

Universität
Rostock



Traditio et Innovatio

**Calciumorthophosphate mit
kontrollierter Kristallmorphologie
und ein injizierbares, poröses Biomaterial:
Materialentwicklung und Charakterisierung**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

am Institut für Physik

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von Dipl.-Chem. Ulf Weber aus Rostock

Rostock, September 2013

urn:nbn:de:gbv:28-diss2013-0136-7

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Gerber
Institut für Physik, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Martin Köckerling
Institut für Chemie, Universität Rostock

Datum der Einreichung: 13. Februar 2013

Datum der Verteidigung: 12. Juli 2013

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
2	Stand der Wissenschaft	3
2.1	Silicagele.....	3
2.1.1	Sol-Gel-Prozess.....	5
2.2	Calciumorthophosphate	8
2.2.1	Hydroxylapatit.....	14
2.2.2	Mineralischer Hauptbestandteil des Knochens.....	19
3	Experimentelle Methoden.....	23
3.1	Röntgenpulverdiffraktometrie.....	23
3.2	Rasterelektronenmikroskopie & Energiedispersive Röntgenspektroskopie	23
3.3	Transmissionselektronenmikroskopie	24
3.4	Infrarotspektroskopie	25
3.5	Quecksilberporosimetrie & Gasadsorption	25
3.6	Histologische & Histomorphometrische Untersuchungen	26
4	Charakterisierung kommerziell erhältlicher Hydroxylapatit-Materialien	27
4.1	Phasenreine Hydroxylapatit-Materialien.....	27
4.1.1	Synthetisch hergestellte Materialien.....	27
4.1.1.1	Nanokristalline Pulver.....	27
4.1.1.2	Biomaterial Ostim®	29
4.1.2	Materialien biologischer Herkunft.....	30
4.1.2.1	Biomaterial Bio-Oss®	30
4.1.2.2	Biomaterial Cerabone®	30
4.2	Synthetische, siliciumdioxidhaltige Hydroxylapatit-Materialien	31
4.2.1	Biomaterial Actifuse™	31
4.2.2	Biomaterial Nanobone®	32

5 Synthese & Charakterisierung von nanokristallinem Hydroxylapatit35

5.1	Methoden zur Herstellung von nanokristallinem Hydroxylapatit.....	35
5.2	Nasschemische Synthese von Hydroxylapatit-Nanokristallen	39
5.2.1	Materialien, Geräte & allgemeine Versuchsdurchführung	39
5.3	Strukturbildung in der Fällungslösung.....	45
5.3.1	Bildung von amorphem Calciumphosphat	45
5.3.2	Umwandlung zu nanokristallinem Hydroxylapatit	48
5.4	Materialcharakterisierung	50
5.4.1	Einfluss der Syntheseparameter auf einige Materialeigenschaften	50
5.4.1.1	Alterung in der Fällungslösung.....	50
5.4.1.2	pH-Wert	54
5.4.1.3	Pumprate	59
5.4.1.4	Ultraschalleistung	62
5.4.2	Struktur nach Temperaturbehandlung.....	69
5.4.3	Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse.....	71
5.5	Charakterisierung von pH-Wert 7.8 hergestelltem Hydroxylapatit	72
5.5.1	Makro- bis Nanostruktur	72
5.5.2	Chemische Zusammensetzung	73

6 Einsatz des synthetisierten Materials zur Biomaterialweiterentwicklung.....77

6.1	Charakterisierung von NanoBone® der neuen Generation — NanoBone® S.....	77
-----	---	----

7 Entwicklung & Charakterisierung eines injizierbaren Biomaterials81

7.1	Herstellung poröser Mikropartikel durch Sprühtrocknung.....	81
7.1.1	Herstellung einer alkoholischen Sprühsuspension.....	83
7.1.2	Sprühtrocknung	86
7.2	Partikelcharakterisierung.....	88
7.2.1	Makro- bis Nanostruktur	88
7.2.2	Struktur nach Temperaturbehandlung.....	91
7.2.3	Chemische Zusammensetzung	92
7.3	Experimente <i>in vivo</i>	93
7.3.1	Histomorphometrische Analyse	93
7.3.2	<i>Ex vivo</i> Analyse.....	95

8 Zusammenfassung	97
Literaturverzeichnis.....	101
Anhang.....	115
A.1 Experimentelle Methoden	115
A.2 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien	117
A.3 Biologische Funktionalität von NanoBone®	119
Publikationen	124
Eidesstattliche Erklärung.....	125

Kapitel 1

Einleitung

Materialien zur Knochenregeneration in der zahnärztlichen Chirurgie sind in der täglichen Praxis nicht mehr wegzudenken. Jedes zweite bis dritte Implantat bedarf heute eines Knochenaufbaus. In den Fachrichtungen Endoprothetik, Wirbelsäulenchirurgie und Traumatologie werden Knochenersatzmaterialien (KEM) immer häufiger eingesetzt. An diese Materialgruppe werden natürlicherweise Anforderungen (siehe Anhang A.2) gestellt.

Nach immunologischen Gesichtspunkten lassen sich für die Transplantation und Implantation zur Verfügung stehenden KEM in fünf Gruppen einteilen:

- autogene
- allogene
- xenogene
- phykogene
- alloplastische

Autogene KEM stammen vom gleichen Individuum (autolog) ab, während allogene KEM von einem anderen Individuum derselben Spezies (homolog) gewonnen werden. Xenogene KEM werden von einem Individuum einer anderen Spezies (heterolog) aus tierischer Herkunft (bovin, equin, porcin) und phykogene KEM (heterolog) aus pflanzlicher Herkunft gewonnen. Alloplastische KEM sind synthetisch hergestellte, d.h. künstlich gewonnene, Biomaterialien.

Die ARTOSS GmbH entwickelt und produziert auf Basis der NanoBone®-Technologie seit bereits 10 Jahren am Hauptsitz in Rostock-Warnemünde Biomaterialien zur Knochenregeneration, die für die zahnärztliche Chirurgie, die Orthopädie und Unfallchirurgie genutzt werden. Neben den bisher am Markt bekannten Knochenersatzmaterialien bildet die NanoBone®-Technologie eine völlig neue Gruppe alloplastischer KEM. Nanokristalliner Hydroxylapatit (HA) ist von einer synthetisch hergestellten, nanoporösen Silicagelmatrix umschlossen. HA, ein Calciumphosphat, ist ein wichtiges Ausgangsmaterial für biomedizinische Anwendungen aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu der anorganischen Materialhauptkomponente von Knochen und Zähnen. Kiesel- oder Silicagel fördert die Kollagen- und Knochenbildung [Car70, Car76, Kee92].

Durch die Herstellung im Sol-Gel-Verfahren ist NanoBone® (NB) ungesintert und durch Poren im Nanometer- bis Mikrometerbereich gekennzeichnet. Im Gegensatz zu gesinterten HA-Keramiken ist das Biomaterial dadurch vollständig resorbierbar.

Das Potential der Nanotechnologie für biomedizinische Anwendungen wird durch die HA-Nanokristalle und die interkonnektierenden Nanoporen der Silicagelmatrix genutzt.

Wird das Biomaterial in den Organismus implantiert, bedecken die Proteine aus dem Blut die gesamte innere Oberfläche (ca. $84 \text{ m}^2/\text{g}$) und der Körper erkennt das Biomaterial scheinbar als körpereigen (siehe Anhang A.3). Innerhalb der ersten zwei Wochen wird aus der Kieselgelmatrix während des Matrixwechsels eine organische Matrix [Ger06]. Die lockere poröse Struktur

ermöglicht das schnelle Einsprossen von Kapillargefäßen. NB fördert das natürliche *Remodeling* (Umbauprozesse des Knochens zur Adaption an veränderte Verhältnisse). Es wird während des *Remodeling* komplett durch autologen Knochen substituiert. Bei Stabilisierung des Volumens resorbiert NB in dem Maß, in dem neuer, autologer Knochen gebildet wird [Mei08].

Eine Möglichkeit Biomaterialien weiterzuentwickeln, basiert auf der Tatsache, dass sich durch eine Verkleinerung der Bausteine eines Biomaterials deren Oberfläche/Volumen-Verhältnis erhöht. Neben der Vergrößerung der inneren Oberfläche des Materials bei konstant bleibender Masse kommt es dabei auch zu einer Erhöhung der chemischen Reaktivität und Löslichkeit. Demnach lässt sich hierdurch eine Steigerung der Resorptionsgeschwindigkeit vom Biomaterial durch Osteoklasten (für den Knochenabbau verantwortliche Zellen) und somit ein besseres *Remodeling* erzielen [Bru94]. Weiterhin bieten nanostrukturierte Materialien eine bessere Fähigkeit für die spezifischen Wechselwirkungen mit Proteinen [Nar04]. Eine Vergrößerung der inneren Oberfläche vom Material verbessert also die Proteinadsorption als auch die biologische Funktionalität.

Der erste Schwerpunkt der Arbeit lag zunächst in der Suche nach kommerziell erhältlichen HA-Materialien, die aus Kristalliten bestimmter Morphologie sowie einheitlicher Größe bestehen und in ausreichenden Mengen verfügbar sind, um bereits existierendes Biomaterial zu verbessern. Natürliche Knochenapatit-Kristallite haben eine herausragende biologische Funktionalität, die in ihrer besonderen Nanostruktur begründet ist. Daher wurde zunächst die Struktur kommerziell erhältlicher HA-Materialien untersucht und diese dann mit der von Knochenmineral (humaner Femurknochen) verglichen.

Ein Nachteil, der sich dabei aufzeigt, wenn ein solch geeignetes HA-Material gefunden werden sollte, ist die Abhängigkeit von Herstellern. Daher lag der zweite Schwerpunkt in der Suche nach einem möglichst einfachen Syntheseverfahren, mit dem HA-Nanokristalle von kontrollierter Morphologie und Größe in ausreichender Menge hergestellt werden können und der experimentellen Charakterisierung des synthetisierten Materials. Das zu entwickelnde Verfahren soll eine von HA-Herstellern unabhängige Produktion ermöglichen.

Für viele aktuelle biomedizinische Anwendungen ist es erforderlich, aus nanostrukturierten Biomaterialien Applikationsformen zu entwickeln, die injizierbar sind und damit in bestimmte Geweberegionen gelangen. Es ist also wünschenswert aus Biomaterialien, deren Funktionalität durch ihre Nanostruktur determiniert ist, Mikropartikel zu erzeugen. Diese Mikropartikel sollen eine definierte Größe haben, die in einem Bereich liegt, in dem das Material keiner Phagozytose (Aufnahme von festen Partikeln (Zellen, Mikroorganismen, Fremdkörper) mit anschließendem intrazellulärem Abbau) unterliegt. Eine dritte Aufgabe bestand demnach darin, resorbierbare Mikropartikel zum Einsatz als injizierbares Knochenaufbaumaterial mithilfe der synthetisierten HA-Kristallite bestimmter Morphologie und Größe zu entwickeln und dieses Biomaterial experimentell als auch tierexperimentell zu charakterisieren.

Kapitel 2

Stand der Wissenschaft

2.1 Silicagele

Silicium ist nach Sauerstoff das zweithäufigste Element der Erdkruste. Es kommt dort vorwiegend in Siliciummineralen vor [Vor75]. So besteht Sand meist aus Quarz und damit aus Siliciumdioxid. Auch in Lebewesen kommt Silicium vor. Die Kieselalgen (Diatomeen) beispielsweise, sind in der Lage, ein wohlstrukturiertes Exoskelett aus amorphem Siliciumdioxid zu erzeugen. Sie beziehen das benötigte Siliciumdioxid aus in Wasser gelöster Monokieselsäure. Über die Mechanismen, die die Alge zum Bau des Skelettes befähigen, ist nur wenig bekannt. Versuche mit Germanium als Siliciumtracer ergaben Hinweise, dass die Aufnahme des Siliciumdioxids durch Proteine stattfindet [Hil97]. Für Menschen ist Silicium ein wichtiges Spurenelement. Es kommt mit durchschnittlich 20 mg/kg im Körper vor und wird als SiO_2 durch die Nahrung aufgenommen [Jug02, Bel94].

In der Literatur wird zunehmend vom positiven Einfluss von SiO_2 auf die Kollagen- und Knochenbildung berichtet [Car70, Car76, Kee92, Lyu00, Ref03, Ric00].

Die Ergebnisse wurden sowohl bei *in vitro* als auch bei *in vivo* Experimenten erhalten. Carlisle berichtet, dass Silicium ein wichtiges Spurenelement bei der Bildung und Mineralisation der Knochen ist [Car70]. Die Rolle des Siliciumdioxids im Metabolismus höherer Lebewesen ist nicht vollständig geklärt. Versuche an Hühnern und Ratten haben jedoch gezeigt, dass ein Siliciumdioxidmangel zu Fehlwüchsen an Knochen-, Knorpel- und Muskelgewebe führen kann [Car72, Car76]. Für diese Hypothese spricht auch die Entdeckung, dass Osteoblasten (für den Knochenaufbau verantwortliche Zellen) Siliciumdioxid enthalten [Car86].

Das Silicium wird von verschiedenen Autoren in unterschiedlichen Formen bei den Experimenten verwendet. So nutzen Keeting et al. siliciumhaltige Zeolite A für ihre Experimente und stellten einen positiven Einfluss auf das Zellwachstum und die Zellteilung von kultivierten Zellen einer humanen Zelllinie fest [Kee92]. Hierbei ist natürlich zu erwähnen, dass damit auch andere Elemente, wie z. B. Aluminium, mit einer negativen Wirkung in das System gelangen.

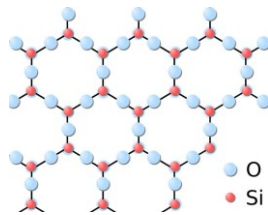
Der Einfluss von Silicium auf die Knochenbildung wurde von Reffitt et al. *in vitro* an Zelllinien untersucht [Ref03]. Es wurde eine Stimulierung der Kollagen Typ I Synthese festgestellt.

Im Tierexperiment wurde der Knochenmasseverlust von osteoporotischen Ratten untersucht [Ric00]. Hierbei wurde festgestellt, dass Ratten, die 500 mg Silicium pro Kilogramm Nahrung erhielten, keinen Knochenmasseverlust zeigten. Das Gegenteil wurde bei den Tieren entdeckt, die kein Silicium in der Nahrung hatten. Lyu stellte mit *in vitro* Experimenten fest, dass Silicium eine bedeutende Rolle bei der Osteogenese spielt und eine Korrelation zwischen Osteogeneseaktivität und Silicium-Konzentration (von 10 ppm bis 100 ppm Silizium im Kulturmedium) besteht [Lyu00]. Diese Tatsachen legen nahe, dass Siliciumdioxid wichtig für den

Aufbau von Gewebe im Körper ist und deshalb auch einen günstigen Einfluss auf Heilprozesse haben kann.

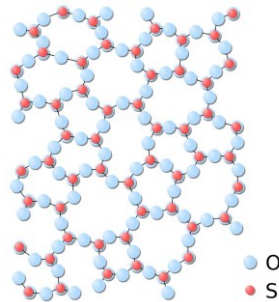
Siliciumdioxid tritt in verschiedenen Strukturen auf, die einen großen Einfluss auf die physiologische Wirksamkeit haben. SiO_2 liegt als kristalline, glas- oder gelartige Substanz vor. Siliciumdioxid in der kristallinen Form (z.B. Quarz) sowie in der glasartigen Form (z.B. Quarzglas) ist fast vollständig vernetzt, und deswegen für den Körper sehr schwer aufzunehmen, da es eine sehr geringe Löslichkeit im Wasser besitzt.

● SiO_2 in einem Kristall (Quarz)



Symmetrie
+ Fernordnung
= kristalline Struktur

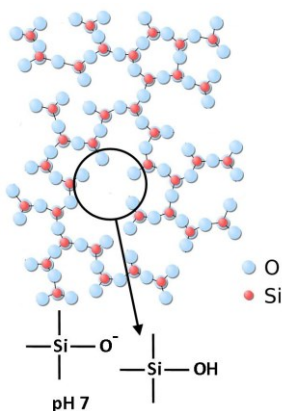
● SiO_2 in einem Glas (Quarzglas, Feuerstein)



keine Symmetrie
+ Nahordnung
+ total verknüpftes Netzwerk
= amorphe Struktur

Kiesel- oder Silicagel besteht dagegen aus einem schwach verknüpften Netzwerk der $[\text{SiO}_4]$ -Tetraeder. An seiner Oberfläche, befindet sich eine große Anzahl an freien Si-OH-(Silanol) und Si-O^- -(Silanolat) Gruppen. Die Löslichkeit im Wasser liegt bei 25°C im Bereich von 100 ppm bis 150 ppm im pH-Wert-Bereich von 2 bis 8 [Ile79]. Im lebenden Gewebe löst es sich schneller, der Grund hierfür ist nicht bekannt. Für die Aufnahme von SiO_2 ist offensichtlich eine schwache Vernetzung wichtig.

● SiO_2 in einem Gel (Xerogel)



große Unordnung
+ viele offene Bindungen
+ große innere Oberfläche
+ endliche Anzahl von Strukturmotiven
= amorphe Struktur

bei pH-Wert 7 negativ geladene innere Oberfläche
aktiviert die Blutkoagulation (Hageman-Faktor)

Das SiO_2 -Gel wird durch den Sol-Gel-Prozess bereitgestellt, da mit diesem Verfahren eine Reihe von Möglichkeiten besteht, die Eigenschaften des zu erzeugenden Materials zu beeinflussen, wie beispielsweise der Vernetzungsgrad.

2.1.1 Sol-Gel-Prozess

Die Sol-Gel Technologie bietet eine Möglichkeit nanostrukturierte Materialien unter milden Bedingungen herzustellen. Sie gehört zu den Bottom-Up Verfahren. Es handelt sich hierbei um Methoden, bei denen Strukturen mittels chemischer Prozesse aufgebaut werden. Bottom-Up Prozesse nutzen die physikalisch-chemischen Grundsätze der molekularen bzw. atomaren Selbstorganisation. In diesen Herstellungsverfahren werden komplexere Strukturen gezielt aus Atomen bzw. Molekülen aufgebaut, wodurch die Kontrolle der Partikelgröße und Form sowie der Partikelgrößenverteilung ermöglicht wird.

Der Sol-Gel-Prozess ist grundsätzlich gekennzeichnet durch:

- a) Polymerisation von Monomeren unter Bildung von Primärteilchen (bei Wasserglas entfällt dieser Schritt).
- b) Das Wachstum der Primärteilchen und Aggregation zu Clustern.
- c) Die Verknüpfung von Primärteilchen in Ketten, dann dreidimensionalen Netzwerken, die sich im gesamten flüssigen Medium ausbreiten und schließlich ein Lyogel (Gel, dessen Poren durch eine flüssige Phase gefüllt sind) bilden.
- d) Entfernen der flüssigen Phase des Lyogels führt zur Bildung eines Xerogels (Gel, dessen Poren durch eine gasförmige Phase gefüllt sind, wobei sich durch das Entfernen der flüssigen Phase auch die räumliche Anordnung des Netzwerkes verändert).

Ein bedeutender Vorteil des Sol-Gel-Verfahrens liegt in der Vielfalt der Verarbeitungsmöglichkeiten der Sole und Gele, je nach Behandlungsschritt zu Pulvern, Fasern, Keramiken oder Beschichtungen. Außerdem können hochporöse Nanomaterialien hergestellt werden. Durch Füllung dieser Poren während oder nach der Gelherstellung lassen sich Verbundwerkstoffe herstellen. Die tiefe Prozesstemperatur gestattet es ferner, Wirkstoffe im Laufe des Syntheseschrittes in das Gel einzubetten, die gespeichert und kontrolliert wieder freigesetzt werden können. Die Nachteile des Sol-Gel-Prozesses liegen bei den schwer zu kontrollierenden Synthese- und Trocknungsschritten, die ein Scale-up des Verfahrens erschweren. Ferner können organische Verunreinigungen im Gel verbleiben. Bedingt durch meist notwendige Reinigungsschritte, Trocknung und thermische Nachbehandlung führt das zu einem aufwändigen Herstellungsprozess [Gaz08].

In Abbildung 2.1 ist ein allgemeines Reaktionsschema für den Sol-Gel-Prozess für Kieselsäureester ($\text{Si}(\text{OR})_4$ mit $\text{R} = \text{C}_n\text{H}_{2n+1}$, $n > 0$) dargestellt. Zuerst erfolgt die ggf. säure- oder basenkatalysierte Hydrolyse (Rktgl. 2.1) bei der Alkohol (ROH) und Silanol-Gruppen (Si-OH) unter Wasserverbrauch gebildet werden. Sobald diese Gruppen gebildet wurden, entstehen bei der Kondensation Siloxanbindungen (Si-O-Si-Bindungen) zum einen durch Wasser- (Rktgl. 2.2a) und zum anderen durch Alkoholabspaltung (Rktgl. 2.2b). Oberhalb eines molaren Wasser/ $\text{Si}(\text{OR})_4$ -Verhältnisses (r_w -Wert) von 2 ist die Kondensation unter Wasser- und unterhalb von 2 mit Alkoholabspaltung begünstigt.

