z9=1;           // Kontrolle z9 auf 1 führt zum Abschalten aller Pumpen
if (f6>230)        // ODER ist Reaktionsgefäß PO4-Seite voll
  z9=1;           // Dann ebenfalls Abschalten aller Pumpen einleiten
output(#0,f1);     // Füllstand KOH-Vorrat (Ca) auf Bildschirm (Abb. 13.8 C)
output(#1,f2);     // Füllstand KOH-Vorrat (PO4) auf Bildschirm
output(#2,f3);     // Füllstand CaNO3-Vorrat auf Bildschirm
output(#3,f4);     // Füllstand KH2PO4-Vorrat auf Bildschirm
output(#4,f5);     // Füllstand Reaktionsgefäß Ca-Seite auf Bildschirm
output(#5,f6);     // Füllstand Reaktionsgefäß PO4-Seite auf Bildschirm
```

16.4.2.3 Das Abspeichern der Meß- und Regeldaten

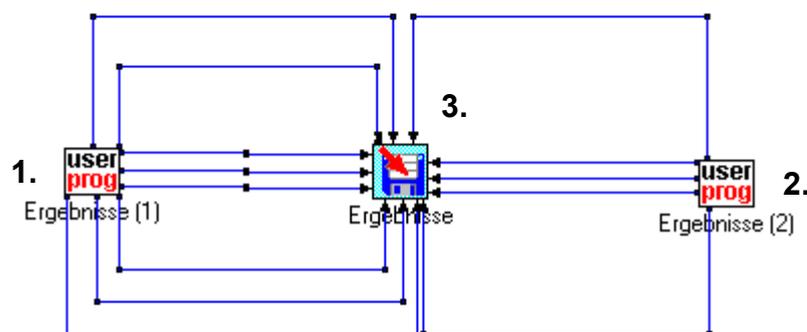


Abb. 13.12: Icon-Steuerung der Speichersequenz für die Meß- und Regeldaten.

Wie bei der Abspeicherung der Füllstände (Kap. 16.4.2.2) reichten auch hier die Ausgangskanäle eines Programmblocks nicht aus, um die gesamten Daten zur Speichereinheit 3. zu transferieren. Im Programmblock 1. sind zudem zwei Ausgangska-

näle für das Einschalten der Schreibsequenz und das Öffnen der Datei vorgesehen. Weiterhin werden dort die Zeit, die Zugabemengen aller Lösungen und der pH-Wert der Phosphat-Seite der Diffusionsgefäße formatiert und zur Computerfestplatte transferiert. Im Programmblock **2.** werden zudem der pH-Wert der Calcium-Seite, die Spannung der Calcium-Elektrode, die Soll pH-Werte und der Sollwert der Spannung der Calcium-Elektrode vorbereitet und transferiert.

1. Der Ergebnisprogrammblock (1.)

```

if (k==1 && p!=0 && p2!=0)    // ist START-Knopf betätigt und laufen beide pH-Meter?
{
    // wenn ja...
    output(#0,1);             // Einschalten Speichersequenz (LOG ON)
    output(#1,1);             // Öffnen der Datei (OPEN)
    t8=FLOAT(t);              // Zeitvariable in Fließkommazahl umrechnen
    g3=FLOAT(g3);             // zugepumpte Gesamtmenge Ca-Lösung in Fließkomma umr.
    g4=FLOAT(g4);             // zugepumpte Gesamtmenge PO4 in Fl.komma umrechnen
    output(#2,t8);            // Zeit auf Festplatte schreiben
    output(#3,g3);            // Zugepumpte Gesamtmenge Ca-Lsg. auf Festplatte schreiben
    output(#4,g4);            // Zugepumpte Gesamtmenge PO4-Lsg. auf Festplatte schr.
    output(#5,g2);            // Zugepumpte Gesamtmenge KOH Ca-Seite auf Festplatte
    output(#6,g1);            // Zugepumpte Gesamtmenge KOH PO4-Seite auf Festplatte
    output(#7,p);             // pH-Wert PO4-Seite auf Festplatte schreiben
}
else                           // Wenn pH-Meter aus oder START-Knopf nicht gedrückt
{
    output(#1,0);             // Schließen der Datei (CLOSE)
    output(#0,0);             // Speichersequenz abschalten (LOG OFF)
}

```

2. Der Ergebnisprogrammblock (2.)

```

output(#0,p2);                // pH-Wert Ca-Seite
output(#1,c);                  // Ca-Elektrodenwert [mV]
output(#2,v);                  // pH-Sollwert PO4-Seite
output(#3,v1);                 // pH-Sollwert Ca-Seite
output(#4,v2);                 // Sollwert Ca-Elektrode [mV]

```

17. Anhang

17.1 Sicherheit und Entsorgung

<i>Chemikalie</i>	<i>Gefahrstoffsymbol:</i>	<i>R-Sätze</i>	<i>S-Sätze</i>	<i>Entsorgung</i>
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat	Xi	36/37/38-52/53	26-36-61	15
Ammonium- <i>meta</i> -vanadat	T	23/25-37/38-41	26-36/37/39-45	15
Calciumnitrat-4-hydrat	O, Xi	8-36	--	14
Calciumchlorid	Xi	36	22-24	14
Ethanol	F	11	7-16	2
Fötale Kälberserum	---	---	---	1
Kaliumhydroxid	C	35	26-37/39-45	13
Kaliumfluorid	T	23/24/25	26-45	23
Kaliumdihydrogenphosphat	--	--	--	14
<i>di</i> -Kaliumhydrogenphosphat	--	--	--	14
α -MEM	---	---	---	1
Natriumdihydrogenphosphat	--	--	--	14
Dinatriumhydrogenphosphat	--	--	--	14
Natriumcarbonat	Xi	36	22-26	14
Natriumacetat	--	--	22-24/25	14
Penicilin-Streptomycin		61-20/21/22-42/43	45-26-36/37/39-23	1
Salpetersäure	C	35	23.2-26-36/37/39-45	12
Salzsäure	C	34-37	26-45	12

17.1.1 R-Sätze

- R 8: Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
- R 11: Leichtentzündlich
- R 34: Verursacht Verätzungen
- R 35: Verursacht schwere Verätzungen.
- R 36: Reizt die Augen.
- R 37: Reizt die Atmungsorgane
- R 41: Gefahr ernster Augenschäden.
- R 61: Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
- R 20/21/22: Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 23/25: Giftig beim Einatmen und Verschlucken
- R 23/24/25: Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Berührung mit der Haut.
- R 37/38: Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
- R 36/37/38: Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
- R 52/53: Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
- R 42/43: Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.

17.1.2 S-Sätze

- S 7: Behälter dicht geschlossen halten
- S 16: Von Zündquellen fernhalten - nicht rauchen.
- S 22: Staub nicht einatmen.
- S 23: Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen.
- S 23.2: Dampf nicht einatmen.
- S 24: Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 26: Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 36: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 45: Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).

- S 61: Freisetzung in der Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 36/37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 37/39: Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.

17.1.3 Entsorgungshinweise:

- 1: Zellnährmedien, Seren, Antibiotika und deren Zubereitungen wurden am Biomechanik-Zentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (UKE) gesammelt, autoklaviert und entsorgt
- 2: Ethanol wurde in den Behälter für halogenfreie organische Lösungsmittel gegeben.
- 12: Säuren und deren Zubereitungen wurden mit KOH neutralisiert und im Kanister „Spül- und Waschwasser metallsalzhaltig“ entsorgt.
- 13: Wäßrige Laugenlösungen wurden neutralisiert und im Kanister „Spül- und Waschwasser metallsalzhaltig“ entsorgt.
- 14: Anorganische Salze wurden in Wasser gelöst und ggf. neutralisiert. Dann wurden sie im Kanister „Spül- und Waschwasser metallsalzhaltig“ entsorgt.
- 15: Saure schwermetallhaltige Lösungen wurden im Kanister „Anorganische Säuren schwermetallsalzhaltig“ entsorgt.
- 23: Fluoride wurden mit Vorsicht behandelt und mit Calciumsalzen als Calciumfluorid ausgefällt. Die Lösungen wurden neutralisiert im Kanister „Spül- und Waschwasser metallsalzhaltig“ entsorgt. Der Niederschlag wurde in den Kanister der „Anorganischen Feststoffe“ gegeben.

Die Calciumphosphate wurden in dem Behälter für Anorganische Feststoffe entsorgt.