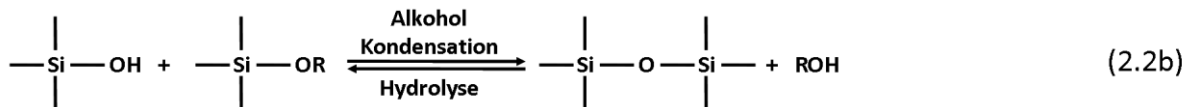
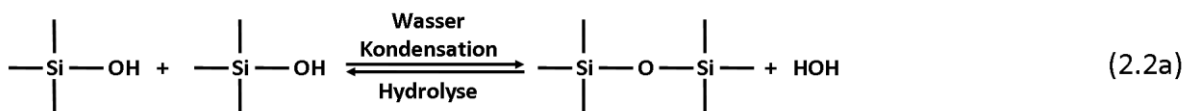
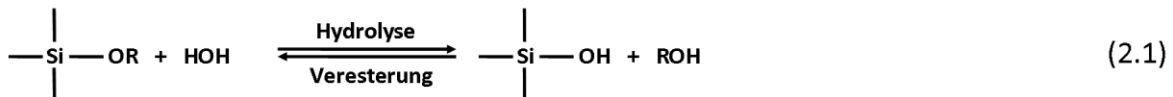


Abbildung 2.1: Reaktionsschema für den Sol-Gel-Prozess von Silicium-Alkoxiden. Der Einfachheit halber wurde auf die Darstellung der anderen OR-Gruppen verzichtet.

Unter sauren Bedingungen ist es wahrscheinlich, dass eine Alkoxidgruppe in einem schnellen ersten Schritt protoniert wird. Elektronendichte wird von dem Siliciumatom abgezogen, so dass es elektrophiler und somit anfälliger für Angriffe von Nucleophilen wie Wasser wird. Dies führt zur Bildung eines penta-kordinierten Übergangszustandes mit signifikantem $\text{S}_{\text{N}}2$ -Charakter. Der Übergangszustand zerfällt durch Abgang des Alkohols unter Inversion des Silicium-Tetraeders (Abbildung 2.2).

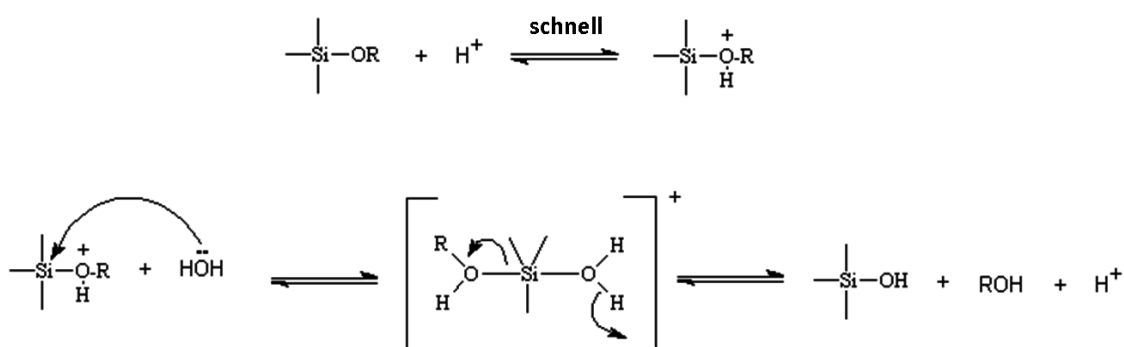


Abbildung 2.2: Schema der säurekatalysierten Hydrolyse von Silicium-Alkoxiden. Der Einfachheit halber wurde auf die Darstellung der anderen OR-Gruppen verzichtet.

Durch den Katalysator Säure lässt sich die Hydrolyse beschleunigen. Mit einem steigenden molaren Säure/ $\text{Si}(\text{OR})_4$ -Verhältnis (r_s -Wert) entstehen mehr Primärteilchen, damit mehr und kleinere Cluster. Dabei wird gleichzeitig mehr Wärme freigesetzt, die die Gelbildungsrate erhöht. Ein hoher r_w -Wert dient dazu, die Hydrolyse- gegenüber der Kondensationsrate zu steigern. Dadurch lässt sich die Gelbildung verlangsamen.

Strukturbildung im Sol

Durch Hydrolyse entstandene Monomere kondensieren miteinander. Ist die Konzentration der Monomere kleiner als 100 ppm bleibt die Lösung bei 25°C relativ lange stabil. Ist die Konzentration höher, beginnen sich Dimere und schwerere Moleküle zu bilden. Wie die Hydrolyse, so hängt die Kondensation auch vom pH-Wert ab (Abbildung 2.3). Ist er kleiner als 2, so ist die Kondensationsrate proportional zur H^+ -Konzentration. Ist der pH-Wert größer als 2 so ist die Kondensationsrate proportional zur OH^- -Konzentration. Das Siliciumdioxid kondensiert vorwiegend so, dass ein Maximum von Si-O-Si- und ein Minimum von Si-OH-Bindungen angestrebt werden. Deshalb bilden sich schon in der frühen Phase der Kondensation cyclische Strukturen. Durch Anlagerung weiterer Monomere und größerer Strukturen bilden sich dann kompakte Primärpartikel, die nur noch Si-OH-Gruppen an ihrer Oberfläche aufweisen. Da kleinere Partikel besser in Lösung gehen als große, wachsen die großen Partikel auf Kosten der kleineren, was als Ostwald-Reifung bekannt ist.

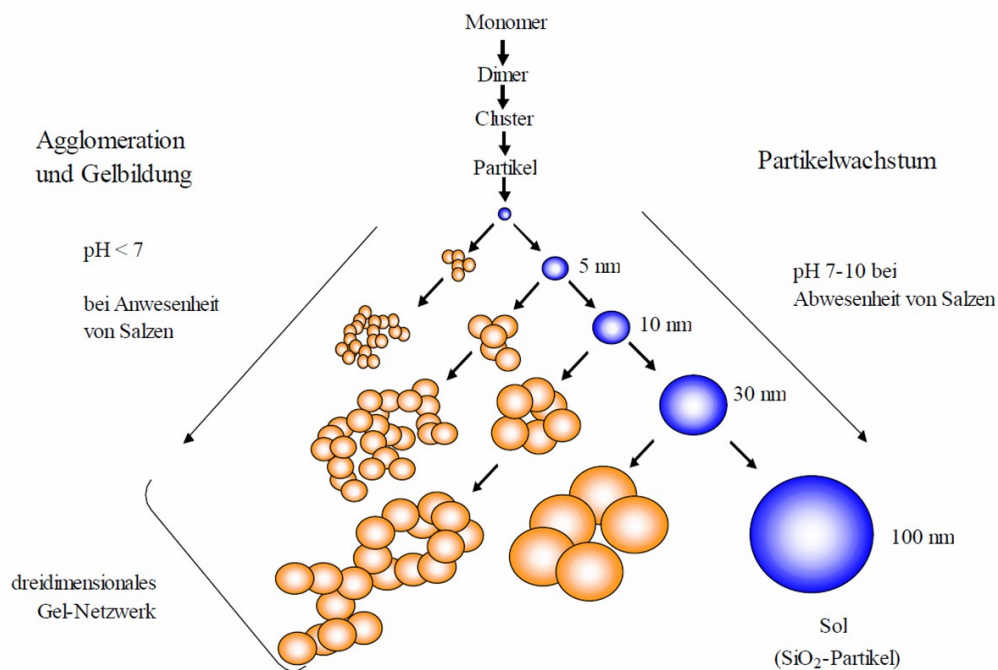


Abbildung 2.3: Partikelbildung in Abhängigkeit vom pH-Wert (Bild in Anlehnung an [Bri90]).

Siliciumdioxid zeigt bei hohen pH-Werten eine höhere Löslichkeit, weshalb sich hierbei mehr größere Partikel bilden, da sich die kleineren besser auflösen. Bei niedrigen pH-Werten bilden sich dagegen viele kleinere Partikel. Der weitere Verlauf der Kondensation hängt davon ab, wie die Partikel an der Oberfläche geladen sind. Oberhalb eines pH-Wertes von 6 oder 7 haben die Partikel eine negative Oberflächenladung, weshalb sie sich voneinander abstoßen. Unterhalb des genannten pH-Wertes haben die Partikel eine geringere Ladung und können mit einander kollidieren. Dabei entstehen Ketten, fraktale Cluster sowie schließlich ein Gelnetzwerk. Die Zeit in der ein Sol zu einem Gel wird, hängt auch stark vom pH-Wert ab. Die größte zeitliche Stabilität eines Sols ist bei pH-Werten von 1.5 bis 3, die kleinste bei pH-Werten von 5 bis 6. Ab pH-Wert 7 wird kein Gel mehr gebildet, da die Partikel geladen sind. Es tritt nur noch ein Wachstum der Partikel auf [Ile79].

2.2 Calciumorthophosphate

Calcium ist ein Erdalkalimetall und das fünfthäufigste Element. Es kommt in Lagerstätten, die durch marine Ablagerungen entstanden, in Form von Calciumcarbonat (CaCO_3 in Kalkstein, Marmor, Kreide), Dolomit ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$), Gips ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) und Apatitmineralien vor. Tabelle 2.1 stellt einige wichtige Eigenschaften von Calcium zusammen.

Tabelle 2.1: Charakteristika des Ca^{2+} -Ions [Kai91].

Ionenradius, r	100 pm
Verhältnis Radius/Ladung, r/q	50 pm/q
Oberfläche, $O = 4\pi r^2$	$\sim 125000 \text{ pm}^2$
Bevorzugte Koordinationszahl, KZ	[6] (Oktaeder) bis [8] (Würfel)
Bevorzugte Koordinationsatome	O
Bevorzugter Ligandentyp	Zweizählige Oxoliganden, z. B. verbrückende Carboxylate
Verteilung in humanen Erythrocyten (intrazellulär)	4 mg/kg
Verteilung im menschlichen Blutplasma	100 mg/kg

99% des Calciums im menschlichen Körper ($\sim 1.5 \text{ kg}$) sind zusammen mit über 80% des Phosphats ($\sim 2.1 \text{ kg}$) im Skelettsystem als Apatit deponiert. Dabei stellen die Knochenmineralien ein Reservoir dar, aus dem Calcium mobilisiert wird bzw. in das überschüssiges Calcium abgegeben werden kann. Im Blutplasma existiert Calcium zu 40% in freier, ionisierter Form und zu 60% als Calcium-Proteinat. In Knochen und Zähnen liegen Calcium- und Phosphat-Ionen als Carbonatapatit, Fluorapatit und Hydroxylapatit vor. Die Ausscheidung des Calciums findet zu ca. 15% über die Niere statt. Der Rest des täglich resorbierten Calciums wird über den Dickdarm ausgeschieden. Die Resorption, Speicherung, Freisetzung und Ausscheidung des Calciums wird hormonell gesteuert. Dabei regeln Parathormon, Calcitonin und Vitamin D den Mineralstoffwechsel des Skelettsystems [Bud73]. Calcium-Ionen kommen im Körper vielfältige Aufgaben zu. Neben der Bedeutung als kristallinem Stabilisator im Skelettsystem spielen Calcium-Ionen eine Rolle beim Informationstransfer (second/third messenger), als Trigger, Regulator und als Signalverstärker.

Der Phosphatstoffwechsel ist eng mit dem Calciumstoffwechsel verbunden. Wie bereits zuvor erwähnt, sind die Phosphate zu über 80% im Skelettsystem als Apatit deponiert. Im Blut wird der Phosphatanteil als anorganisches Phosphat angegeben und beträgt 2 mg/100ml bis 6 mg/100ml. In Knochen und Zähnen liegt Phosphat zusammen mit Calcium als Apatit vor. Der Apatit stellt aufgrund seiner hohen spezifischen Oberfläche eine labile Phase dar, die einem ständigen Stoffaustausch unterliegt. Phosphat ist in allen Organen sowohl als säureunlösliche als auch säurelösliche Form intrazellulär verteilt, wobei sich das säurelösliche Phosphat aus anorganischem, säurelabilem und säurestablem Phosphat zusammensetzt.

Orthophosphate sind Verbindungen mit diskreten PO_4^{3-} -Ionen, die die maximal mögliche Anzahl von drei freien O^- -Gruppen am zentralem Phosphor-Atom aufweisen. Meta-, Pyro- und Polyphosphate sind bekannt als kondensierte Phosphate, die durch wiederholte Kondensation (Polymerisation) tetraedrischer $[\text{PO}_4]$ -Einheiten gebildet werden. In Tabelle 2.2 sind die verschiedenen Phosphat-Ionen mit ihrer chemischen Formel dargestellt.

Tabelle 2.2: Phosphat-Ionen mit ihrer chemischen Formel.

Phosphat-Ion	ortho-Phosphate	meta-Phosphate	pyro-Phosphate	poly-Phosphate
Formel	PO_4^{3-}	$(\text{PO}_3)_n^{n-}$	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	$[(\text{PO}_3)_{n-1}\text{PO}_4]^{(n+2)-}$

Orthophosphorsäure (H_3PO_4) ist eine dreibasige mittelstarke Säure und bildet daher drei Reihen von Salzen. Die drei Dissoziationsstufen und ihre pK_s -Werte (Gleichgewichtskonstante einer Protolysereaktion wird meist als ihr negativer dekadischer Logarithmus, dem pK_s -Wert angegeben) bei 25°C sind:



Aus dem Zusammenhang zwischen Phosphat-Ionengehalt und einer Phosphatlösung ergibt sich, dass bei einem pH-Wert von 2 die eine Hälfte aller Phosphorsäuremoleküle als H_3PO_4 und die andere Hälfte als H_2PO_4^- vorliegt. Mit zunehmendem pH-Wert verschiebt sich das Gleichgewicht zur ersten Dissoziationsstufe. So liegt bei einem pH-Wert von 4.5 sämtliche Phosphorsäure in Form von H_2PO_4^- vor, bei einem pH-Wert von 14.5 ist die dritte Dissoziationsstufe zu 100% vorhanden. Demnach ist die letzte Dissoziationsstufe nur in stark basischer Lösung ohne Hydrolyse auflösbar. In Wasser (pH-Wert 7) erfolgt eine weitgehende Hydrolyse:



Dabei wird die Lösung alkalisch. Im pH-Wert-Bereich von 6 bis 8 puffert ein Gemisch von primärem und sekundärem Phosphat.

Die Calciumsalze der dreibasigen Orthophosphorsäure können in allen Dissoziationsstufen gebildet werden, und werden als Calciumorthophosphate bezeichnet. In saurem Medium bilden sich die Dissoziationsstufen mit H_2PO_4^- -Ionen. Die beiden anderen Stufen (HPO_4^{2-} - und PO_4^{3-} -Ionen) kommen in der neutralen Mineralphase von Knochen und Zähnen vor. Allgemein sind alle Calciumorthophosphate in Säuren löslich, in Wasser schlecht löslich und weiße Festkörper. In der Tabelle 2.3 sind einige Eigenschaften der existierenden Calciumorthophosphate, die nach steigendem molarem Ca/P-Verhältnis geordnet sind, zusammengestellt.

Tabelle 2.3: Charakteristika der existierenden Calciumorthophosphate [Fer99a, Fer99b, McD77].

Mol. Ca/P-Verhältnis	Verbindung	Name	Formel	Löslichkeit in H_2O bei 25°C , pK_{sp} [a]	Löslichkeit in H_2O bei 25°C , mg/L	pH-Wert-Stabilitätsbereich (in H_2O bei 25°C)
0.50	Monocalciumphosphat-Monohydrat	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.14	$\sim 18 \cdot 10^3$	0.0 – 2.0
0.50	Monocalciumphosphat-Anhydrat	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1.14	$\sim 17 \cdot 10^3$	[e]
1.00	Dicalciumphosphat-Dihydrat, Mineral Brushit	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6.59	~ 88	2.0 – 6.0
1.00	Dicalciumphosphat-Anhydrat, Mineral Monetit	DCPA	CaHPO_4	6.90	~ 48	[e]
1.33	Octacalciumphosphat	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	96.6	~ 8.1	5.5 – 7.0
1.50	α -Tricalciumphosphat	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25.5	~ 2.5	[b]
1.50	β -Tricalciumphosphat	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28.9	~ 0.5	[b]
1.20 – 2.20	Amorphes Calciumphosphat	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n \text{H}_2\text{O}$ $n = 3\text{-}4.5$; 15-20% H_2O	[c]	[d]	$\sim 5\text{--}12$ [f]
1.50 – 1.67	Calciumdefizienter Hydroxylapatit	CDHA	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$) [g]	~ 85.1	~ 9.4	6.5 – 9.5
1.67	Hydroxylapatit	HA (OHAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116.8	~ 0.3	9.5 – 12
1.67	Fluorapatit	FA (FAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	120.0	~ 0.2	7 – 12
2.00	Tetracalciumphosphat, Mineral Hilgenstockit	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38 – 44	~ 0.7	[b]

[a] Die Löslichkeit ist angegeben als negativer dekadischer Logarithmus des Ionenprodukts für die angegebene Formel (ohne Hydratwasser) mit Konzentrationen in $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. [b] Diese Verbindungen können nicht aus wässriger Lösung gefällt werden. [c] Kann nicht genau angegeben werden. Folgende Werte wurden berichtet: 25.7 ± 0.1 (pH-Wert 7.40), 29.9 ± 0.1 (pH-Wert 6.00), 32.7 ± 0.1 (pH-Wert 5.28) [Ohu96]. [d] Kann nicht genau angegeben werden. [e] Stabil oberhalb von 100°C . [f] Immer metastabil. Die Zusammensetzung eines Niederschlags hängt vom pH-Wert und der Zusammensetzung der Lösung ab. [g] Für den Fall $x=1$ (der Randbedingung mit $n_{\text{Ca}}/n_{\text{P}}=1.5$) sieht die chemische Formel von CDHA wie folgt aus: $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$.

Calciumorthophosphate, die zur Apatitfamilie gehören, enthalten OH^- -Ionen. Bei der Kristallisation der Calciumorthophosphate sind kinetische Faktoren besonders wichtig. Zwar ist thermodynamisch der Hydroxylapatit die stabilste Phase, es entstehen allerdings bei schnellen Fällungsreaktionen oft kinetisch bevorzugtes Octacalciumphosphat oder ein amorphes Calciumphosphat, das in einem langsamen Auflösungs-/Rekristallisationsmechanismus zu dem thermodynamisch günstigeren Hydroxylapatit umkristallisiert. Das Löslichkeitsprodukt ist dementsprechend stark abhängig vom pH-Wert. In Abbildung 2.4 sind die Löslichkeiten einiger Vertreter der Calciumorthophosphate in Abhängigkeit vom pH-Wert der Lösung bei 37°C dargestellt.

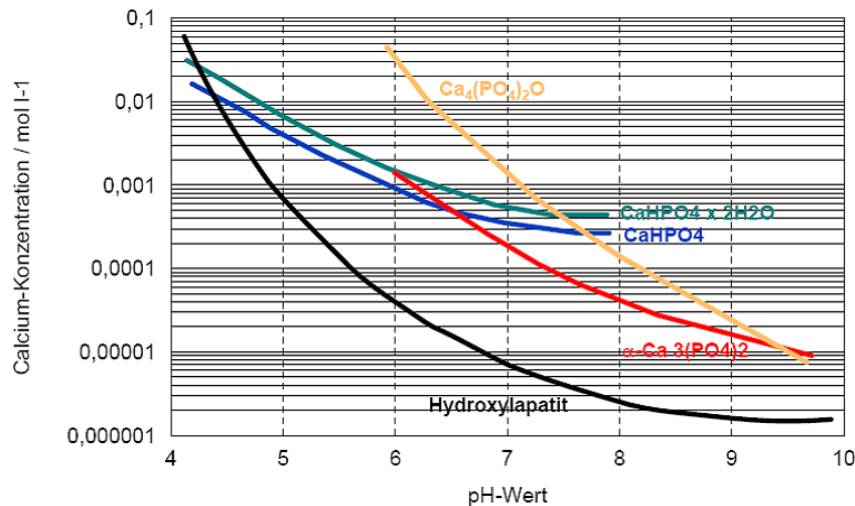


Abbildung 2.4: Berechnete Löslichkeitsisothermen einiger Calciumorthophosphate in Abhängigkeit des pH-Werts der Lösung bei 37°C (Abbildung entnommen aus [Gbu04]).

Demnach ist Hydroxylapatit oberhalb eines pH-Wertes von 4.5 die stabilste Phase.

Die nachfolgenden Seiten sind der Beschreibung ausgewählter Vertreter der Calciumorthophosphate gewidmet.