17.2 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ACP	Amorphes Calciumphosphat
CO ₃ ACP	Amorphes carbonathaltiges Calciumphosphat

Carbonat-ACP	Amorphes carbonathaltiges Calciumphosphat
DCPD	Dicalciumphosphat-dihydrat ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Brushit)
DCPA	Dicalciumphosphat wasserfrei (anhydrous) (CaHPO_4 , Monetit)
OCP	Octacalciumphosphat
HAP	Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
FAP	Fluorapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$)
α -MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , Zellnährmedium für Zellbesiedelungsversuche
FKS	Fötale Kälberserum
a.u.	<i>arbitrary units</i> = willkürliche Einheiten in Diagrammen

17.3 Kurzzusammenfassung

1. Gutachter: Prof. Dr. M. Eppele

2. Gutachter: Prof. Dr. R. D. Fischer

Inhalt der Dissertation war die Untersuchung und Simulation der biologischen Kristallisation von Calciumphosphaten. Hierbei wurden humane Knochenproben im Vergleich mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien mit IR-Spektroskopie, Thermischen Analysemethoden (TG-DTA-MS) und Synchrotron-Methoden untersucht. Mittels hochauflösender Röntgenbeugung konnten im Vergleich der Knochenproben untereinander keine Unterschiede in der Kristallinität gefunden werden. Diese Messungen und EXAFS-Spektren deuteten ausschließlich auf eine nanokristalline apatitische Calciumphosphat-Phase hin. Im Gegensatz dazu waren die beiden artifiziell hergestellten und noch im Gebrauch befindlichen Knochenersatzmaterialien durch ihre Herstellungsweise (Endobon[®], Algipore[®]) wesentlich kristalliner. Thermisch unterschieden sich die humanen Knochenproben bezüglich Wassergehalt, Mineralgehalt und Carbonatgehalt.

Als Beispiel für einen pathologischen, krankhaften Biomineralisationsvorgang wurde das Mineral in calcifizierten Menisken, durch das das Krankheitsbild der *Chondrocalcinose* auftritt, untersucht. Im Gegensatz zur vorherrschenden Lehrmeinung konnten innerhalb frischer Menisken keine Kristalle des Calciumpyrophosphatdihydrats (CPPD) gefunden werden. EXAFS-Messungen deuteten eher auf eine nanokristalline, apatitische Calciumphosphat-Phase hin. Erst nach dem Trocknen des Meniskusgewebes konnten die mineralischen Ablagerungen als CPPD identi-

ziert werden. Dies deutet auf eine Stabilisierung der amorphen Phase innerhalb des Gewebes hin.

Die Simulation solcher Biomineralisationsvorgänge im Labormaßstab kann durch schnelle Fällung von Calciumphosphaten erfolgen, die unter dem Einfluß von Inhibitoren durchgeführt wird. Durch automatische computergesteuerte Titration ist es möglich, sehr definiert Kristallisations- und Inhibitionsvorgänge zu untersuchen. Eine langsamere und damit den realistischen Verhältnissen angepaßtere Methode bieten Diffusionsversuche, z.B. in eine hydrophile Polymermatrix. Die Verbindung beider Methoden, das Konstanthalten der pH-Werte und der Konzentrationen der Ausgangsstoffe und die langsame, gesteuerte Kristallisation mit der Diffusionstechnik stellt die hier entwickelte *CCDD*-Anlage dar. Hiermit wurde in verschiedenen Versuchsreihen die Kristallisation von Fluorapatit durch Doppeldiffusion in eine Polyglycolid-Matrix unter dem Einfluß verschiedener Faktoren (pH-Wert, Stoffkonzentration, Fluorid-Konzentration) untersucht.

Weiterhin wurde zur Simulation pathologischer Mineralisationsvorgänge der Einfluß von Magnesium und Cholesterin auf die HAP-Kristallisation untersucht

Aus den Kenntnissen, die aus der Knochenuntersuchung gewonnen wurden, wurde ein Kompositmaterial aus Polyglycolid und Calciumphosphat entwickelt, welches als Knochenersatzmaterial einsetzbar sein könnte. Aus thermodynamischen Überlegungen und zum Puffern der sauren Degradationsprodukte bei dem biologischen Abbau von Polyglycolid wurde dabei ein amorphes carbonathaltiges Calciumphosphat gewählt, dessen Kristallinität weit geringer und dessen Löslichkeit weit höher ist als die des Knochenapatits. So sollte der *remodeling*-Prozeß unterstützt werden können. Das Material wurde in Zellbesiedelungsversuchen erfolgreich auf seine Biokompatibilität getestet.

Aus den Überlegungen der thermodynamisch instabileren Calciumphosphat-Phase und des inhibierenden Einflusses des Zellnährmediums wurden mit diesem Calciumphosphat Konversionsversuche im Zellnährmedium α -MEM durchgeführt. Es zeigte sich dabei eine stark inhibierende Wirkung des Mediums. Im Kompositwerkstoff mit Polyglycolid kristallisierte im Gegensatz zum reinen Carbonat-ACP kein Calcit aus.

Analoge Versuche wurden ebenfalls mit Brushit (DCPD) in Zellnährmedium und in physiologischer Natriumcarbonat-Lösung durchgeführt.

17.4 Veröffentlichungen

1. Schriftliche Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Journalen

- 1) M. Epple, F. Peters, K. Schwarz, "Composite aus Polyglycolid und Calciumphosphat als potentielle Knochenersatzmaterialien" in: *Tagungsbände der Werkstoffwoche/Materialica 1998* (München 12.-15.10.1998), Band IV, Symposium 4: Werkstoffe für die Medizintechnik (H. Planck, H. Stallforth, Eds.), Wiley-VCH **1999**, S.233-237
- 2) M. Epple, O. Herzberg, F. Peters, K. Schwarz, "Mikrostrukturiertes Polyglycolid als biomedizinischer Werkstoff", in: N.M. Meenen, A. Katzer, J.M. Rueger, "Zelluläre Interaktion mit Biomaterialien", Hefte zur Zeitschrift "Der Unfallchirurg" **278**, Springer, Berlin-Heidelberg **2000**, S. 22-27.
- 3) Fabian Peters, Karsten Schwarz and Matthias Epple, „The structure of bone studied with synchrotron X-ray diffraction, X-ray absorption spectroscopy and thermal analysis“, *Thermochimica Acta* **2000**, *361*, 131-138
- 4) W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, K. Schwarz, M. Amling, M. Siedler, J.M. Rueger, M. Epple, „New Scaffolds for Tissue Engineering: Biocompatible Composites of Carbonated Apatite and Biodegradable Polyesters“, *Cells Tissues Organs* **2000**; *166*, 73
- 5) Wolfgang Linhart, Fabian Peters, Wolfgang Lehmann, Karsten Schwarz, Arndt Friedrich Schilling, Michael Amling, Johannes Maria Rueger, Matthias Epple, „Biologically and chemically optimized composites of carbonated apatite and polyglycolide as bone substitution materials“, *Journal of Biomedical Materials Research* **2001**, *54* (2), 162-171
- 6) F. Peters and M. Epple, „Simulating arterial wall calcification *in vitro*: biomimetic crystallization of calcium phosphates under controlled conditions“ *Zeitschrift für Kardiologie* **2001** (im Druck)
- 7) C. Schiller, M. Siedler, F. Peters, M. Epple, "Functionally graded materials of biodegradable polyesters and bone-like calcium phosphates for bone replacement", *Ceramic Transactions* (im Druck)

2. Sonstige Publikationen, Kurzbeiträge, zitierfähige Konferenz-Abstracts:

- 1) M. Epple, F. Peters, K. Schwarz, G. Delling, "The structure of bone mineral and bone substituent materials probed by synchrotron X-ray diffraction", *HASYLAB Jahresbericht* **1998**, S. 591-592
- 2) M. Epple, F. Peters, K. Schwarz, G. Delling, "The structure of bone mineral and bone substituent materials probed by X-ray absorption spectroscopy", *HASYLAB Jahresbericht* **1998**, S. 825-826
- 3) W. Linhart, W. Lehmann, K. Schwarz, F. Peters, M. Epple, J.M. Rueger, "In vitro Charakterisierung der Biokompatibilität neuer Knochenersatzmaterialien aus Polyglycolid und definierten Calciumphosphaten", in: Hertel P., Rehm K.