ACP

ACP (Amorphes Calciumphosphat $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4.5$; 15–20% H_2O) ist häufig ein Zwischenprodukt bei der Fällung von Calciumphosphaten aus wässriger Lösung [Ean73, Mey78a, Mey78b, Ter72, Wut85]. Seine chemische Zusammensetzung hängt stark von den Fällungsbedingungen (pH-Wert, Calcium- und Phosphatkonzentrationen) ab. So wurde beispielsweise ACP mit einem mol. Ca/P-Verhältnis von 1.18 (Fällung bei pH-Wert 6.6), 1.53 (Fällung bei pH-Wert 11.7) [EII94, EII98] bis hin zu 2.5 beschrieben [LeG91, LeG94, LeG01].

Die Umwandlung oder Hydrolyse von ACP zu nanokristallinem HA erfolgt sowohl in Lösung innerhalb weniger Stunden als auch im festen Zustand innerhalb einiger Monate [Pue82]. Die Umwandlung von ACP wurde im Einzelnen sehr genau untersucht und als Reaktion, die einer Kinetik erster Ordnung folgt, erkannt. Die Umwandlung erfolgt in drei Phasen, wobei zunächst eine langsame Induktionsperiode erfolgt, bei der nur geringe Änderungen des Anteils der kristallinen Phase beobachtbar sind. In der zweiten, der Umwandlungsperiode, steigt der Anteil der kristallinen Phase gemessen an der Zeit relativ schnell an. Als letztes erfolgt eine Abkling-

periode, in der nur noch geringe Änderungen des Anteils der kristallinen Phase beobachtbar sind. Eine Steigerung des pH-Werts bringt dabei eine Verlängerung der Umwandlungszeit mit sich [Bos73].

Die Struktur von ACP ist immer noch nicht eindeutig bestimmt. IR-Spektren von ACP zeigen breite Phosphatbanden. Gemäß dem Röntgendiffraktogramm ist ACP amorph. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen wird es gewöhnlich als annähernd runde Partikel mit Durchmessern von 20 nm bis 200 nm ohne besondere Morphologie beschrieben. Möglicherweise hat ACP eine apatitische Mikrostruktur mit einer so kleinen Domänengröße, dass es röntgenamorph ist. Diese Annahme wird gestützt durch röntgenabsorptions-spektroskopische Messungen (EXAFS) an biologischen und synthetischen Proben [Har86, Har87, Pet00, Tay98]. Andererseits wurde auch vorgeschlagen, dass die strukturelle Grundeinheit von ACP ein annähernd kugelförmiger Cluster mit einem Durchmesser von etwa 9.5 Å und der Zusammensetzung $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ ist [Eli94, Eli98]. Solche Cluster wurden experimentell als erste Keime während der Kristallisation von Hydroxylapatit gefunden. Auf dieser Basis wurde ein Modell vorgeschlagen, das die Kristallisation von Hydroxylapatit als stufenweise Zusammenlagerung dieser Einheiten beschreibt [Hes99, LeG91, LeG94, LeG01].

DCPD

DCPD (Dicalciumphosphat-Dihydrat, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Mineral Brushit) kann leicht aus wässriger Lösung kristallisiert werden. Es entwässert leicht zu Dicalciumphosphat-Anhydrat (CaHPO_4 , Mineral Monetit) oberhalb 80°C. Biologisch ist es wichtig, da es häufig in pathologischen Verkalkungen (Zahnstein, Chondrocalcinose [LeG91, LeG94, LeG01] und Blasensteinen [Hes99]) vorkommt. Weiterhin wurde es als intermediäre Phase in der Knochenbildung und bei der Auflösung von Zahnschmelz durch Karies postuliert [Hes99, LeG91, LeG94, LeG01].

In der Chirurgie wird es in Calciumphosphatzementen verwendet [Dri94, Dri98, Ham96, Kur97, Ots93, Tak98, Yam98] und in Zahnpasta zusammen mit fluoridhaltigen Verbindungen (z. B. NaF) zur Kariesprophylaxe [Cra87, Gaf93, Hop88, Wef87]. Weitere Anwendung findet DCPD als Düngemittel [Bec89a], in der Glasherstellung und als Calciumquelle in Nahrungsmitteln [Win83].

OCP

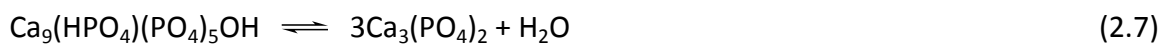
OCP (Octacalciumphosphat, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) tritt häufig als metastabile Zwischenphase bei der Ausfällung von thermodynamisch stabileren Calciumphosphaten (Hydroxylapatit, calciumdefizienter Hydroxylapatit) aus wässriger Lösung auf. Strukturell besteht es aus apatitähnlichen Schichten, die durch hydratisierte Schichten getrennt sind. Es ist als stabiler Bestandteil von Zahnstein und Blasensteinen von großer biologischer Bedeutung [Cho01, LeG74, Sch69]. Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle als Zwischenprodukt bei der Bildung von Biomineralien *in vivo*.

Ein „zentraler OCP-Einschluss“ (auch als „zentrale dunkle Linie“ bezeichnet) wurde durch Transmissionselektronenmikroskopie in vielen biologischen und einigen synthetischen Apatiten gefunden [Aob98, Bod98, Iij96, Nel86].

OCP selbst wurde nicht bei Gefäßverkalkungen nachgewiesen, aber als Vorstufe zum biologischen Apatit bei der Verkalkung von natürlichen und künstlichen Herzklappen postuliert [Nan20, Tom94].

β -TCP

β -TCP (β -Tricalciumphosphat) ist ein Calciumorthophosphat mit der stöchiometrischen Zusammensetzung $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Es kann nicht aus wässriger Lösung gefällt, sondern nur durch Calcinieren oberhalb 800°C hergestellt werden (z.B. aus calciumdefizientem Hydroxylapatit, siehe Rktgl. 2.7):



Oberhalb von 1125°C wandelt es sich in die Hochtemperaturphase α -TCP um. Da β -TCP die stabilere Phase bei Raumtemperatur ist, hat es eine geringere Löslichkeit als α -TCP (Tabelle 2.3). Reines β -TCP kommt als Biomaterial nicht vor. Lediglich die magnesiumhaltige Form (in der Mineralogie als Whitlockit) mit der Formel $\beta\text{-(Ca,Mg)}_3(\text{PO}_4)_2$ wurde in Zahnstein, Blasensteinen, Speicheldrüsensteinen, Kariesbildungen, arthritischem Knorpel und einigen Verkalkungen im Weichgewebe gefunden [Hes99, LeG91, LeG94, LeG01, Kod88].

In der Biomedizin wird β -TCP in calciumphosphathaltigen Knochenzementen verwendet. Eine Mischung von β -TCP mit Hydroxylapatit (= biphasisches Calciumphosphat) wird als Knochenersatz verwendet [Lem92, Mir89a, Mir89b, Mir90, Mir91, Ohu96]. Weitere Verwendung findet es als Düngemittel [Bec89a], Schleifmittel, in der Porzellan- und Emailleherstellung sowie als Tierfutterzusatz [Win83].

FA

FA (Fluorapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$) wird in der Regel als $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ geschrieben, um anzuzeigen, dass die Elementarzelle zwei Formeleinheiten enthält, ist die härteste (5 nach der Mohs Härteskala), stabilste und am geringsten lösliche Verbindung unter allen Calciumorthophosphaten (Tabelle 2.3) [Dac97]. Aufgrund seiner Eigenschaften ist FA das einzige Calciumorthophosphat, das in der Natur in großen Ablagerungen vorkommt, die für eine kommerzielle Nutzung geeignet sind [Ang00, Bec89b, McC73, Smi94]. Stöchiometrisch reiner FA tritt nie in biologischen Systemen auf. Offensichtlich ist ein Mangel an der erforderlichen Menge an toxischen Fluorid (die akute toxische Dosis von Fluorid ist $\sim 5\text{ mg/kg}$ Körpergewicht) in lebenden Organismen der Hauptgrund dieser Tatsache (Stöchiometrisch reiner FA enthält 3.7 Gew.-% Fluor). Haifischzahn-Enameloid [Car06, Dac80, Dac81, Dac97, Dah99, Low89, Wei03] und einige Exoskelette von Weichtieren [Lev04] sind Ausnahmen, weil sie erhebliche Mengen von FA enthalten. Unter allen normalen Hartgeweben des Menschen ist die höchste Konzentration von Fluorid in den Knochen und die niedrigste im Zahnschmelz vorhanden [Dri73, Fon05, Mor74, Vie05, Was04, Wie05]. Aber auch in Knochen ist die Gesamtmenge an Fluorid nicht ausreichend, um FA zu bilden.

2.2.1 Hydroxylapatit

HA (Hydroxylapatit, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) wird in der Regel als $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ geschrieben, um anzuzeigen, dass die Elementarzelle zwei Formeleinheiten umfasst, ist nach Fluorapatit das am geringsten lösliche und somit die zweitstabilste Verbindung unter allen Calciumorthophosphaten (Tabelle 2.3) [Dac97]. Synthetischer HA tritt in zwei Kristallstrukturen, der hexagonalen mit der Raumgruppe $P6_3/m$ und der monoklinen Struktur mit Raumgruppe $P2_1/b$, mit nur kleinen strukturellen Unterschieden auf [Ell73]. Die hexagonale Form (Abbildungen 2.5 bis 2.8) bildet sich in der Regel durch Fällung von HA aus übersättigten Lösungen bei 25°C bis 100°C und die monokline Form bildet sich in erster Linie durch Erhitzen der hexagonalen Form bei 850°C an Luft und anschließendes Abkühlen auf Raumtemperatur [Mar04]. Eine genaue Beschreibung der Kristallstruktur wurde erstmals 1964 durch Kay et al. veröffentlicht [Kay64, Pos75, You67].

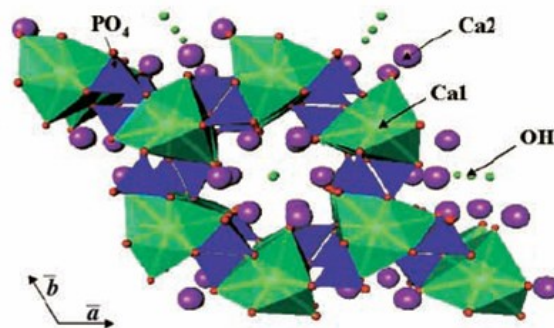


Abbildung 2.5a: Kristallstruktur von Hydroxylapatit $(\text{Ca1})_4(\text{Ca2})_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ in der hexagonalen Form, (Abbildung entnommen aus [Val01]).

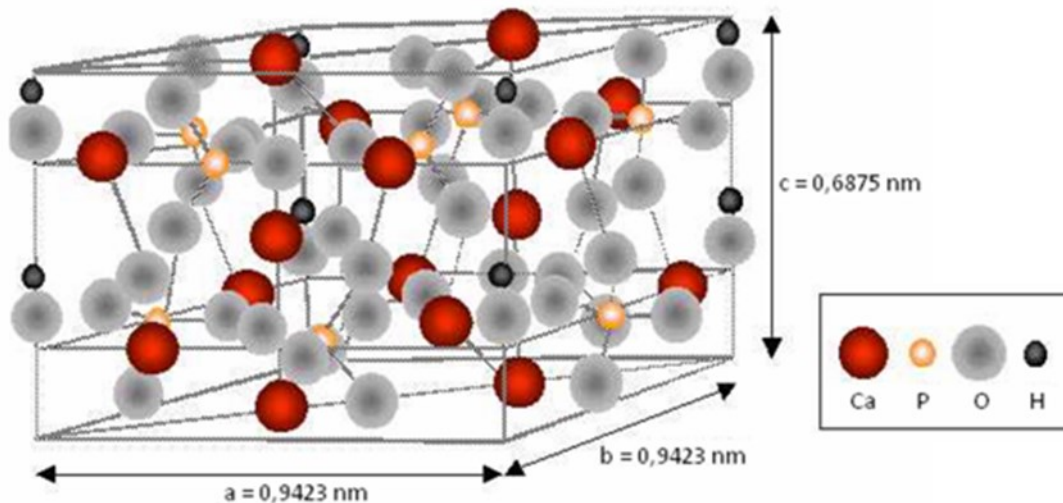


Abbildung 2.5b: Elementarzellen-Darstellung der Kristallstruktur von Hydroxylapatit in der hexagonalen Form (Abbildung entnommen aus [Gom08]).

Einen Eindruck der Anordnung der Ionen im Apatitgitter ist in den Abbildungen 2.6 bis 2.8 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 OH^- -Ionen positioniert sind. Jedes OH^- -Ion ist von einer trigonal-planaren Anordnung von Calcium-Ionen umgeben.

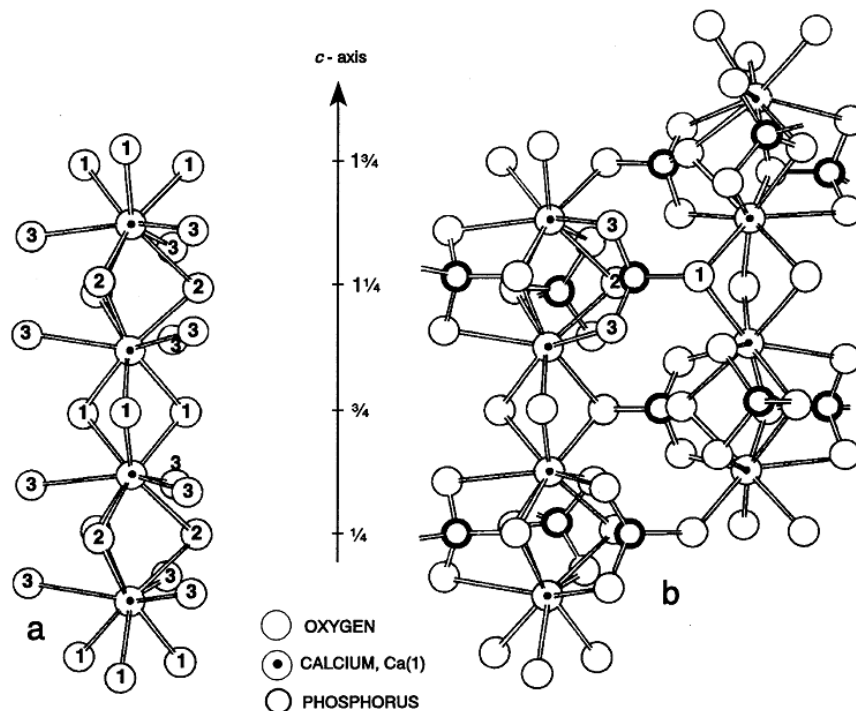


Abbildung 2.6: (a, b) Anordnung der Ionen im Kristallgitter von Hydroxylapatit in der hexagonalen Form. Die kristallographische c-Achse ist parallel zur Ansicht angeordnet (Abbildung entnommen aus [Ell02]).

Diese trigonalen Ebenen der Calcium-Ionen sind in Richtung der c-Achse jeweils um 60° zueinander verdreht. Bei Aufsicht in c-Achsenrichtung ergibt sich daher eine hexagonale Orientierung der Calcium-Ionen um die OH^- -Ionen. Weiterhin ist diese Calcium-Position von 6 weiteren Calcium-Ionen umgeben. Aufgrund der unterschiedlichen kristallographischen Umgebung werden die „kanalbildenden“ Ca^{2+} -Ionen als Ca-Typ-1-Positionen und die hexagonalen Calcium-Umgebungs-Ionen als Ca-Typ-2-Positionen bezeichnet. OH^- -Ionen ragen um 0.3 \AA aus dem Schwerpunkt der trigonalen Ebenen der Typ-1-Calcium-Ionen heraus. Die Stelle, in der die OH^- -Ionen positioniert sind, wird oft auch als „Ionenkanal“ bezeichnet. Im Fall einer Vollbesetzung dieser Position wären benachbarte Sauerstoffatome nur um 0.6 \AA voneinander entfernt. Die Position ist daher nur zu 50% besetzt und beide Orientierungen der OH^- -Ionen sind gleich häufig. In Abbildung 2.8 sind die möglichen Orientierungen der OH^- -Ionen innerhalb eines Ionenkanals dargestellt. Einen Beweis dafür, dass alle OH^- -Ionen in die gleiche Richtung orientiert sind, gibt es bisher noch nicht. Einfache Überlegungen bezüglich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen benachbarten Hydroxid-Ionen deuten darauf hin, jedoch konnte dies bisher nicht aus Messergebnissen abgeleitet werden. Dagegen sind die OH^- -Ionen im monoklinen Hydroxylapatit geordnet arrangiert. Monokliner Hydroxylapatit lässt sich meist nur unter Hochtemperaturbedingungen herstellen [Iko99a, Iko99b], in wässriger Lösung konnte er bisher nur selten dargestellt werden [Gou09].

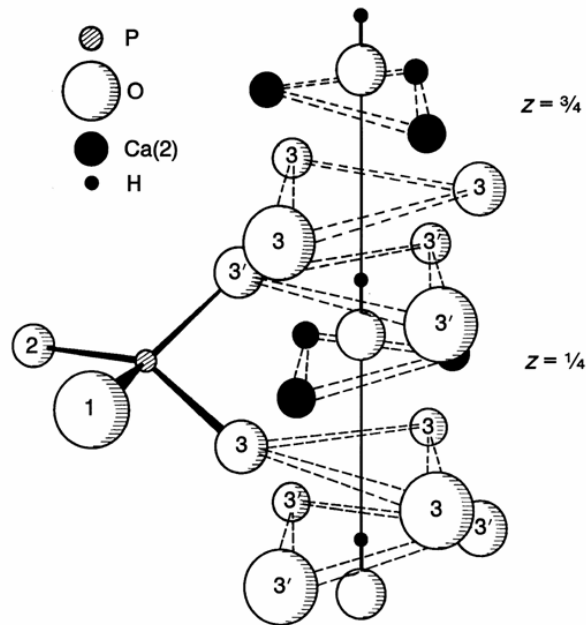


Abbildung 2.7: Anordnung der Ionen im Kristallgitter von Hydroxylapatit in der hexagonalen Form. Die kristallographische c-Achse ist parallel zur Ansicht angeordnet (Abbildung entnommen aus [Eil02]).

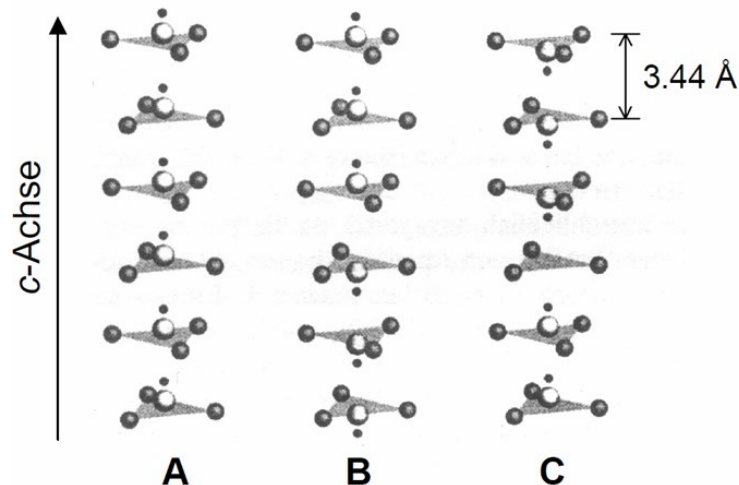


Abbildung 2.8: Mögliche Orientierungen der OH^- -Ionen innerhalb der Kanäle, die durch die Ca^{2+} -Ionen gebildet werden. Zur Verdeutlichung ist eine trigonale Ebene eingezeichnet, die von jeweils drei Calcium-Ionen aufgespannt wird. A: geordnete Idealstruktur, B: Fehlordnung ohne Lücke, C: Fehlordnung infolge eines Schottky-Defekts (Abbildung entnommen aus [Bus98]).

Stöchiometrisch reiner Hydroxylapatit kommt nicht in biologischen Systemen vor. Da der „biologische Apatit“ in Knochen oder Zähnen dem Hydroxylapatit (Tabelle 2.4) recht nahe kommt, wird Hydroxylapatit häufig als biologisch aktive Beschichtung auf chirurgischen und zahnmedizinischen Implantaten (z. B. Hüftendoprothese, Zahnimplantate) eingesetzt [Hen98, Suc98]. Ein Calciumphosphatzement auf Hydroxylapatit-Basis wurde vorgeschlagen [Ots93]. Wegen seiner Ähnlichkeit mit dem Knochenmineral wird Hydroxylapatit auch als stationäre Phase in der Flüssigchromatographie zur Trennung von Proteinen und anderen Biomolekülen eingesetzt [Fre99, Fou99, Mir99, She0, Wis00, Yin01]. Hydroxylapatite gelten seit Jahren als

wichtige Komponente für die Knochenregeneration. Bei den bisher angewandten HA-Materialien handelt es sich jedoch in den meisten Fällen um Keramiken [Har08]. Aus Herstellungsprozessen mit hohen Temperaturen gehen gesinterte Materialien hervor, die über eine geringe innere Oberfläche verfügen und von den Osteoklasten nur sehr schwer oder gar nicht abgebaut werden können [Har08].

In Abbildung 2.9 ist die Röntgenbeugungskurve von gesintertem, stöchiometrischem HA mit hexagonaler Kristallstruktur dargestellt [Mar04].

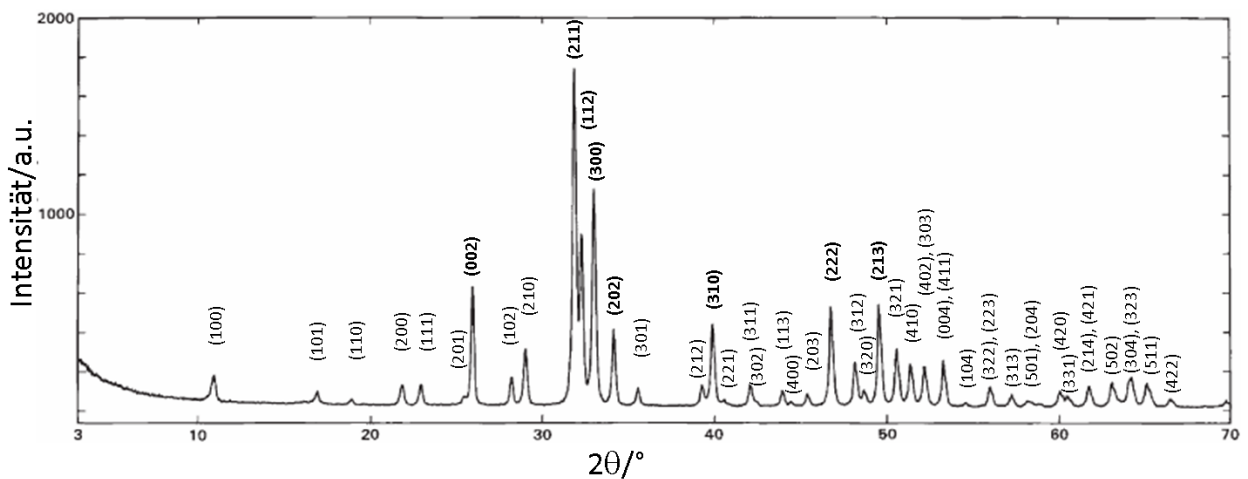


Abbildung 2.9: Röntgenbeugungskurve von stöchiometrischem HA mit hexagonaler Kristallstruktur. Die schmale Integralbreite der Reflexe deutet auf gesintertes HA hin (Definition der Integralbreite siehe Kap. 3.1). Die den Reflexen zugeordneten Netzebenenabstände sind mit den zugehörigen Millerschen Indizes (hkl) gekennzeichnet (Abbildung in Anlehnung an [Mar04]).

Seit Beginn der 90iger Jahre hat nanodimensionierter HA (10 nm bis 100 nm) viel Aufmerksamkeit wegen seiner überlegen funktionalen Eigenschaften gegenüber dem mikrodimensionierten Pendant erhalten. Ungesinterten HA mit knochenapatitähnlicher Struktur und Morphologie für Knochenaufbaumaterialien einzusetzen, verspricht eine Verbesserung des Knochenaufbaus. Vor allem Oberflächenreaktivität und Nanostruktur sind bestimmende Eigenschaften für die Gewebe-Material-Interaktion nach der Implantation. In den vergangenen Jahren wurden der Herstellung von nanokristallinem HA und seiner Komposite erhebliche Forschungsanstrengungen gewidmet, um nanoskalige Strukturen mit physikalischen, mechanischen, chemischen und biologischen Eigenschaften zu erhalten, die gegenüber mikrokristallinem HA besser, und zur gleichen Zeit, der Struktur von natürlichen Knochenmineral ähnlich sind. Es wurde gezeigt, dass nanokristalliner HA, im Vergleich zu herkömmlichem mikrokristallinem HA, die Adhäsion der Osteoblasten, die Differenzierung, Proliferation, Osteointegration und die Ablagerung von calciumhaltigen Mineralien auf seiner Oberfläche fördert, was zu verstärkter Bildung von neuem Knochengewebe innerhalb eines kurzen Zeitraums führt [Mur05, Web00].

CDHA (calciumdefizienter Hydroxylapatit) ist leicht durch Fällung herstellbar. Man gibt calcium- und phosphathaltige Lösungen simultan in kochendes Wasser und lässt die Suspension für einige Stunden kochen. Hierbei wandelt sich das zunächst gefällte OCP oder ACP (je nach pH-

Wert der Lösung) in CDHA um. Beim Erhitzen auf mehr als 700°C wandelt sich der gefällte CDHA in β -TCP (mol. Ca/P-Verhältnis 1.5) oder eine Mischung aus β -TCP und HA (mol. Ca/P-Verhältnis >1.5 und <1.67) um, je nach Stöchiometrie des Niederschlags. Die Mischung aus β -TCP und HA wird als biphasisches Calciumphosphat (BCP) bezeichnet [Ala01, Bou96, Dac89, Dac92, Dac98, Dac99, Wan98]. Durch den Einbau von Fremdionen entstehen nichtstöchiometrische Apatite. Schematisch werden mögliche Substitutionen in Abbildung 2.10 dargestellt. Bedingt durch den nichtstöchiometrischen Charakter enthält CDHA stets einen kleinen Anteil an Fremdionen (z. B. Na^+ , Cl^-), je nach den bei der Fällung anwesenden Fremdionen. Eine direkte Strukturbestimmung von CDHA ist daher schwierig und die angegebenen Elementarzellenparameter variieren.

Apatit

$\text{Me}_{10}(\text{XO}_4)_6(\text{Y})_2$

Stöchiometrischer HA	Ca^{2+}	PO_4^{3-}	OH^-
Mögliche Substitutionen	Sr^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , La^{3+} , Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} ... Leerstelle □	HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , SiO_4^{4-} ...	F^- , Cl^- , Br^- , CO_3^{2-} , O_2^{2-} ... Leerstelle □
↓			
Nichtstöchiometrische Apatite			

Abbildung 2.10: Große Variabilität der chemischen Zusammensetzung von Apatiten.

In erster Näherung kann CDHA als Hydroxylapatit mit Gitterstörungen durch Leer-, Fehlstellen und Fremdionen beschrieben werden [Bro99]. Entsprechend der chemischen Formel von CDHA (Tabelle 2.3) werden Leerstellen auf Calcium-Positionen (hauptsächlich Ca(2) [Jea94, Mor89]) und Hydroxid-Positionen angenommen. Über die Baufehler im Phosphat-Teilgitter ist bekannt, dass Phosphat teilweise protoniert und teilweise durch Carbonat substituiert ist.

Unsubstituierter CDHA (d. h. nur aus den Ionen Ca^{2+} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} und OH^- bestehend) kommt in biologischen Systemen nicht vor. In allen Fällen sind Fremdionen in unterschiedlichem Ausmaß vorhanden: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} und Sr^{2+} für Calcium; CO_3^{2-} für Phosphat; Cl^- , F^- und CO_3^{2-} für Hydroxid sowie der Einbau von Kristallwasser. Dies führt zum „biologischen Apatit“ (wird gelegentlich auch als „Bioapatit“ bezeichnet [Dan05, Men03, Pas05]) oder „Dahlit“, der Mineralphase in Hartgeweben und pathologischen Verkalkungen [LeG91, LeG94]. Aus diesem Grund ist CDHA ein vielversprechendes Material für synthetische Knochenersatzstoffe.

2.2.2 Mineralischer Hauptbestandteil des Knochens

Knochen bildet gemeinsam mit Knorpelgewebe den Stützapparat des Körpers. Es ist ein differenziertes Gewebe, welches sich durch Härte (Druckfestigkeit) und mäßige Elastizität auszeichnet. Die komplexe Zusammensetzung der extrazellulären Matrix bedingt diese Eigenschaften, wobei die Härte durch den hohen Gehalt an carbonathaltigen Apatitkristalliten und die Elastizität durch trajektorieell ausgerichtete, dichte Kollagenfibrillen geschaffen wird [Dre08]. Die wasserfreie Matrix besteht zu ca. 70% aus anorganischen und zu 30% aus organischen Substanzen. Der Wassergehalt der mineralisierten Knochenmatrix liegt zwischen 10% und 20% [Cur02]. Die Struktur von Knochen kann durch einen hierarchischen Aufbau auf unterschiedlichen Längenskalen erklärt und in bis zu sieben Organisationseinheiten unterteilt werden (Abbildung 2.11) [Ber07, Pas08, Rho98, Wei98].

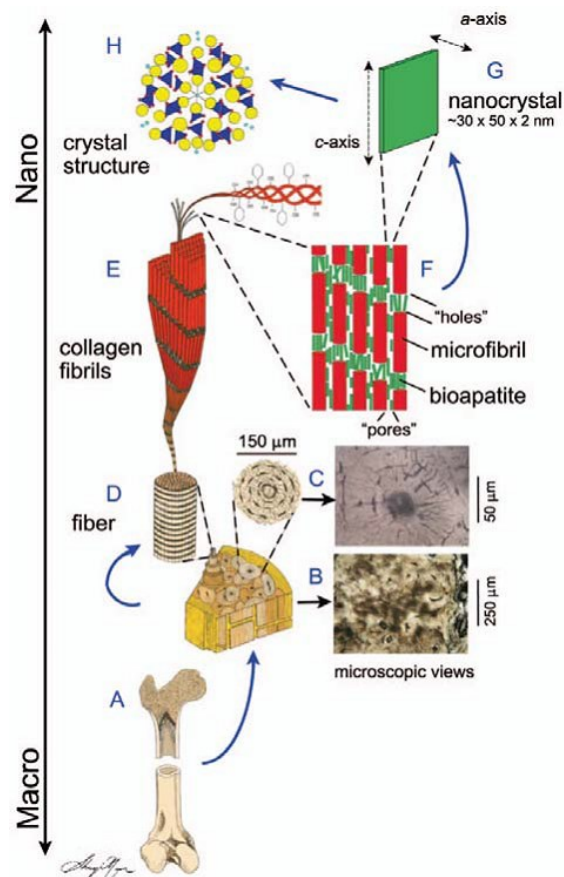


Abbildung 2.11: Diagrammschema der hierarchischen Struktur von Knochen (Abbildung entnommen aus [Pas08]).

Im Mikrobereich ist Knochen aus kleinen Bauelementen zusammengesetzt, den mineralisierten Kollagenfasern (Fibrillen) von etwa 80 nm bis 100 nm Durchmesser und einigen 10 µm Länge. Diese bestehen aus biologischem Apatit (BA) und Kollagenmolekülen vom Typ I. Letztere lagern sich zu Tripelhelices zusammen. Die Apatitkristallite im Knochen sind plättchenförmig gestreckt (entlang der kristallographischen c-Achse im Kristallit), ca. 2 nm bis 4 nm dünn (Tabelle 2.4) und parallel in die Kollagenfibrillen eingebaut [Wei98].

Tabelle 2.4: Zusammensetzung und Strukturparameter von humanem Knochen und HA ^[a] [Dor02].

	Knochen	Hydroxylapatit (HA)
Calcium [Gew.-%] ^[b]	34.8	39.6
Phosphor (als P) [Gew.-%] ^[b]	15.2	18.5
Ca:P (molares Verhältnis) ^[b]	1.71	1.67
Natrium [Gew.-%] ^[b]	0.9	–
Magnesium [Gew.-%] ^[b]	0.72	–
Kalium [Gew.-%] ^[b]	0.03	–
Carbonat (als CO ₃ ²⁻) [Gew.-%] ^[c]	7.4	–
Fluorid [Gew.-%] ^[b]	0.03	–
Chlorid [Gew.-%] ^[b]	0.13	–
Pyrophosphat (als P ₂ O ₇ ⁴⁻) [Gew.-%] ^[c]	0.07	–
Anorganischer Anteil [Gew.-%] ^[c]	65	100
Organischer Anteil [Gew.-%] ^[c]	25	–
Wasser [Gew.-%] ^[c]	10	–
a-Achse [Å] ^[d]	9.41	9.43
c-Achse [Å] ^[d]	6.89	6.89
Kristallinitätsindex (HA = 100)	33–37	100
Typische Kristallgröße [nm]	50·25·4	200–600
Calcinierungsprodukt (800 °C)	HA + CaO	HA
Elastizitätsmodul [GPa]	0.3–13.8	10
Druckfestigkeit [MPa]	150	100

[a] Wegen der beträchtlichen Streuung in biologischen Proben sind typische Werte angegeben.

[b] Calcinierte Proben. [c] Nichtcalcinierte Proben. [d] Gitterparameter $\pm 0.003 \text{ \AA}$.

Kristallite von biologischem Apatit in humanem Knochen weisen eine geringere Kristallgröße als die von gesinterter, stöchiometrischem HA auf und sind aufgrund ihrer höheren Löslichkeit für den Stoffwechsel und für den Austausch mit den Körperflüssigkeiten leichter verfügbar. Biologischer Apatit im humanen Knochen ist in erster Näherung ein nichtstöchiometrischer, carbonierter, calciumdefizienter Hydroxylapatit und lässt sich am besten durch die Summenformel $(\text{Ca},\text{Z})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{X})_2$ beschreiben, wobei $\text{Z}=\text{Na}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{K}^+, \text{Sr}^+, \text{usw.}$, $\text{Y}=\text{CO}_3^{2-}, \text{HPO}_4^{2-}$ und $\text{X}=\text{Cl}^-, \text{F}^-, \text{CO}_3^{2-}$ ist (Abbildung 2.10). Er kann Carbonat (2 Gew.-% bis 8 Gew.-%) und auch Natrium, Magnesium, Kalium, Chlor und Fluor speichern, indem diese Ionen im Austausch gegen Calcium und Phosphat in das Kristallgitter aufgenommen werden. Die Unterschiede in der chemischen Zusammensetzung und Kristallstruktur zwischen dem synthetisch hergestelltem, stöchiometrischem Hydroxylapatit und biologischem Apatit bedingen deren unterschiedliche Eigenschaften (Tabelle 2.4).

Im Rahmen der Promotionsarbeit wurden eigene Untersuchungen zur Struktur von humanem Femurknochen (trabekulärer Oberschenkelknochen) mit Röntgenbeugung, Elektronenmikroskopie und FTIR-Spektroskopie durchgeführt. In Abbildung 2.12a ist das Pulverdiffraktogramm von humanem Femurknochen und gesintertem HA dargestellt. In der Röntgenbeugungskurve von humanem Femurknochen zeigt sich eine Vergrößerung der Integralbreite der Reflexe gegenüber der der Reflexe von gesintertem HA.

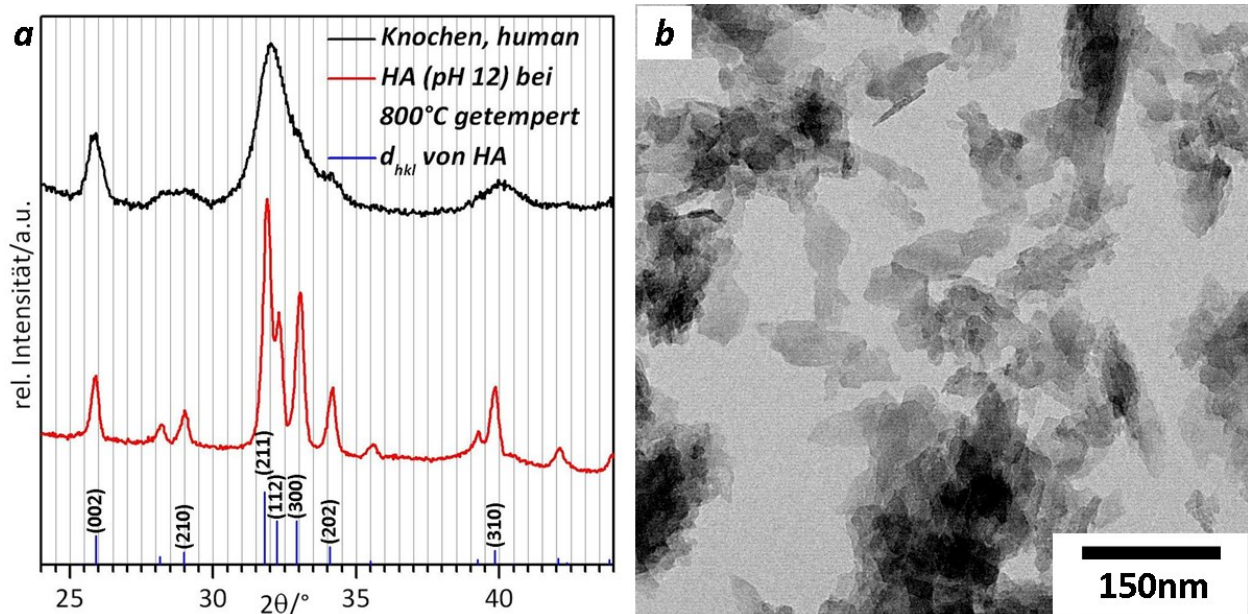


Abbildung 2.12: (a) Pulverdiffraktogramm von humanem Femurknochen (schwarz) und gesintertem HA (rot). Zur Phasenbestimmung sind einige d_{hkl} mit zugeordneten Miller-Indizes von stöchiometrischem HA angegeben, die aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen wurden. (b) TEM-Aufnahme von Bioapatitkristalliten, die aus humanem Femurknochen isoliert wurden, zeigt plättchenförmige Kristallite.

Aus humanem Femurknochen isolierte Bioapatitkristallite wurden mit Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) untersucht. Die TEM-Aufnahme in Abbildung 2.12b zeigt, dass diese als Plättchen vorliegen und etwa eine Ausdehnung von 40 nm bis 100 nm in der Länge, 20 nm bis 40 nm in der Breite und 4 nm bis 7 nm in der Dicke haben.

Weiner et al. hatten den mineralischen Anteil vom Knochen sechs verschiedener Wirbeltiere mit TEM untersucht [Wei86]. Es hat sich gezeigt, dass die Bioapatitkristallite im Knochen verschiedener Wirbeltiere plättchenförmig waren und eine ähnliche Größe hatten. Die Verteilung der Kristallitlängen und -breiten war in allen sechs Knochenproben ähnlich und die meisten Kristallite hatten maximale Längen zwischen 30 nm und 45 nm und maximale Breiten zwischen 15 nm und 30 nm. Nur Wal-Ohrknochen und humaner Femurknochen wiesen einen relativ großen Anteil von Kristalliten mit Längen und Breiten von mehr als 45 nm bzw. 30 nm auf.

Humaner Femurknochen wurde mit FTIR-Spektroskopie untersucht. Abbildung 2.13a zeigt dessen FTIR-Spektrum in der Übersicht und Abbildung 2.13b im Wellenzahlbereich von 1800 cm^{-1} bis 525 cm^{-1} .

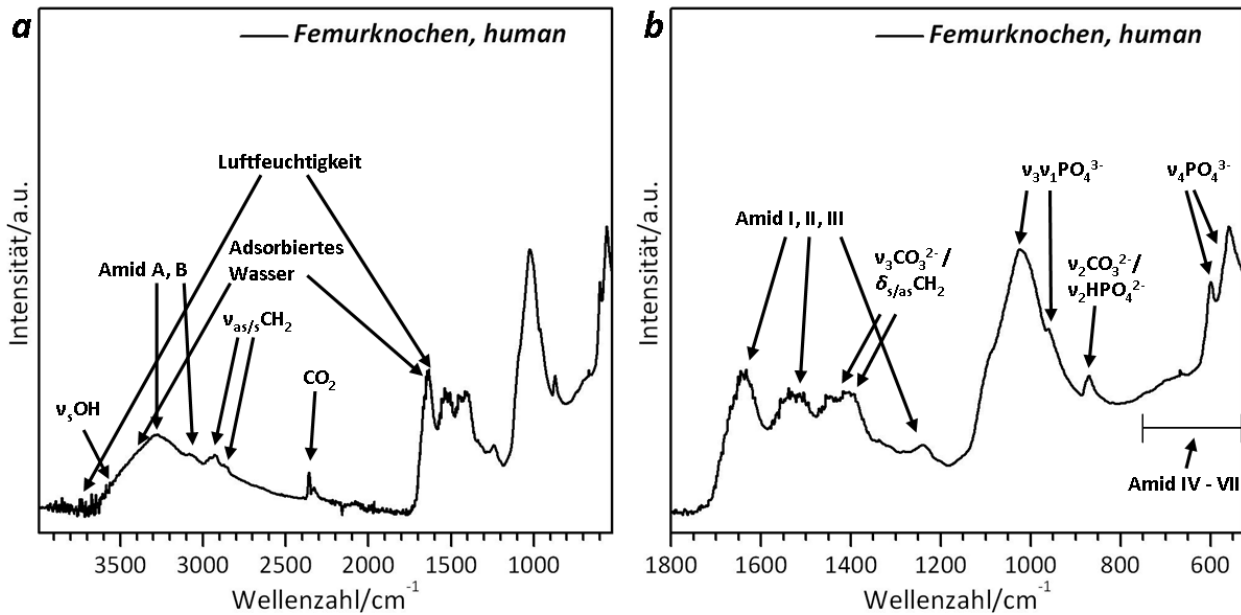


Abbildung 2.13: FTIR-Spektrum von humanem Femurknochen im Wellenzahlbereich von (a) 3990 cm^{-1} bis 525 cm^{-1} und (b) von 1800 cm^{-1} bis 525 cm^{-1} . Gemessen wurde mit der ATR-Methode.