- E. (Hrsg): Hefte zu Der Unfallchirurg, 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie e. V., 17. - 20. November **1999**, Berlin, Abstracts 275/1999; 242
- 4) W. Linhart, W. Lehmann, K. Schwarz, F. Peters, M. Siedler, M. Epple, M. Amling, J.M. Rueger, "Entwicklung eines biodegradierbaren Knochenersatzmaterials aus Carbonatapatit und Poly-3-Hydroxybutyrat", *Osteologie* Band 9/Supplement 1, **2000**; 2
 - 5) W. Linhart, W. Lehmann, D.W. Sommerfeldt, K. Schwarz, F. Peters, M. Epple, M. Amling, J.M. Rueger, "Untersuchungen zur osteoblastenspezifischen Biokompatibilitätsprüfung unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien", *Osteologie* Band 9/Supplement 1, **2000**; 4

3. Vorträge

- 1) Fabian Peters, Karsten Schwarz, Matthias Epple
„Thermoanalytische Untersuchungen an Knochen und Knochenersatzstoffen“, Jahrestagung der Gesellschaft für Thermische Analyse (GEFTA) Weinheim 15. – 17. September 1999
- 2) Fabian Peters, Karsten Schwarz, Matthias Epple, Wolfgang Linhart, Wolfgang Lehmann, Michael Amling, Johannes Maria Rueger
„Rationales Design von Knochenersatzmaterialien: Ergebnisse der Besiedelung von Polyglycolid-Carbonatapatit-Composit-Materialien mit Osteoblasten“
8. Tagung der Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien (CAB) der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie, Freiburg, 27. November 1999
- 3) Fabian Peters, Matthias Epple
„Biogenic crystallisation under controlled conditions“
2nd Scientific Workshop on Biology of Vascular Calcification, Coswig 25. - 26. Mai 2000

4. Posterveröffentlichungen

- 1) F. Peters, K. Schwarz, B. Hasse, M. Epple
„Kristallisation in porösen Polymeren“
9. Vortragstagung Syntheseprinzipien in der Festkörperchemie, Saarbrücken 23. - 25. September 1998
- 2) F. Peters, K. Schwarz, M. Epple
„Rationelles Design von Knochenersatzmaterialien – Beiträge der Festkörperchemie“
9. Vortragstagung Syntheseprinzipien in der Festkörperchemie, Saarbrücken 23. - 25. September 1998
- 3) F. Peters, K. Schwarz, M. Epple
„Crystallisation in and on porous polymers“,
International Union of crystallography Glasgow 04. – 13. August 1999

-
- 4) Matthias Epple, Fabian Peters
„New Calcium Phosphate biomaterials made by biomimetic computer controlled crystallisation“
6th World Biomaterials Congress Hawaii 15. - 20. Mai 2000
 - 5) Matthias Epple, Fabian Peters, Karsten Schwarz, Michael Siedler, Wolfgang Linhart, Wolfgang Lehmann, Michael Amling, Johannes M. Rueger
„Optimized composites of bone-like apatite and polyglycolic acid as bone substitution materials“
6th World Biomaterials Congress Hawaii 15. - 20. Mai 2000
 - 6) F. Peters, M. Epple
„In-vitro-Simulation der Knochenmineralisation in und an Biomaterialien“
2. SFB 452 Symposium "Functional Supramolecular Systems", 27. - 28.10.2000
 - 7) F. Peters, M. Epple
„In vitro Simulation der Knochenmineralisation in und an Biomaterialien“
Gemeinsame Tagungen der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien und dem 3. Kolloquium der Kompetenzzentren für Biomaterialien, Ulm 24. - 25.11.2000
 - 8) Fabian Peters, Michael Siedler, Karsten Schwarz, Matthias Epple
„pH-Wert-Studien an resorbierbaren Biomaterialien: Calciumphosphate und biodegradierbare Polyester“
Gemeinsame Tagungen der Deutschen Gesellschaft für Biomaterialien, Chirurgischen Arbeitsgemeinschaft für Biomaterialien und dem 3. Kolloquium der Kompetenzzentren für Biomaterialien, Ulm 24. - 25.11.2000

17.5 Dank

Professor Dr. Matthias Epple für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, seinem stetigen Interesse am Fortgang der Arbeit, für die zahlreichen wertvolle Diskussionen und für ein immer offenes Ohr auch für nicht fachspezifische Probleme.

Dr. med. W. Linhart, Dr. med. M. Amling, Dr. med. W. Lehmann, Dr. med. A. Schilling und Professor Dr. med. Rueger (Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die gute Zusammenarbeit im Bereich der Knochenersatzmaterialien.