Tabelle 2.5 fasst die IR-Daten und jeweiligen Bandenzuordnungen der einzelnen Schwingungsbanden von humanem Femurknochen zusammen. Die Zuordnung erfolgte ausgehend von bekannten Literaturdaten.

Tabelle 2.5: IR-Daten und Zuordnungen für humanen Femurknochen.

Wellenzahl/ cm^{-1}	Zuordnung	Referenz
525 - 750	Amid IV - VII	[Cha02, Fig12, Gar10, Roe94]
560 (s); 574 (s, sh); 601 (s, shp)	$\text{v}_4\text{PO}_4^{3-}$	[Fur01, Pal08, Pra06, Sam07]
870 (m)	B-Typ $\text{v}_2\text{CO}_3^{2-}/\text{HPO}_4^{2-}$	[Laf08, Li05, Yan08]/ [Heu77, Ray02, Sam07]
962 (m)	$\text{v}_1\text{PO}_4^{3-}$	[Fur01, Pal08, Pra06, Sam07]
1023 (vs); 1089 (s)	$\text{v}_3\text{PO}_4^{3-}$	[Fur01, Pal08, Pra06, Sam07]
1240 (w)	Amid III	[Cha02, Fig12, Gar10]
1424 (m); 1448 (m)	B-Typ $\text{v}_3\text{CO}_3^{2-}/\delta_{\text{s/as}}\text{CH}_2$	[Laf08, Li05, Yan08]/[Fig12]
1548 (m); 1634 (s)	Amid II, Amid I	[Cha02, Fig12, Gar10]
1595 (vw); 3800 - 3500 (vw, br)	Luftfeuchtigkeit	[Ber67, Jor71]
1640 (w); 3400 (w, br)	Adsorbiertes Wasser	[Kan05, Pal08]
2359 (w, shp)	CO_2	[Suc04]
2850 (w)	v_sCH_2	[Fig12, Yan08]
2930 (w)	$\text{v}_{\text{as}}\text{CH}_2$	[Fig12]
3072 (vw)	Amid B	[Cha02, Fig12, Gar10, Lee99]
3278 (w)	Amid A	[Cha02, Fig12, Gar10, Lee99]
3572 (vw)	v_sOH^-	[Big07, Mob07, Pra06, Ray02]

Es wurden folgende Abkürzungen für die Bandenzuordnungen verwendet: vs: sehr stark; s: stark; m: mittelstark; w: schwach; vw: sehr schwach; br: breit; shp: scharf; sh: Schulter; v: Valenzschwingung; δ : Deformationsschwingung.

Kapitel 3

Experimentelle Methoden

3.1 Röntgenpulverdiffraktometrie

Röntgenbeugungsmessungen an pulverförmigen Materialien erfolgten zum einen an einem Pulverdiffraktometer Stadi P (STOE & Cie, Darmstadt, Deutschland) mit parafokussierender Transmissionsgeometrie (Debye-Scherrer-Geometrie) an Luft. Die Pulver wurden hierbei in Probenhalter zwischen Hostaphanfolien gebracht. In $2\theta:\Omega$ -Einstellung wurde mit $\text{Cu-K}\alpha_1$ -Strahlung ($\lambda=0.15406\text{ nm}$) gemessen. Zur Monochromatisierung dieser Röntgenstrahlung wurde ein gebogener $\text{Ge}(111)$ -Monochromator verwendet. Die gestreute Röntgenstrahlung wurde mit einem geradlinigem, ortsempfindlichem Zählrohr-Detektor (linear PSD) registriert. Kapillar- und Reflexionsmessungen erfolgten zum anderen an einem Diffraktometer-System XRD 3000 (Rich. Seifert & Co GmbH & Co KG Röntgenwerk, Ahrensburg, Deutschland) in Bragg-Brentano Anordnung und die gestreute Röntgenstrahlung wurde mit einem gekrümmtem, ortsempfindlichem Detektor (INEL Inc, Stratham, NH) bzw. seit Ende 2011 mit einem ortsempfindlichem Detektor (OED) des Herstellers BRAUN registriert. Röntgenbeugungsmessungen in Bragg-Reflexion wurden an flach auf kreisförmige Plastikscheiben-Probenhalter gepresste Pulver mit $\text{Cu-K}\alpha_1$ -Strahlung durchgeführt. Die Kapillar-Messungen erfolgten zur Verringerung der Streuung der Röntgenstrahlung an Teilchen der Luft bei Unterdruck. Mit feinkörnigem Silicium wurden die Messungen standardmäßig kalibriert.

Das Maximum der Intensität I_{\max} eines Beugungspeaks wird bei einem Beugungswinkel θ_0 erreicht. Dieser Winkel wird auch als Glanzwinkel bezeichnet. Approximiert man einen Untergrundverlauf, dann ist die Nettointensitätshöhe I_0 die Differenz $I_{\max} - I_{U0}$. Aus der Fläche eines Beugungspeaks kann ein flächengleiches Rechteck mit der Höhe der Nettointensität I_0 gebildet werden. Die Breite dieses Rechteckes ist die Integralbreite IB [Spi09].

3.2 Rasterelektronenmikroskopie & Energiedispersive Röntgenspektroskopie

Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen wurde die Morphologie der zu untersuchenden Materialien mit einem Rasterelektronenmikroskop DSM960 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einem hochauflösenden Feldemissionsrasterelektronenmikroskop SUPRA25 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) untersucht. Durch das mit einem EDX-System von SAMx (Saint Laurent du Var, Frankreich) ausgestattete DSM960 Rasterelektronenmikroskop konnte die chemische Zusammensetzung der zu untersuchenden Materialoberfläche analysiert werden. Der Elektronenstrahl wurde verwendet, um die Emission

von Röntgenstrahlen aus der Probe zu erreichen, die charakteristisch für die enthaltenen Elemente sind. Diese charakteristische Röntgenstrahlung wurde mit einem Si(Li)-Kristall-Detektor (NORAN Instruments Inc, Middleton, USA) registriert. In Verbindung mit einem SAMx NumeriX „digital pulse processor“ konnte so neben einem hohen Durchsatz eine akzeptable Auflösung erhalten werden. Die digitale Bildaufnahme und Bildbearbeitung wurde mithilfe einer Hard- und Softwarelösung DISS5 (point electronic GmbH, Halle, Deutschland) realisiert. Die externe DISS5 Elektronik erzeugte die X- und Y-Ablenkspannungen, digitalisierte die analogen Bildsignale (SE, BSE) und/oder zählte die Impulse des EDX-Systems zur Erzeugung von Elementverteilungsbildern (Mappings) oder Konzentrationsprofilen (Linescans). Mithilfe der SAMx-Software IdFix wurden EDX-Spektren erfasst, dargestellt und ausgewertet. Im Allgemeinen wurde bei REM und EDX, wenn nicht anders angegeben, mit einer Beschleunigungsspannung von 10 kV gearbeitet. Soweit es für die Aufnahme von REM-Bildern und/oder der Untersuchung mit EDX erforderlich war, wurden die Materialien mit einem ca. 3 nm dünnen Metallfilm aus Gold (Au) und Palladium (Pd) in einem SC7620 Mini Sputter Coater (Quorum Technologies Ltd, Newhaven, England) bedampft.

3.3 Transmissionselektronenmikroskopie

Die Struktur der zu untersuchenden Materialien wurde im Nanometerbereich mit einem Transmissionselektronenmikroskop EM912 (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bzw. einem hochauflösenden Feldemissionstransmissionselektronenmikroskop JEM-AMR200F (JEOL (Germany) GmbH, Eching, Deutschland) untersucht. Beide Geräte sind mit einem Scan-Generator ausgestattet. Damit konnten Bilder im konventionellem TEM- und im STEM-Modus aufgenommen werden. Die TEM-Bilder wurden von einer CCD-Kamera mit einer Bildgröße von 2000 Pixel x 2000 Pixel aufgenommen. Für Bildaufnahmen im STEM-Modus standen ein Detektor für Sekundärelektronen (SE, nur beim EM912) sowie ein Hellfeld (BF)- und ein Dunkelfeld (DF)-Detektor zur Verfügung. Die digitale Bildaufnahme, Bildbearbeitung und Analyse wurde mittels der Software iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) realisiert.

Für die Untersuchung der Fällungsprodukte wurde ein Tropfen der aufgeschlämmten, alkoholischen Suspension auf ein Kupfernetzchen gegeben und einer Trocknung an Luft unterzogen. Das Kupfernetzchen war einseitig mit einem Kohlenstoff-Lochfilm belegt.

Für die Untersuchung sprühgetrockneter Pulver wurden diese zunächst in Araldit® eingebettet. Von den ausgehärteten Kunststoffblöcken wurden an einem Ultramikrotom Leica EM UC6 (Leica GmbH, Wetzlar, Deutschland) mit einem Diamantmesser ultradünne Schnitte (typischerweise 40 nm bis 80 nm) angefertigt. Diese wurden auf mit Kohlenstoff-Lochfilm belegte Kupfernetzchen gegeben. Wenn es für die Unterscheidung zwischen Einbettmaterial und Probe auf TEM- und STEM-Aufnahmen erforderlich war, konnte das Einbettmaterial durch geeignetes Erhitzen im Ofen graduell entfernt werden.

3.4 Infrarotspektroskopie

FT-IR-(Fourier-Transformations-Infrarot) Spektroskopie wurde mit einem Nicolet 380 FT-IR-Spektrometer (Thermo Electron) mit einer Smart Orbit ATR-Einheit durchgeführt. ATR (abgeschwächte Totalreflexion) ist eine IR-Probentechnik (siehe Anhang A.1). Die Spektrenaufzeichnung der ATR-Messungen erfolgte zwischen 4000cm^{-1} und 500cm^{-1} (MIR) bei Raumtemperatur. Es wurden jeweils 32 Scans bei einer Auflösung von 4cm^{-1} und in einer Messzeit von 40s durchgeführt. Vor jeder Messung erfolgte die Aufnahme eines Referenzspektrums der Atmosphäre, das nachträglich von den zu messenden Spektren der Proben abgezogen wurde.

3.5 Quecksilberporosimetrie & Gasadsorption

Die Porosität der zu untersuchenden Materialien wurde durch Quecksilberporosimetrie und Gasadsorption untersucht. Quecksilberporosimetrie diente der Bestimmung von Porengrößenverteilungen im Bereich von 4nm und $200\mu\text{m}$. Diese Methode basiert auf der Tatsache, dass eine nichtbenetzende Flüssigkeit nur dann in eine Pore eindringen kann, wenn ein äußerer hydrostatischer Druck angewandt wird. Quecksilber wurde hierbei mit Druck in die Poren der Probe gepresst. Die Messungen der Quecksilberintrusion wurden mit einer Kombination aus Niederdruck- und Hochdruck-Porosimeter PASCAL 140/440 (Thermo Fisher Scientific Inc., Milan, Italien) durchgeführt. Das kumulative Porenvolumen bei einem bestimmten Druck stellt das Gesamtvolumen von Quecksilber dar, das durch die Proben bei diesem Druck aufgenommen wurde. Der mittlere Porendurchmesser wurde durch die Anwendung der Washburn-Gleichung und einem zylindrischem Porenmodell berechnet.

Mit Gasadsorption lassen sich Porengrößenverteilungen mit Porendurchmessern bis in den Mikroporenbereich ($<2\text{nm}$) bestimmen. Die Messungen der Stickstoffsorption wurden mit einem Gasadsorptions-Porosimeter Sorptomatic 1990 (Thermo Fisher Scientific Inc., Milan, Italien) durchgeführt. Alle Materialien wurden mindestens 24 Stunden bei 10^{-5}mbar und 20°C vor der Messung entgast. Isothermen für Adsorption und Desorption wurden über einen relativen Druckbereich (p/p_0) von 0 bis 1.0 gemessen. Die Messungen der Stickstoffadsorption wurden auf Grundlage der Brunauer-Emmett-Teller-Theorie (BET-Theorie) ausgewertet. Die spezifischen Oberflächen wurden aus dem linearen Teil der BET-Gleichung in einem relativen Druckbereich der Adsorptionsisothermen zwischen 0.05 und 0.25 ermittelt. Bei der Auswertung wird entsprechend den IUPAC Empfehlungen bei -196°C ein Flächenbedarf von 0.162nm^2 pro adsorbiertem Stickstoffmolekül angenommen [Sin85]. Das Gesamtporenvolumen wurde durch die bei dem relativen Druck $p/p_0=0.99$ adsorbierte Gasmenge unter der Annahme abgeschätzt, dass die Poren vollständig mit dem kondensiertem Adsorptiv gefüllt wurden.

3.6 Histologische & Histomorphometrische Untersuchungen

Die Gewebeprobe aus den Tierversuchen wurden in phosphatgepufferten 4%igem Formalin (Grimm Med. Logistic GmbH) 2 Tage fixiert und danach in 20%iger EDTA-Lösung (pH 7.2 bis 7.4) über einen Zeitraum von 2 Wochen entmineralisiert. Die so behandelten Gewebeprobe wurden über eine aufsteigende Alkoholreihe mit abschließender Durchtränkung mit Xylol dehydriert und in Paraffin (Paraplast, Roth) eingebettet. Von den in Paraffin eingebetteten Gewebeprobe wurden in Längsrichtung 3 µm dünne Schnitte gefertigt. Die Schnitte, die vom mittleren Teil der Gewebeprobe stammen, wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) für die routinemäßige histologische Analyse gefärbt. Durch ein Lichtmikroskop Axioskop 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland), ausgestattet mit einer Kamera AxioCamMRc5, wurden Bilder mit einer Größe von 2584 Pixel x 1936 Pixel von HE-gefärbten histologischen Schnitten zusammen mithilfe der Software AxioVision (AxioVision 40 Version 4.8, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) erstellt.

Histomorphometrie wurde an lichtmikroskopischen Mikroaufnahmen von HE-gefärbten Schnitten durch planimetrische Analyse mithilfe derselben Software durchgeführt. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen der ursprünglichen Defektregionen wurden mit Adobe Photoshop® bearbeitet. Neu gebildeter Knochen wurde in diesen Aufnahmen markiert und durch die Software Analysis (Münster, Deutschland) analysiert. Die Bestimmung der Knochenneubildungsrate sowie der Anteil degradiertes Mikropartikel über den Versuchszeitraum erfolgten histomorphometrisch, wobei eine Untergliederung in Kortikalis und Markraum vorgenommen wurde.

Kapitel 4

Charakterisierung kommerziell erhältlicher Hydroxylapatit-Materialien

Das Interesse lag zunächst in der Suche nach kommerziell erhältlichen HA-Materialien mit Kristalliten bestimmter Morphologie, einheitlicher Größe und in ausreichender Menge, um bereits existierendes Biomaterial zu verbessern. Die biologische Funktionalität von HA-Materialien wird durch ihre Struktur determiniert. Natürliche Knochenapatitkristallite haben eine hohe biologische Funktionalität, die durch ihre Nanostruktur begründet ist. Daher wurde zunächst die Struktur kommerziell erhältlicher HA-Materialien untersucht und diese dann mit der von Knochenmineral verglichen.

4.1 Phasenreine Hydroxylapatit-Materialien

4.1.1 Synthetisch hergestellte Materialien

Synthetische HA-Materialien wurden in nanokristalline Pulver bzw. das Knochenersatzmaterial Ostim® eingeteilt. Bislang ist HA, in größerer Menge als nanokristallines Pulver, nur bei einer kleinen Auswahl von Anbietern, wie z. B. Fluka oder Merck, kommerziell verfügbar. Die Struktur der HA-Pulver von Fluka und Merck wurde durch Röntgenbeugung, Elektronenmikroskopie und EDX untersucht und mit der Struktur von humanem Knochenapatit in Kapitel 4.1.1.1 verglichen. Mit der gleichen Herangehensweise wurde das aus phasenreinem HA bestehende Biomaterial Ostim® in Kapitel 4.1.1.2 charakterisiert.

4.1.1.1 Nanokristalline Pulver

Die Ergebnisse der röntgendiffraktometrischen Untersuchung sind in Abbildung 4.1a dargestellt. Es zeigt sich, dass nur das HA-Pulver von Merck phasenrein ist. Das HA-Pulver von Fluka enthält als merkliche Verunreinigung das leichter lösliche Dicalciumphosphat-Anhydrat (DCPA), das auch als Mineral Monetit bekannt ist. Das Pulverdiffraktogramm zeigt auch, dass die Messkurven beider HA-Pulver, im Vergleich zur Messkurve von humanem Knochen, Reflexe mit kleinerer Integralbreite haben. Ein EDX-Spektrum der Merck-Probe in Abbildung 4.1b lässt erkennen, dass die auftretenden Signale und deren Intensitäten von Calcium, Phosphor, und Sauerstoff darauf hindeuten, dass das synthetische Knochenersatzmaterial aus HA besteht. Kohlenstoff und Magnesium treten als Verunreinigungen auf.

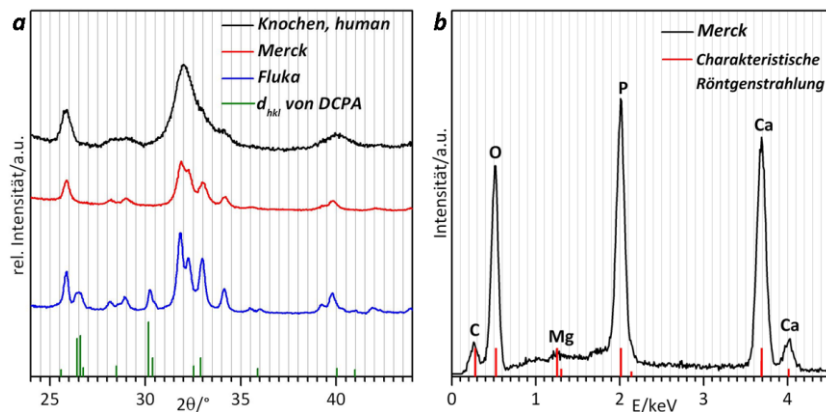


Abbildung 4.1: (a) Röntgenbeugungskurven der HA-Pulver von Fluka (blau), Merck (rot) und humanem Knochen (schwarz). Die Merck-Probe zeigt die Reflexe von HA. Die Fluka-Probe zeigt zusätzlich die Reflexe von DCPA. Die d_{hkl} von DCPA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-80 entnommen. (b) EDX-Spektrum der Merck-Probe.

Das von der Merck-Probe ermittelte atomare Ca/P-Verhältnis von 1.70 zeigt eine leichte Abweichung vom Wert 1.67 für stöchiometrischen HA, dass durch eine mögliche Substitution mit Carbonat zu erklären ist. Die transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 4.2 demonstriert, dass kommerziell erworbenes HA-Pulver von Fluka durch Kristallite unregelmäßiger Morphologie und Größe gekennzeichnet ist.

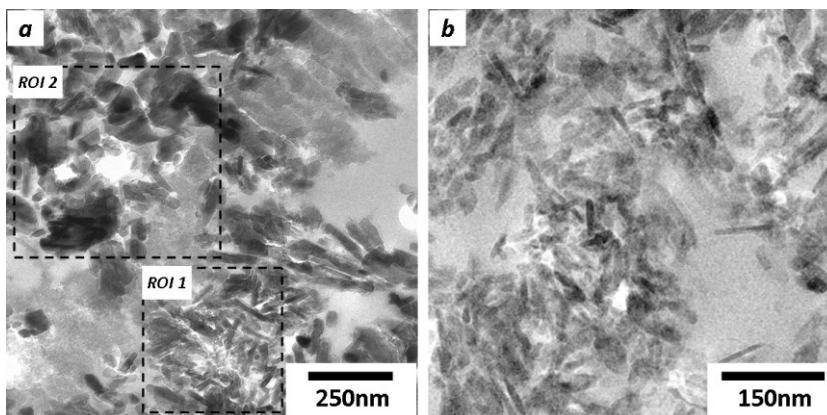


Abbildung 4.2: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen der HA-Pulver von Fluka (a) und Merck (b). Die Fluka-Probe enthält im Vergleich zur Merck-Probe Kristallite unregelmäßiger Form und Größe. Neben länglichen, quaderförmigen Kristalliten (in ROI 1) sind größer dimensionierte, blockförmige Kristallite (in ROI 2) zu erkennen.

Die Fluka-Probe enthält neben 75 nm bis 115 nm langen, 20 nm bis 40 nm breiten und 8 nm bis 17 nm dicken HA-Kristalliten, weitere, teils noch größer dimensionierte, blockförmige Kristallite. Bei der Merck-Probe sind bis zu 80 nm lange, bis zu 20 nm breite und 6 nm bis 10 nm dicke HA-Kristallite festzustellen. Die aus den TEM-Aufnahmen ermittelte Dicke der Kristallite beider HA-Pulver ist etwa zwei- bis viermal größer, als die der Kristallite von humanem Knochen und ist im Einklang mit den Aussagen der Röntgenbeugungsmessungen.