Dipl. Chem. Drazen Tadič für die vielen Diskussionen, das Erkennen und Lösen vieler Problematiken und den geistigen Beistand.

Dipl. Chem. Karsten Schwarz für die wertvollen Diskussionen, das über die universitären Verpflichtungen weit hinausgehende Teamwork, die Organisation sowie die aufbauenden Worte und Taten.

Dipl. Chem. Michael Siedler für das Organisieren diverser Dinge und die heiteren Stunden, die einen immer wieder aufbauten.

Herrn Dr. Oliver Herzberg für die netten Zeiten, die Zusammenarbeit und die Geduld.

Dipl. Chem. Bernd Hasse für das schnelle Messen von Proben und die wertvollen Diskussionen.

Allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises für die vielen Tips, Diskussionen und die Geduld mit einem manchmal etwas ungeduldigen Menschen.

Dr. med. H. Guderian, Dr. med. M. Fürst und Professor Dr. med. W. Rütter (Orthopädie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Bereitstellung der calcifizierten Menisken und die wertvollen Diskussionen.

Herrn Professor Dr. med. G. Delling (Pathologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für die Bereitstellung der Knochenproben.

Meinen Praktikanten Björn Henninger und Björn Neubacher für die Mithilfe und die langen Stunden an den Meßgeräten.

Herrn Dr. D. Scharnweber für die guten REM-Photos der Carbonat-ACPs.

Frau Torborg Krugmann für die AAS-Messungen.

Frau Nina Schober für diverse Röntgenpulverdiffraktogramme.

Frau Ralya für die Unterstützung am Rasterelektronenmikroskop.

Frau Warncke von der Fotostelle für das Entwickeln und Abziehen einer Unmenge von REM-Photos.

Frau Dr. Edelgard Kaiser vom Biomechanik-Zentrum des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die Zellnährmedien und die Einweisung in das sterile Arbeiten.

Allen meinen Freunden, insbesondere den Jungs von „Cleansweep“ (Ulf Klapperstück, Sönke Asmussen, Benjamin Dreikandt, Sven Wroblewski) für das Kontrastprogramm.

All den Studenten, die ich betreuen durfte und von denen ich hoffe, ihnen ein wenig Chemie beigebracht zu haben.

Meiner Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung

Last but not least meiner Lebensgefährtin Frau Brigitte Margaris für den immerwährenden Beistand, die unglaubliche Geduld und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne sie wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen.

Alle, die hier ungenannt bleiben, bitte ich um Nachsicht. Die Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Fabian Peters
Schumannstraße 34
22083 Hamburg

Lebenslauf

17.02.1970	Geboren als Sohn von Joachim Peters und Roswitha Peters, geb. Kessler
08/1976 - 07/1980	Friedrich - Ebert Grundschule in Ilvesheim
08/1980 - 05/1990	Karl - Friedrich - Gymnasium in Mannheim
08. Mai 1990	Abitur
07/1990 - 06/1991	Grundwehrdienst beim Flugabwehrregiment 12 in Hardheim
10/1991 - 03/1995	Chemiestudium an der Universität Heidelberg
02/1994	Diplomvorprüfung
03/1995	Studienortwechsel zur Universität Hamburg
04/1997	Diplomhauptprüfung an der Universität Hamburg
06/1997 - 01/1998	Diplomarbeit am Zentrum für Sonnenenergie- und Wasserstoff-Forschung Stuttgart unter der Betreuung von Prof. Dr. A. Reller Universität Hamburg. Thema: <i>Schichtabscheidung ternärer Sulfide - physikalische Eigenschaften und thermochemische Reaktivität</i>
03/1998 - 04/2001	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. M. Epple am Institut für Anorganischen Chemie der Universität Hamburg. Thema: <i>Biologische Kristallisation von Calciumphosphaten - Untersuchung und Simulation</i>
04/1998 - 03/2001	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Anorganische und Angewandte Chemie
Seit 04/1998	Kollegiat am Graduiertenkolleg „Molekularbiologie der Osteolyse (GRK 476)“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen benutzt habe.

Hamburg, im April 2001

Fabian Peters

Hiermit erkläre ich, daß ich noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Hamburg, im April 2001

Fabian Peters