4.1.1.2 Biomaterial Ostim®

Das synthetische Knochenersatzmaterial Ostim® (aap Biomaterials GmbH, Dieburg, Deutschland) enthält laut Herstellerangaben vollsynthetischen, nanokristallinen, phasenreinen HA in einer wasserhaltigen Paste. Das Verhältnis der Massenanteile von HA:H₂O entspricht 3:2. Es soll dabei in seiner chemischen Zusammensetzung und kristallinen Struktur der Calciumphosphat-Komponente des natürlichen Knochens entsprechen. Die röntgendiffraktometrische Untersuchung, dargestellt in Abbildung 4.3a, verdeutlicht zum einen, dass Ostim® aus phasenreinem HA besteht, und zum anderen, dass die Messkurve des Biomaterials, im Vergleich zur Messkurve von humanem Knochen, Reflexe mit kleinerer Integralbreite hat. Aus der Zunahme der Intensität und der Abnahme der Integralbreite des (300)-Reflexes kann eine Dickenzunahme der HA-Kristallite gefolgert werden, was auch durch die TEM Aufnahme in Abbildung 4.3b belegt wird. Die Aufnahme wurde aus [Art06] entnommen und zeigt, dass Ostim® aus nadelförmigen HA-Kristalliten besteht, die Agglomerate formen. Huber et al. geben für die mittlere Kristallitgröße 100 nm x 20 nm x 3 nm an [Hub06].

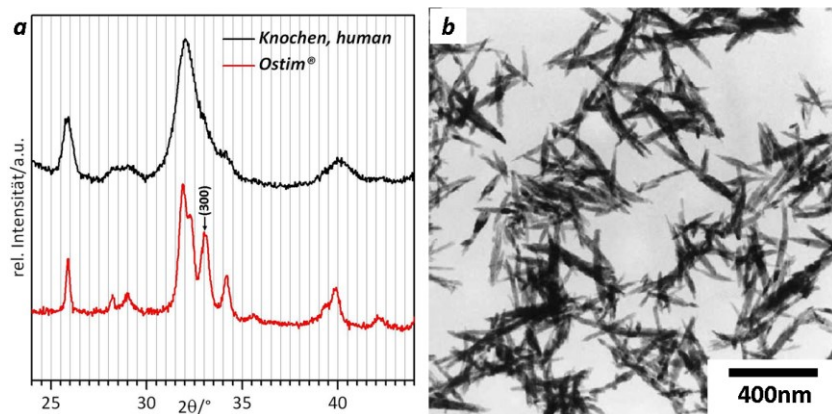


Abbildung 4.3: (a) XRD-Kurve von Ostim® (rot) und humanem Knochen (schwarz). Die Messkurve von Ostim® zeigt die Reflexe von HA. (b) TEM-Aufnahme von Ostim® (Bild entnommen aus [Art06]).

Allerdings sind in der TEM-Aufnahme nach eigener Überprüfung 100 nm bis 200 nm lange, 20 nm bis 40 nm breite und 7 nm bis 10 nm dicke HA-Kristallite zu erkennen. Die aus der TEM-Aufnahme ermittelte Dicke der HA-Kristallite ist etwa zwei- bis dreimal größer, als die der Kristallite von humanem Knochen und korreliert mit der Aussage der Röntgenbeugungsmessung.

4.1.2 Materialien biologischer Herkunft

4.1.2.1 Biomaterial Bio-Oss®

Beim xenogenen Knochenersatzmaterial Bio-Oss® (Geistlich Pharma AG, Wolhusen, Schweiz) handelt es sich um ein ungesintertes Biomaterial aus biologischem HA. Das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Bio-Oss® ist boviner, spongioser Knochen. Die organischen Anteile wurden laut Hersteller durch aufwändiges Reinigen mit stark alkalischer Lösung und mehrstündigem Behandeln bei hoher Temperatur entfernt. Die außerordentliche Ähnlichkeit zum menschlichen Knochen soll als Grund für die gute Knochenregeneration des Biomaterials gelten. Das Pulverdiffraktogramm in Abbildung 4.4a zeigt einerseits, dass das Biomaterial aus

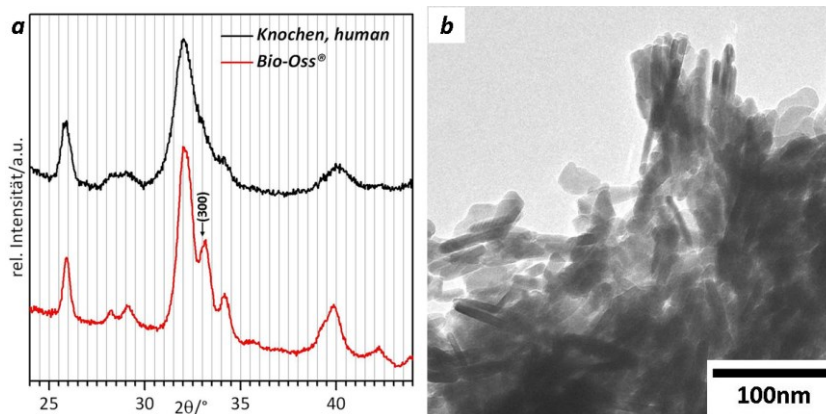


Abbildung 4.4: (a) XRD-Kurve von Bio-Oss® (rot) und humanem Knochen (schwarz). Die Messkurve von Bio-Oss® zeigt die Reflexe von HA. (b) TEM-Aufnahme von Bio-Oss®.

phasenreinem HA besteht und andererseits, dass die Messkurve des Biomaterials, im Vergleich zur Messkurve von humanem Knochen, Reflexe mit kleinerer Integralbreite hat. Aus der Zunahme der Intensität und der Abnahme der Integralbreite des (300)-Reflexes kann eine Zunahme der Dicke der HA-Kristallite gefolgert werden, was auch durch die TEM-Aufnahme in Abbildung 4.4b dokumentiert wird.

Wie die TEM-Aufnahme zeigt, sind 30 nm bis 70 nm lange, 15 nm bis 20 nm breite und 6 nm bis 10 nm dicke HA-Kristallite erkennbar. Die ermittelte Dicke der HA-Kristallite ist etwa zwei- bis dreimal größer, als die der Kristallite von humanem Knochen und deckt sich mit der Aussage der Röntgenbeugungsmessung.

4.1.2.2 Biomaterial Cerabone®

Beim xenogenen Knochenersatzmaterial Cerabone® (aap Biomaterials GmbH, Dieburg, Deutschland) handelt es sich um ein gesintertes Biomaterial aus biologischem HA. Das Ausgangsmaterial für die Herstellung von Cerabone® ist boviner, spongioser Knochen. Infolge einer Hochtemperaturbehandlung ist im fertigen Produkt kein Resteiweiß vorhanden. Das

Pulverdiffraktogramm der Biokeramik in Abbildung 4.5a zeigt zum einen, dass diese aus phasenreinem HA besteht, und zum anderen Reflexe mit einer kleinen Integralbreite, bedingt durch die großen Kristallite, die im Bereich von einigen Mikrometern liegen, was auch durch die REM-Aufnahme in Abbildung 4.5b dokumentiert wird. Die Messkurve der Biokeramik hat, im Vergleich zur Messkurve von humanem Knochen, Reflexe mit kleinerer Integralbreite. Aus der Zunahme der Intensität und der relativ starken Abnahme der Integralbreite des (210)-, (300)-, (310)-Reflexes kann eine starke Zunahme der Breite und Dicke der HA-Kristallite gefolgert werden. Die aus der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme ermittelte Dicke der HA-Kristallite ist etwa 500- bis 1000 mal größer, als die der Kristallite von humanem Knochen und korreliert mit der Aussage der Röntgenbeugungsmessung. Aufgrund der einige Mikrometer großen und im dichten Gefüge verbundenen HA-Kristallite hat Cerabone® den Charakter einer Keramik. Diese besitzt praktisch keine Porosität, die innere Oberfläche liegt im Bereich von $0.4\text{ m}^2/\text{g}$. Eine Resorption des Materials ist nach 6 Monaten praktisch kaum nachweisbar, was typisch für HA-Keramiken ist [Har08].

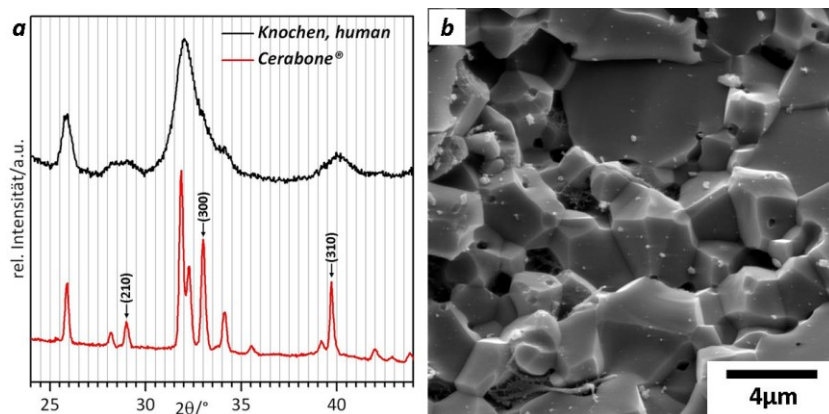


Abbildung 4.5: (a) XRD-Kurve von Cerabone® (rot) und humanem Knochen (schwarz). Die Messkurve von Cerabone® zeigt die Reflexe von HA. (b) REM-Aufnahme von Cerabone®.

4.2 Synthetische, siliciumdioxidhaltige Hydroxylapatit-Materialien

Der schon erwähnte positive Aspekt von SiO_2 bei der Knochenbildung wird durch die nachfolgend beschriebenen synthetischen Hydroxylapatit-Materialien aufgegriffen.

4.2.1 Biomaterial Actifuse™

Beim synthetischen Knochenersatzmaterial Actifuse™ (Apatech Ltd., Elstree, Hertfordshire, UK) handelt es sich um ein gesintertes Biomaterial aus synthetischem, silicatsubstituiertem HA, das eine Porosität von 80% aufweist. Das Verhältnis der Massenanteile von $\text{HA}:\text{SiO}_2$ entspricht laut Herstellerangaben 992:8. Das Pulverdiffraktogramm der Biokeramik in Abbildung 4.6a zeigt einerseits, dass diese aus HA besteht, und andererseits Reflexe mit einer kleinen Integralbreite,

bedingt durch große Kristallite, die im Bereich von etwa $0.5\ \mu\text{m}$ bis $2\ \mu\text{m}$ liegen. Dies wird auch durch das REM-Bild in Abbildung 4.6b dokumentiert. Die Messkurve der Biokeramik hat, im Vergleich zur Messkurve von humanem Knochen, Reflexe mit kleinerer Integralbreite. So kann aus der Zunahme der Intensität und der relativ starken Abnahme der Integralbreite des (210)-, (300)-, (310)-Reflexes eine starke Zunahme der Breite und Dicke der HA-Kristallite gefolgert werden. Die aus der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme ermittelte Dicke der HA-Kristallite ist etwa 100- bis 500mal größer, als die der Kristallite von humanem Knochen und korreliert mit der Aussage der Röntgenbeugungsmessung. Aufgrund der einige Mikrometer großen, im dichtem Gefüge verbundenen Kristallite und das in der gleichen Größenordnung auftretende Porensystem hat Actifuse™ den Charakter einer mikroporösen Biokeramik. Ein EDX-Spektrum von Actifuse™ in Abbildung 4.6c zeigt, dass die auftretenden Signale für Calcium, Phosphor, Sauerstoff und Silicium darauf hindeuten, dass das Biomaterial aus Calciumphosphat und SiO_2 besteht. Kohlenstoff liegt als Verunreinigung vor.

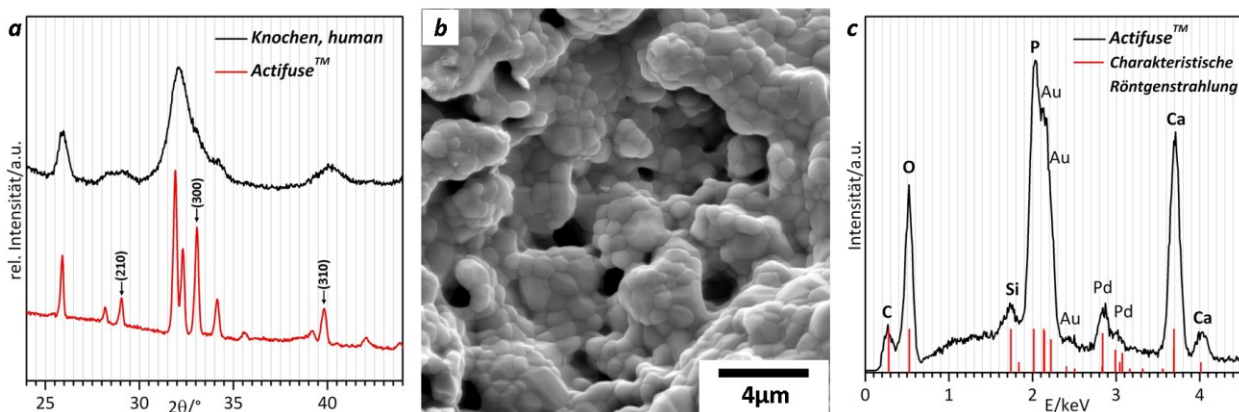


Abbildung 4.6: (a) XRD-Kurve von Actifuse™ (rot) und humanem Knochen (schwarz). Die Messkurve von Actifuse™ zeigt die Reflexe von HA. (b) REM-Aufnahme von Actifuse™. (c) EDX-Spektrum von Actifuse™. Die auftretenden Signale für Gold und Palladium stammen aus der aufgedampften Sputterschicht.

4.2.2 Biomaterial NanoBone®

NanoBone® (NB) ist ein vollsynthetisches Biomaterial für den Knochenersatz und Knochenaufbau, das aus HA-Nanokristallen, die von einer porösen Kieselgelmatrix (SiO_2 -Gelmatrix) ummantelt sind, besteht. Es wird in Form eines Granulats mit kontrollierter Morphologie in einem Sol-Gel-Prozess oberhalb des isoelektrischen Punktes von SiO_2 und einer geeigneten Temperaturbehandlung entwickelt, um zum einen das Dispersionsmittel und organische Rückstände zu entfernen und zum anderen eine möglichst hohe innere Oberfläche bzw. hohe Porosität zu erhalten. Ein Mikro-CT in Abbildung 4.7a veranschaulicht, dass NB-Granulat durch eine tannenzapfenartige Makrostruktur gekennzeichnet ist. Diese „Tannenzapfen“ liegen in einer lockeren Packung mit einer Schüttdichte von $(0.35 \pm 0.1)\text{g}/\text{cm}^3$ vor und haben einen Durchmesser von $0.6\ \text{mm}$ bzw. $1\ \text{mm}$ bei einer Länge von $2\ \text{mm}$ [Rad10].

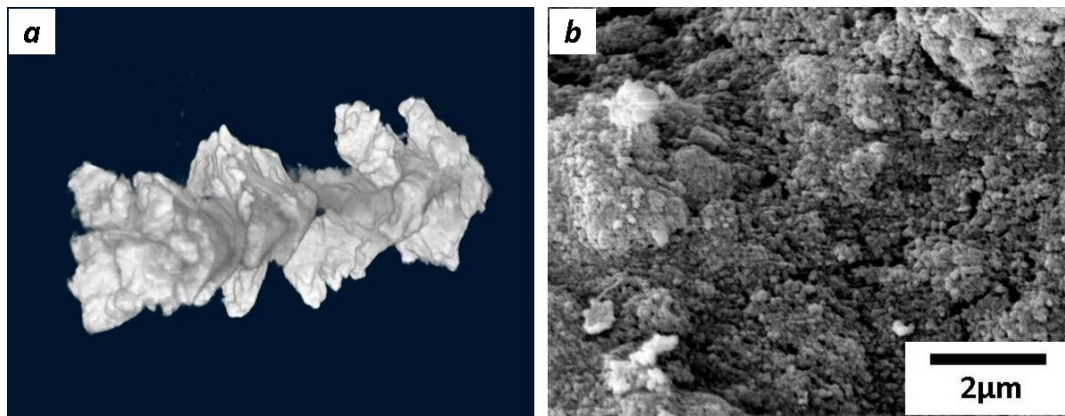


Abbildung 4.7: (a) Mikro-CT von NB-Granulat zeigt eine tannenzapfartige Makrostruktur. (b) REM-Aufnahme der Oberfläche von NB-Granulat. Erkennbar sind eine Vielzahl an interkonnektierenden Poren im Nanometerbereich.

NB ist nicht gesintert und hat dadurch eine hochporöse Oberfläche mit interkonnektierenden Poren im Nano- bis Mikrometerbereich. Im letztgenannten Bereich ist die Oberfläche fraktal gestaltet, mit einer Hausdorff-Dimension (D_f) von 2.2 und durch den Gelbildungsprozess determiniert [Rad10]. Beim Betrachten der Oberfläche von NB-Granulat im Rasterelektronenmikroskop zeigt sich die poröse Struktur des Biomaterials im Nanometerbereich (Abbildung 4.7b). Man erkennt an der Oberfläche eine dichte Packung von Körnern im Nanometerbereich. Die Packung der „Tannenzapfen“ ergibt eine Makroporosität von ca. 50%, was in etwa der Porosität von Spongiosa entspricht. Durch Quecksilberporosimetrie wurde eine Porosität von etwa 51% im Nanometerbereich bestimmt (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Werte zur spezifischen Oberfläche und Porosität von NB-Granulat.

Quecksilberporosimetrie				BET	
Spezifische Oberfläche in m^2/g	Mittlerer Poren-Durchmesser in nm	Totales kumulatives Volumen in cm^3/g	Totale Porosität in %	Spezifische Oberfläche in m^2/g	Poren-spezifisches Volumen in cm^3/g
81.77	34.6	0.54	51.5	85.10	0.20

Damit ergibt sich eine Gesamtporosität von ca. 75%, was eine hohe innere Oberfläche bedeutet. Die spezifische Oberfläche, die mit Quecksilberporosimetrie bestimmt wurde, ist etwas kleiner als die, die mit Gasadsorption bestimmt wurde, da bei der Quecksilberporosimetrie Poren, die kleiner als 4 nm sind, nicht berücksichtigt werden.

Die in NB eingesetzten HA-Nanokristalle entstammen aus kommerziell erhältlichem HA-Pulver von Merck, das in Kapitel 4.1.1.1 untersucht worden ist. Die SiO_2 -Gelmatrix ist von einem System interkonnektierender Poren durchzogen. Das Verhältnis der Massenanteile von HA: SiO_2 entspricht 76:24. Ein EDX-Spektrum von NB in Abbildung 4.8a zeigt, dass die auftretenden Signale für Calcium, Phosphor, Sauerstoff und Silicium darauf hindeuten, dass das Biomaterial aus Calciumphosphat und SiO_2 besteht. Kohlenstoff und Magnesium treten als Verunreinigung auf. Die röntgendiffraktometrische Untersuchung von NB in Abbildung 4.8b zeigt, dass die

Messkurve vom Biomaterial im Vergleich zur Messkurve von humanem Knochen, Reflexe mit kleinerer Integralbreite hat.

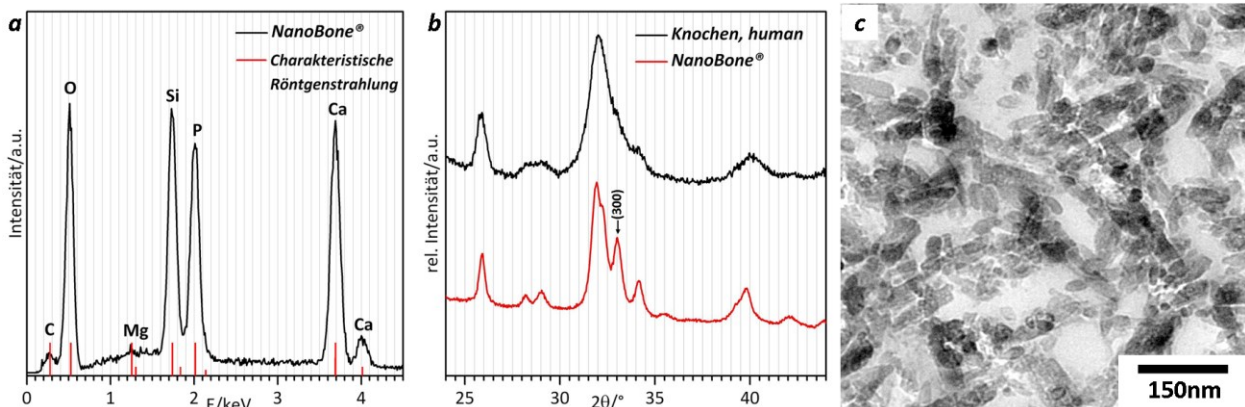


Abbildung 4.8: (a) EDX-Spektrum von NB. (b) XRD-Kurve von NB (rot) im Vergleich zu humanem Knochen (schwarz). Die Messkurve von NB zeigt die Reflexe von HA. (c) TEM-Aufnahme von NB-Granulat. HA-Nanokristalle sind von einer porösen Kieselgelmatrix (SiO₂-Gelmatrix) umschlossen. Die Probe ist ein Ultradünnschnitt und deshalb in Epoxid eingebettet. Es kann nicht zwischen Einbettmaterial und der SiO₂-Gelmatrix von NB unterschieden werden.

Aus der Zunahme der Intensität und der Verkleinerung der Integralbreite des (300)-Reflexes kann eine Zunahme der Dicke der HA-Kristallite gefolgert werden, was auch durch die TEM-Aufnahme in Abbildung 4.8c belegt wird, in der ein Ultradünnschnitt eingebettetem NB-Granulat dargestellt ist. Die HA-Nanokristalle sind als dunkle Objekte mit einer länglichen, stäbchenförmigen Morphologie erkennbar. Sie sind bis zu 80nm lang, bis zu 30nm breit, 7nm bis 10nm dick und ohne Vorzugsrichtung statistisch in der porösen SiO₂-Gelmatrix verteilt.

Die aus den TEM-Aufnahmen ermittelte Dicke der HA-Kristallite ist etwa zwei- bis dreimal größer, als die der Kristallite von humanem Knochen und korrelierte mit den Aussagen der XRD-Messung.

Zusammenfassend kann also als Ausgangssituation festgehalten werden, dass für alle untersuchten HA-Materialien hinsichtlich kristalliner Struktur, Dimension und Morphologie Abweichungen zu Kristalliten von humanem Knochen bestehen. Nanokristalliner HA mit der identischen kristallinen Struktur, Größe und Morphologie der Bioapatitkristallite des humanen Knochens ist derzeit auf dem Markt nicht verfügbar. Ziel ist es also selber ein Verfahren zu entwickeln, mit dem nanokristalliner HA mit knochenmineralähnlichen Eigenschaften in ausreichender Menge hergestellt werden kann. Dieser Lösungsweg, der den Vorteil einer vom Markt unabhängigen Herstellung bietet, ist Gegenstand der Literaturrecherche im Kapitel 5.1.

Kapitel 5

Synthese & Charakterisierung von nanokristallinem Hydroxylapatit

5.1 Methoden zur Herstellung von nanokristallinem Hydroxylapatit

Die Synthese von nanostrukturierten Materialien ist in allen drei bekannten Phasenzuständen möglich. Es handelt sich um Materialien, die Strukturelemente (z. B. Cluster, Kristallite oder Moleküle) enthalten, deren Abmessungen im Bereich von 1 nm bis 100 nm liegen [Mor01].

1. in Lösung (Kolloidchemie) bzw. aus der Schmelze:
 - Fällungs-, Reduktions-, Zersetzungsreaktionen
 - Sol-Gel-Prozesse
 - Kristallisation unterkühlter Schmelzen
2. aus der Gasphase (oder Plasma):
 - Inertgaskondensation
 - Flammenpyrolyse
 - CVD (Chemical Vapour Deposition)
3. in der Festphase:
 - Hochenergie-Kugelmahlen
 - Kristallisation amorpher Materialien (Gläser)

Die Morphologie von HA-Kristalliten ist vielfältig. Es lassen sich uniaxiale (spärliche, blockförmige), plättchen- bzw. stäbchenförmige Kristallite synthetisieren [Dor09].

Für die Herstellung von nanokristallinem HA in größerer Menge haben sich heutzutage Verfahren in Lösung etabliert. Dazu zählen die sehr häufig eingesetzten Fällungsreaktionen in wässriger Lösung. Hierbei können insbesondere HA-Nanokristalle mit kontrollierten Eigenschaften, wie der Morphologie, der Größe und der chemischen Zusammensetzung, hergestellt werden. Weitere Vorteile von Fällungsreaktionen sind die meist milden Synthesebedingungen (Raumtempertur, Normaldruck, an Luft), die eine einfache Durchführung ermöglichen. Nanokristalliner HA lässt sich hierbei kostengünstig in solcher Menge und Reinheit herstellen, das er sich zum Einsatz für die Produktion von Biomaterialien verwenden lässt.

Bei der nasschemischen Fällung handelt es sich um eine chemische Gleichgewichtsreaktion, bei der die Ausgangsstoffe im Lösungsmittel molekular dispers gelöst vorliegen und mindestens ein

Produkt in diesem Lösungsmittel un- oder schwer löslich ist. HA ist das am schwersten lösliche Calciumphosphat (CaP) im pH-Wert-Bereich von 6.5 bis 12 (Tabelle 2.3). Bei Fällungen können die chemische Zusammensetzung, die Struktur, die Morphologie und auch die Größenverteilung der ausfallenden Teilchen auf vielfältige Weise beeinflusst werden. Für die Teilchengrößenverteilung spielt zunächst die Geschwindigkeit bei der Mischung eine entscheidende Rolle. Bei einer schnell ablaufenden chemischen Fällung in einem gerührten Reaktor ist die Mischungsgeschwindigkeit, mit der die Reaktanden vermischt werden, langsamer als die Keimbildungsgeschwindigkeit. Darüber hinaus treten in einem solchen Reaktor bereits diffusionskontrolliert gefällte Teilchen ständig mit neu zugeführten Reaktanden und auch mit den daraus entstehenden Keimen in Kontakt. Dies führt letztlich zu einem unkontrollierbaren Teilchenwachstum und unterschiedlichen Teilchengrößen.

Eine Reihe wichtiger Syntheseparameter wie beispielsweise pH-Wert, Temperatur, Konzentration etc. haben bei einer Fällungsreaktion in wässriger Lösung Einfluss auf die Morphologie, Größe und chemische Zusammensetzung der HA-Kristallite. Insbesondere zeigt sich, dass der pH-Wert einen bedeutenden Einfluss auf die Morphologie der HA-Kristallite hat. Daher sind nachfolgend Beispiele aus der Literatur für die Synthese von nanokristallinem HA durch nasschemische Fällung aufgeführt, die nach steigendem pH-Wert der Fällungsreaktion geordnet sind.

Leskiv et al. stellten Calciumphosphat-Partikel durch homogene Fällung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2(\text{aq})$ mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ bei Raumtemperatur und verschiedenen pH-Werten in einem Durchflusskalorimeter her [Les09]. Der pH-Wert der $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ -Lösung wurde durch Zugabe von $\text{NaOH}(\text{s})$ vor der Fällung so eingestellt, dass der gewünschte pH-Wert bei der Mischung der Salzlösungen erreicht wurde. Bei pH-Wert 6.2 entstand eine Mischung aus überwiegend stäbchenförmigen HA-Kristalliten ($200\text{nm} \times 50\text{nm}$) und annähernd kugelförmigen Calciumphosphat-Partikeln (50nm bis 80nm im Durchmesser). Bei pH-Wert 8.2 und 10.8 entstanden nur noch amorphe kugelförmige Calciumphosphat-Partikel mit einem Durchmesser von 50nm bis 80nm .

Montalbert-Smith et al. stellten HA-Nanokristalle durch Elektrolyse einer wässrig homogenen Lösung, die die Komplexverbindung $\text{Ca}[\text{EDTA}]^{2-}$ u. Phosphat-Ionen (mol. Ca/P-Verhältnis=1.67) enthielt, bei pH-Wert 7.0 her [Mon09]. Dabei wurde in einer elektrochemischen Zelle eine stromkontrollierte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus EDTA-Komplexverbindung genutzt, um Keime für die HA-Kristallisation in der Lösung zu bilden. EDTA wurde dabei durch anodische Oxidation abgebaut. Bei pH-Wert 7.0 entstanden innerhalb von 4 Stunden sphärische HA-Kristallite (15nm bis 20nm im Durchmesser). Mit der Scherrer-Gleichung wurde eine mittlere Kristallitgröße von 23nm anhand des (002)-Reflexes von HA aus Röntgenbeugungsmessungen berechnet.

Viswanath et al. stellten HA-Nanokristalle durch Hydrothermalsynthese einer Mischung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2(\text{aq})$ mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ bei 150°C in 4 Stunden bei verschiedenen pH-Werten her

[Vis08]. Die pH-Wert-Einstellung der Mischung erfolgte durch Puffersubstanzen. Bei pH-Wert 7.0 entstanden stäbchenförmige HA-Kristallite mit einer durchschnittlichen Länge von 370 nm und einer Breite von 75 nm. Bei pH-Wert 9.2 entstanden stäbchenförmige HA-Kristallite mit einem Länge-Breite-Verhältnis von ca. drei bis vier. Bei pH-Wert 11 entstanden überwiegend HA-Kristallite von nahezu gleichachsiger Form und einigen leicht länglichen Kristalliten.

Tanaka et al. stellten HA-Nanokristalle durch eine Neutralisationsreaktion zwischen $\text{Ca(OH)}_2(\text{aq})$ und $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{aq})$ (mol. Ca/P-Verhältnis=1.67) bei pH-Wert 7.2 her [Tan03]. Dazu legten sie die Ca(OH)_2 -Suspension vor und gaben unter Rühren $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{aq})$ unmittelbar dazu. Der pH-Wert sank von knapp 14 sehr schnell auf 4.9 und stieg innerhalb kurzer Zeit auf einen stabilen Wert von 7.2. Nachdem die Fällungslösung 24 Stunden bei Raumtemperatur alterte, wurde das Fällungsprodukt durch Vakuumfiltration gewonnen. Aufreinigungsschritte waren nicht nötig, da keine Nebenprodukte anfielen. Jedoch kann nicht dissoziiertes Calciumhydroxid das hergestellte HA verunreinigen. Bei pH-Wert 7.2 entstanden sphärische HA-Partikel und mehrheitlich blockförmige HA-Kristallite. Der Durchmesser der sphärischen HA-Partikel war im Bereich von 25 nm bis 70 nm. Die Länge bzw. Breite der blockförmigen HA-Kristallite war im Bereich von 50 nm bis 100 nm bzw. von 20 nm bis 40 nm.

Sarig et al. stellten HA-Nanokristalle durch homogene Fällung von $\text{CaCl}_2(\text{aq})$ und $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ (mol. Ca/P-Verhältnis=1.67) unter Einfluss von Mikrowellenstrahlung bei Raumtemperatur und pH-Wert 7.4 her [Sar02]. Beide Lösungen wurden bei pH 7.4 durch Beimischung der Puffersubstanz TRIS gehalten. Es wurden plättchenförmige HA-Kristallite mit einer Kantenlänge von bis zu 300 nm erhalten. Die HA-Kristallite bildeten sphärolithische Agglomerate mit einer engen Größenverteilung von 2 μm bis 4 μm .

Raynaud et al. stellten HA-Nanokristalle durch Fällung von $\text{Ca(NO}_3)_2(\text{aq})$ mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ (mol. Ca/P-Verhältnis=1.667) bei 95°C bei pH-Wert 8 unter Argon-Atmosphäre her [Ray02]. Dazu legten sie $\text{Ca(NO}_3)_2(\text{aq})$ vor und gaben unter Rühren $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ dazu. Der pH-Wert der Fällungslösung wurde auf einem konstanten Wert durch die Zugabe von NH_4OH -Lösung mit einem pH-Stat-Gerät (Hanna Instruments) beibehalten. Bei pH-Wert 8 wurden stäbchenförmige HA-Kristallite mit einer mittleren Länge von ca. 100 nm erhalten. Die HA-Kristallite bildeten Agglomerate.

Padilla et al. stellten Nanokristalle aus carbonathaltigem HA (CHA) durch Fällung von $\text{Ca(NO}_3)_2(\text{aq})$ (Lösung A) mit einer wässrigen Lösung von $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (mol. Ca/P-Verhältnis=1.667) und $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (Lösung B) bei 37°C her [Pad08]. Der pH-Wert der Lösung B wurde durch Hinzufügen einer NH_4OH -Lösung auf 9.2 eingestellt. Es entstanden stäbchenförmige, carbonathaltige HA-Kristallite mit einer Länge von 15 nm bis 20 nm und einer Breite von 3 nm bis 5 nm. Die carbonathaltigen HA-Kristallite bildeten Agglomerate, hatten eine hohe spezifische Oberfläche a_{BET} von $300 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ und enthielten 8 Gew.-% Carbonat (vergleichbar mit dem Carbonatgehalt von Knochenapatit).

Rodriguez-Lorenzo et al. stellten HA-Nanokristalle durch homogene Fällung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2(\text{aq})$ mit $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4(\text{aq})$ (mol. Ca/P-Verhältnis=1.667) bei 25°C und pH-Wert 10 her [Rod00]. Der pH-Wert wurde durch Hinzufügen einer NH_4OH -Lösung auf 10 eingestellt. Es entstanden stäbchenförmige HA-Kristallite. Über die Scherrer-Gleichung wurde eine mittlere Kristallitgröße von 22 nm anhand des (002)-Reflexes von HA aus Röntgenbeugungsmessungen berechnet.

Liou et al. stellten HA-Nanokristalle durch Fällung von $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2(\text{aq})$ mit $\text{H}_3\text{PO}_4(\text{aq})$ (mol. Ca/P-Verhältnis=1.67) bei 25°C und einem pH-Wert von ca. 10 her [Lio04]. Zur Fällung wurde die H_3PO_4 -Lösung in die $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ -Lösung gepumpt. NH_4OH -Lösung (25%, Merck) wurde verwendet, um die Fällungslösung bei vorgegebenen pH-Wert (in der Nähe von 10) während der gesamten Synthese zu halten. Es entstanden nadelförmige HA-Kristallite mit einer Länge von 40 nm bis 50 nm und einem Durchmesser von 5 nm bis 10 nm. Die HA-Kristallite bildeten Agglomerate.

Zusammenfassend zeigte sich,

- dass sich durch die vorgestellten Syntheseverfahren bei jeweils verschiedenen Synthesebedingungen HA-Nanokristalle mit unterschiedlichen Morphologien herstellen lassen. Insbesondere sind Fällungsreaktionen zur Herstellung von plättchenförmigen HA geeignet.
- dass sich HA-Nanokristalle mit knochenmineralähnlicher Morphologie vorwiegend im pH-Wert-Bereich von 7 bis 8 bei Raumtemperatur und Normaldruck durch Fällungsreaktion herstellen lassen. Allerdings sind die HA-Plättchen im Mittel deutlich größer als Knochenapatitkristallite.
- dass bei pH-Werten oberhalb von 8, steigenden Temperaturen und Drücken die plättchenförmige Morphologie der gefällten HA-Nanokristalle durch Wachstumsprozesse verloren geht.
- dass sich eine Korrelation zwischen dem Fällungs-pH-Wert und der Morphologie der HA-Nanokristalle aufstellen lässt. So werden bei pH-Werten ab 7 in der Regel HA-Nanokristalle mit sphärischer und oberhalb von 8 mit stäbchenförmiger Morphologie gefunden.
- dass HA-Nanokristalle, die eine Kristallmorphologie und Größe haben, die der Kristallite des natürlichen Knochenminerals entspricht, bei keinem der aufgezählten Verfahren entstanden sind.

Daher wurde im pH-Wert-Bereich von 7 bis 13 bei Raumtemperatur, Normaldruck experimentell untersucht, wie sich mittels stabiler Synthesebedingungen nanokristalliner HA mit plättchenförmiger Morphologie und einer Kristallgröße, die der der Kristallite des humanem Knochens entspricht, in ausreichender Menge durch ein nasschemisches Fällungsverfahren herstellen lässt.

5.2 Nasschemische Synthese von Hydroxylapatit-Nanokristallen

5.2.1 Materialien, Geräte & allgemeine Versuchsdurchführung

Zur Herstellung von Hydroxylapatit wurde eine Fällungsapparatur aufgebaut (Abbildung 5.1 und 5.2). Für den Fällungsprozess unter Reinraumbedingungen und normalen atmosphärischen Bedingungen wurden zunächst eine calcium- und eine phosphathaltige Lösung in zwei Rührgefäßen (1, 2) separat vorgelegt. Das Verhältnis der Stoffmengenkonzentrationen der Ausgangslösungen wurde so eingestellt, wie es formal dem molarem Ca/P-Verhältnis von HA (1.67) entspricht. Die pH-Wert-Einstellung erfolgte durch Zugabe von 25%igem Ammoniakwasser zur Phosphatsalz-Lösung vor Beginn einer Fällung, so dass der gewünschte pH-Wert bei der Mischung der Salzlösungen erreicht wurde. Durch eine Dosierpumpe mit zwei Taumelkolbenpumpenköpfen (3, 4) wurden gleichgroße Volumenanteile an Calciumsalz- und Phosphatsalz-Lösung in einer Durchflussmischzelle (5) unter Eintrag von Ultraschallwellen zusammengeführt. Die Leitfähigkeit und Temperatur der Fällungslösung wurden kontinuierlich direkt nach dem Austreten aus der Durchflussmischzelle zur Kontrolle der Fällungsparameter aufgenommen. Der pH-Wert der Fällungslösung wurde zu Beginn der Fällung durch eine Probenentnahme überprüft. Die Fällungslösung wurde in eine Filtrerröhreinheit (7) geleitet, um nach einer bestimmten Standzeit der Fällungslösung sowohl das Produkt zu gewinnen als auch die leichtlöslichen Nebenprodukte Ammonium- und Natriumchlorid durch Unterdruckfiltration zu entfernen. Deionisiertes Wasser wurde hierzu über ein Vorlagegefäß (6) der Filtrerröhreinheit zugeführt.

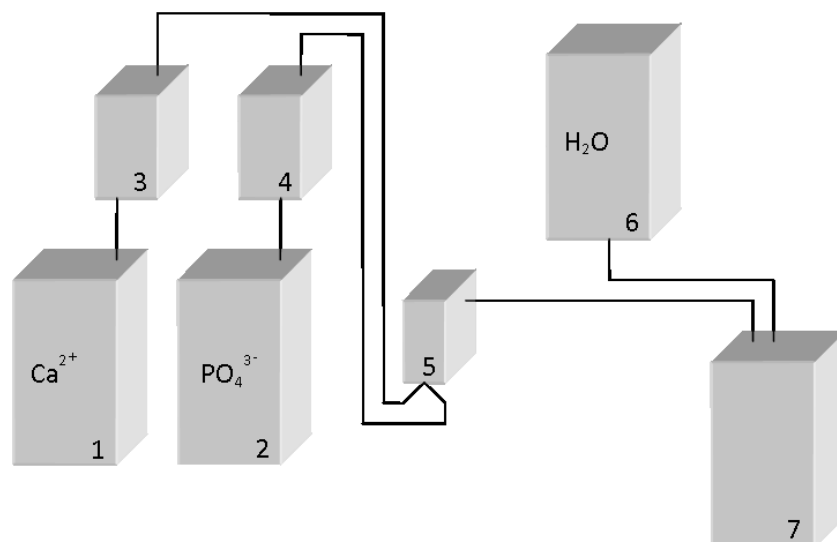


Abbildung 5.1: Schematischer Versuchsaufbau zur Herstellung von nanokristallinem Hydroxylapatit: (1, 2) Rührgefäße mit Calciumsalz- und Phosphatsalz-Lösung, (3, 4) Dosierpumpe mit zwei Taumelkolbenpumpenköpfen, (5) Durchflussmischzelle, (6) Vorlagegefäß mit deionisiertem Wasser, (7) Filtrerröhreinheit.

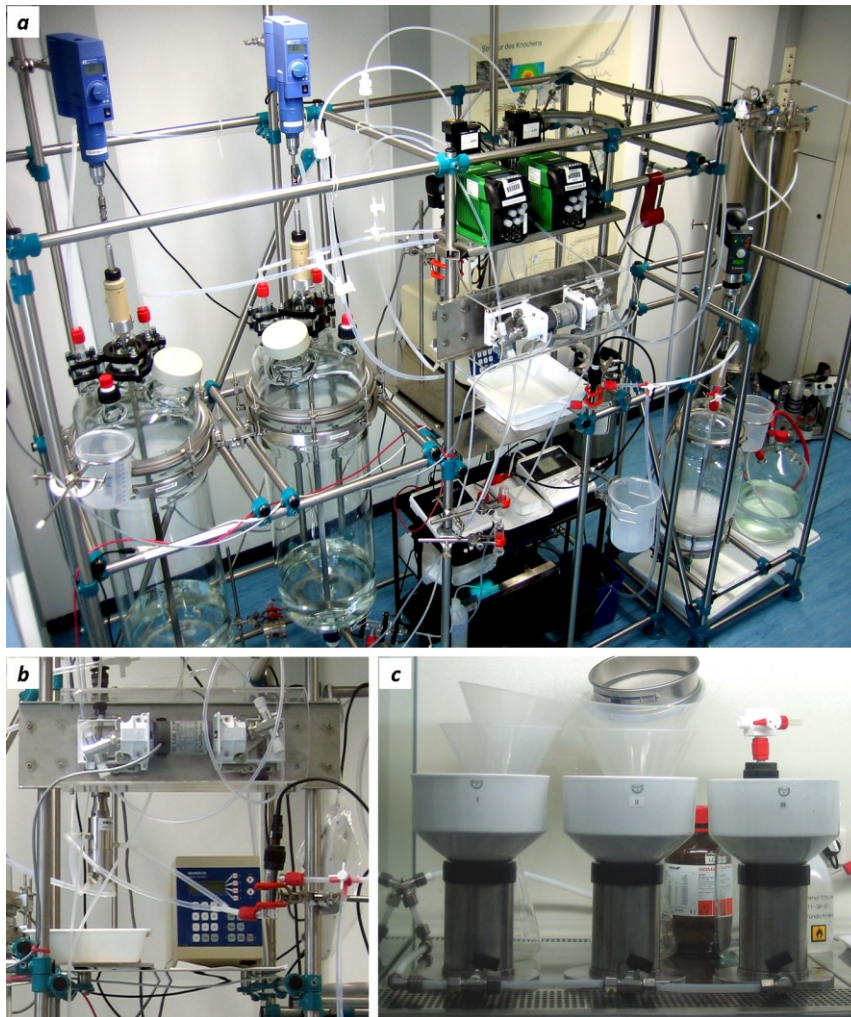


Abbildung 5.2: (a) Das Bild zeigt den Aufbau der Anlage zur Herstellung von nanokristallinem HA unter Reinraumbedingungen. (b) Der Bildausschnitt zeigt die Dosierpumpe mit zwei Taumelkolbenpumpenköpfen oben, die Durchflussmischzelle links, Desintegrator mittig und die Durchflusszelle für die Leitfähigkeitsmessung rechts im Bild. (c) Das Bild zeigt die dreiteilige Filtrationseinheit in einer Laminar-Flowbox.

Sämtliche verwendeten Chemikalien erfüllten die Anforderungen für Reagenzien des europäischen Arzneibuchs (reag. Ph. Eur., Sigma-Aldrich Chemie GmbH) und wurden ohne weitere Behandlung eingesetzt. Zunächst erfolgte die Herstellung der Ausgangslösungen. Generell wurden je 12 Liter Salzlösung in graduierten Vorlagegefäßen angesetzt. Die Vorlagegefäße wurden anfangs mit je ca. 10 Liter deionisiertem Wasser befüllt. In das erste Vorlagegefäß wurden 23.1g Natriumhydrogenphosphat (0.163 Mol) je einem Liter deionisiertem Wasser in Lösung gebracht. In das zweite Vorlagegefäß wurden 40.0g Calciumchlorid-Dihydrat (0.272 Mol) je einem Liter deionisiertem Wasser in Lösung gebracht. Nach vollständigem Auflösen wurde ein bestimmtes Volumen 25%iger Ammoniumhydroxid-Lösung dem ersten Vorlagegefäß zugegeben, um den zu erzielenden pH-Wert der Fällungslösung vor Beginn der Fällungsreaktion einzustellen. Nachdem beide Salzlösungen näherungsweise Raumtemperatur hatten, wurden die Salzlösungen auf je 12 Liter Gesamtvolumen mit deionisiertem Wasser aufgefüllt. Von den Ausgangslösungen wurden pH-Wert, Leitfähigkeit und Temperatur mit kalibrierten Messgeräten (SI Analytics GmbH, Mainz,

Deutschland) bestimmt. Der pH-Wert wurde mit dem pH-Meter Lab 870 durch die pH-Temperatur-Einstabmesskette BlueLine 14 pH ID, die Leitfähigkeit mit dem Konduktometer Lab 970 durch die Leitfähigkeitsmesszelle LF 413 T-ID bestimmt. Beide Elektroden verfügten über einen Temperatursensor. Über die mitgelieferte Software MultiLab pilot wurde der Verlauf von pH-Wert, Leitfähigkeit und Temperatur am Monitor mitverfolgt und abgespeichert. Durch den Einsatz der Dosierpumpe Q2V mit zwei Taumelkolbenpumpenköpfen und dem Controller V300 (Fluid Metering, Inc.) wurden die Ausgangslösungen mit gleicher Pumprate in eine Durchflussmischzelle aus Edelstahl befördert, in der die Fällungsreaktion stattfand.

Um die Kristallgröße und die Morphologie zu steuern und zu regulieren, ist eine Überwachung und Kontrolle der Fällungsfaktoren unerlässlich. In Abbildung 5.3 zeigt ein Flusschema der nasschemischen Fällungsprozedur, das die Herstellung von nanokristallinem HA und die experimentellen Bedingungen beschreibt.

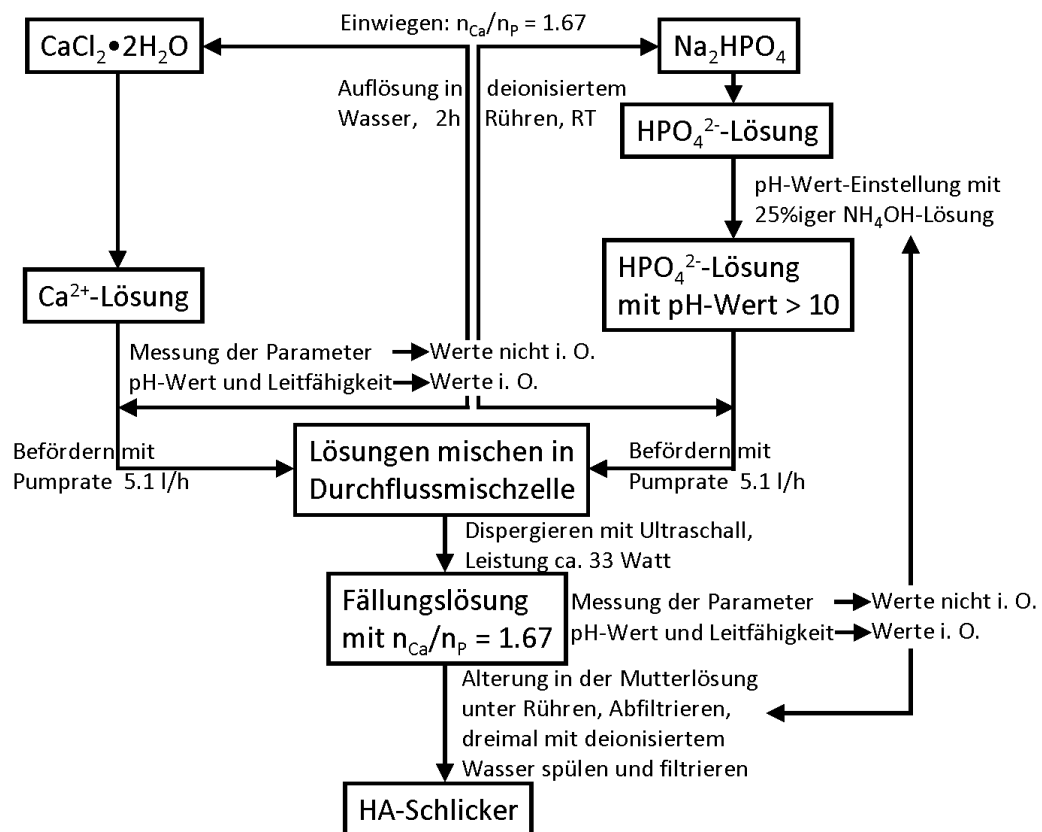
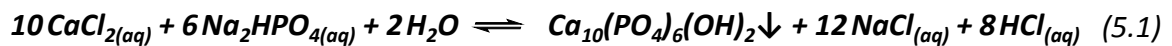


Abbildung 5.3: Flusschema der nasschemischen Fällungsprozedur zur Herstellung von nanokristallinem HA als Schlicker ($n_{\text{Ca}}/n_{\text{P}}$: Stoffmengenverhältnis von Calcium zu Phosphor).

Durch Differenzdruckmessung sowie durch Ablesen der Höhendifferenz zwischen den Füllständen in beiden Vorlagegefäßen konnte stets überprüft werden, ob die Dosierpumpe mit gleicher Pumprate förderte und reproduzierbar arbeitete. Die Differenzdruckmessung erfolgte über den Differenzdruckaufnehmer Modell KZ/AP115-2c-35mb (ALTHEN GmbH, Kelkheim, Deutschland). Die Vermischung der Salzlösungen fand unter Eintrag von Ultraschall im Inneren der Durchflussmischzelle mit einer einkoppelbaren Leistung von 0W bis ca. 220W statt. Ultraschallwellen wurden durch den Ultraschall-Desintegrator Branson Sonifier® Modell S-450D (Branson Ultrasonics Corporation), der aus einem Hochfrequenzgenerator, dem Schallwandler,

der am Schallwandler angeschraubten Sonotrode und der an der Sonotrode angeschraubten Titanspitze bestand, erzeugt. Die Ultraschallenergie ermöglicht das Dispergieren, Homogenisieren und wird zur Beschleunigung chemischer Reaktionen verwendet. Nach beendeter Fällung wurde die Fällungslösung in eine Filtrereinheit überführt und nach einer bestimmten Standzeit mit Unterdruck zunächst einmal filtriert. Anschließend wurde mit deionisiertem Wasser gespült und danach erneut filtriert, um restliche Natrium-, Ammonium- und Chlorid-Ionen zu entfernen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zur Filtration wurden abriebfeste hydrophile Membranfilter aus Polyethersulfon (Pall Corporation) mit einer Porenweite von $0.45\ \mu\text{m}$ eingesetzt. Letztlich wurde durch Filtration Schlicker mit einem Feststoffgehalt von ca. 12 Gew.-% bis ca. 18 Gew.-% erhalten, was in etwa einer Ausbeute von etwa 10 g bis 11 g Trockenmaterial pro Liter Fällungslösung entspricht.

Die nasschemische Reaktion (Rktgl. 5.1), bei der durch Zusammengeben von Calciumchlorid-Lösung und Natriumhydrogenphosphat-Lösung Hydroxylapatit ausfällt, lässt sich durch das nachfolgende Fällungsgleichgewicht formulieren.



Die im Verlauf der Fällung freigesetzten Protonen können die Löslichkeit von HA erhöhen und damit die Bildung anderer Calciumphosphat-Phasen begünstigen, weshalb basische Stoffe, wie z. B. Ammoniakwasser oder Natriumhydroxid (NaOH) für die Fällung von HA eingesetzt werden. Ammoniak wirkt basisch, weil er mit Wasser in einer Gleichgewichtsreaktion (Rktgl. 5.2) unter Bildung von Ammonium- und Hydroxid-Ionen reagiert.



Der Fällungs-pH-Wert ist von der Menge an zugegebenem Ammoniakwasser (NH_4OH -Lösung) und den Konzentrationen von Calciumchlorid und Natriumhydrogenphosphat abhängig. Verwendet wurde, wie eingangs genannt, eine Konzentration von 23.1 g/l für die Natriumhydrogenphosphat-Lösung (0.163 mol/l) und 40.0 g/l für die Calciumchlorid-Dihydrat (0.272 mol/l). Die NH_4OH -Lösung hat einen Massenanteil von ca. 25 % NH_3 . Es wurde experimentell eine lineare Korrelation zwischen dem Fällungs-pH-Wert und dem zugegebenen Volumen an NH_4OH -Lösung im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 9.0 festgestellt. Die NH_4OH -Volumenkonzentration ($\sigma(\text{NH}_4\text{OH})$) lässt sich mit (Gl. 5.3) berechnen.

$$\sigma(\text{NH}_4\text{OH}) = (\text{pH} + 2.85) \cdot 10^{-3} \text{ l/l} \quad (5.3)$$

Um z. B. einen Fällungs-pH-Wert von 7.4 einzustellen, werden 10.25 ml 25 %ige NH_4OH -Lösung pro Liter Na_2HPO_4 -Lösung benötigt. Der stöchiometrische Koeffizient (v) für NH_4OH lässt sich mit (Gl. 5.4) berechnen.

$$v_{\text{NH}_4\text{OH}} = (2 + a) \cdot b \quad (5.4)$$

Die Parameter a und b werden mit den Gleichungen (Gl. 5.5) und (Gl. 5.6) berechnet.

$$a = \left[\sigma(\text{NH}_4\text{OH}) \cdot \frac{\beta(\text{NH}_4\text{OH})}{\beta(\text{Na}_2\text{HPO}_4)} \cdot \frac{M(\text{Na}_2\text{HPO}_4)}{M(\text{NH}_3)} \cdot \omega(\text{NH}_3) \cdot \alpha \right] - 2 \quad (5.5)$$

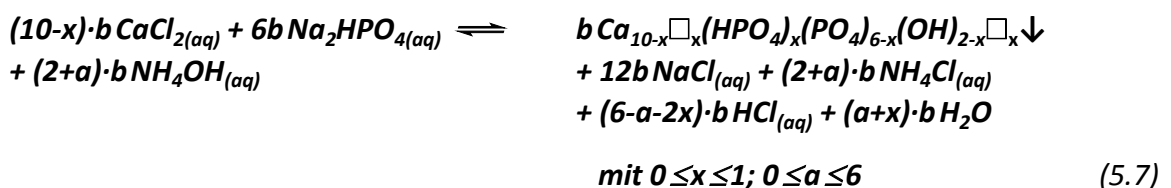
$$\begin{aligned} \text{mit } \beta(\text{NH}_4\text{OH}) &= 910 \text{ g/l} \\ \beta(\text{Na}_2\text{HPO}_4) &= 23.1 \text{ g/l} \\ M(\text{NH}_3) &= 17.03 \text{ g/mol} \\ M(\text{Na}_2\text{HPO}_4) &= 141.96 \text{ g/mol} \\ \omega(\text{NH}_3) &= 25 \% \\ \alpha &= \frac{\nu_{\text{Na}_2\text{HPO}_4}}{\nu_{\text{HA}}} = 6 \end{aligned}$$

$$b = \frac{\text{kgV}(10^n, 10^n \cdot (2 + a))}{10^n \cdot (2 + a)} \quad (5.6)$$

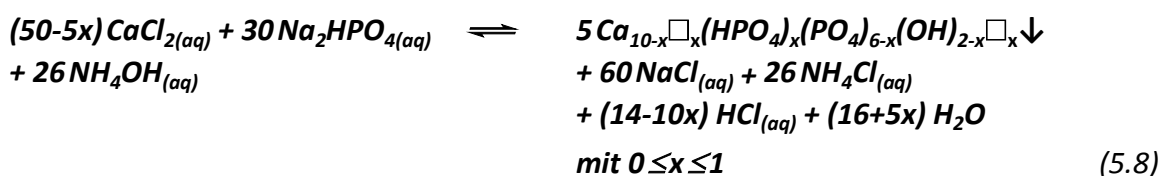
$$\text{mit } a = \sum_{i=-n}^0 z_i \cdot 10^i \quad (n \in \mathbb{N}, z_i \in \{0, \dots, 9\})$$

$$\text{kgV}(10^n, 10^n \cdot (2 + a)) = \text{kleinstes gemeinsame Vielfache} \\ \text{der Faktoren } 10^n \text{ und } 10^n \cdot (2 + a)$$

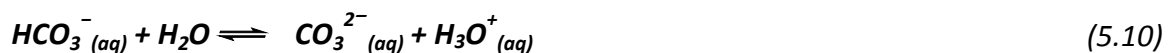
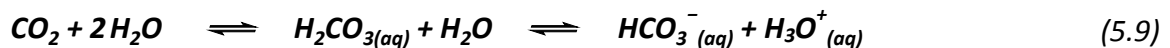
Der Parameter n in (Gl. 5.6) steht für die Anzahl der Nachkommastellen des Zahlenwertes von Parameter a . Im pH-Bereich von 6.5 bis 9.5 liegt ein großer Teil der PO_4^{3-} -Ionen als HPO_4^{2-} -Ionen vor. Als Fällungsprodukt bildet sich dann ein nichtstöchiometrischer, calciumdefizienter HA (CDHA, $\text{Ca}_{10-x}\square_x(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}\square_x$ mit $0 \leq x \leq 1$ und $1.5 \leq \text{mol. Ca/P-Verhältnis} \leq 1.67$, \square bedeutet Leerstelle oder Vakanz). Unter Berücksichtigung der Nichtstöchiometrie des Fällungsprodukts wird durch Kombination der Reaktionsgleichungen (Rktgl. 5.1 und 5.2) sowie durch Einführung der Parameter a und b die nasschemische Reaktion erhalten, bei der sich durch Zusammengeben von 0.272 molarer Calciumchlorid-Lösung, 0.163 molarer Natriumhydrogenphosphat-Lösung und der Zugabe von Ammoniakwasser im pH-Wert-Bereich von 6.5 bis 9.5 CDHA bildet. Diese lässt sich allgemein durch das nachfolgende Fällungsgleichgewicht (Rktgl. 5.7) formulieren.



Im leicht basischen Milieu, also z. B. einem Fällungs-pH-Wert von 7.8 erhält man für a mit (Gl. 5.5) etwa den Wert 3.2, für b mit (Gl. 5.6) den Wert 5 und mit (Gl. 5.4) ergibt sich für den stöchiometrischen Koeffizienten (ν) von NH_4OH der Wert 26. Das nachfolgende Fällungsgleichgewicht (Rktgl. 5.8) lautet dann entsprechend.

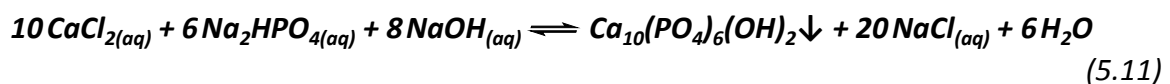


Bei den bisher betrachteten Fällungsreaktionen wurde angenommen, dass diese in einer CO₂-freien Atmosphäre durchgeführt worden sind. Die Löslichkeit von Kohlenstoffdioxid aus der Luft in Wasser ist vergleichsweise niedrig. Bei Raumtemperatur unter Normaldruck liegt die Sättigung bei 0.51 mg/l ($\sim 1.2 \cdot 10^{-5}$ mol/l), während bei Sauerstoff bereits 9 mg/l und bei Stickstoff 14 mg/l erreicht werden. Da aber in Wasser gelöstes Kohlenstoffdioxid chemisch mit Wasser unter Bildung von Kohlensäure (H₂CO₃) reagiert, wird mehr Kohlenstoffdioxid gelöst. Die Kohlensäure als solche bzw. das gelöste Kohlenstoffdioxid liegt in einem Gleichgewicht mit ihren Dissoziationsprodukten Hydrogencarbonat (*Bicarbonat*, HCO₃⁻) und Carbonat (CO₃²⁻) vor, die in einem vom pH-Wert-abhängigen Mengenverhältnis zueinander stehen. In Wasser liegt dieses Gleichgewicht überwiegend auf der Seite des Kohlenstoffdioxids und nur im geringen Umfang bilden sich Hydrogencarbonat-Ionen. Fängt man die bei der Dissoziation gebildeten Hydronium-Ionen (H₃O⁺) durch Zugabe einer Lauge mit Hydroxid-Ionen (OH⁻) ab, so verschiebt sich das Mengenverhältnis zu Gunsten von CO₃²⁻.



Wird Hydroxylapatit durch eine Fällungsreaktion an Luft hergestellt, bildet sich üblicherweise ein B-Typ carbonisierter HA, wobei CO₃²⁻-Ionen als Substituenten für PO₄³⁻-Ionen auftreten. Wenn HA mittels einer Temperaturbehandlung hergestellt wird, bildet sich typischerweise der A-Typ, wobei CO₃²⁻-Ionen als Substituenten für OH⁻-Ionen wegen der hohen Beweglichkeit der OH⁻-Ionen auftreten [Som04]. Dies ist jedoch nicht zwingend der Fall, weil eine A-Typ-Substitution auch bei HA beobachtet worden ist, das durch Fällung bei Raumtemperatur hergestellt wurde [Bar98]. Liegen beide Typ-Substitutionen gleichzeitig vor, spricht man von einer AB-Typ-Substitution. Dies führt zur Bildung von carbonisiertem und dadurch nichtstöchiometrischem Hydroxylapatit (CHA, Ca_{10-x}□_{x-1}[(PO₄)_{6-x}(HPO₄,CO₃)_x][(2OH,CO₃)_{1-x/2}]) mit 1 < x < 2, □ bedeutet Leerstelle oder Vakanz). Das molare Ca/P-Verhältnis hängt vom Carbonatgehalt in der Fällungslösung ab und kann theoretisch Werte im Bereich von 1.33 bis 2.0 annehmen.

Zur Beschreibung der Fällungsreaktion von CDHA wurde vereinfachenderweise das Fällungsgleichgewicht (Rktgl. 5.7) für den pH-Wert-Bereich von 6.5 bis 9.5 verwendet, aufgrund der erwähnten sehr geringen Sättigung von Kohlenstoffdioxid aus der Luft bei Raumtemperatur unter Normaldruck. Zur Beschreibung der Fällungsreaktion von HA bei pH-Werten im Bereich oberhalb von 9.5 wurde das Fällungsgleichgewicht (Rktgl. 5.11) verwendet. Anstelle von NH₄OH-Lösung wurde NaOH verwendet.



5.3 Strukturbildung in der Fällungslösung

5.3.1 Bildung von amorphem Calciumphosphat

Bei der unter 5.2.1 durchgeführten Fällungsreaktion (Gleichung 5.7) entstand ein milchig weißer Niederschlag aus Calciumorthophosphat (CaP). Wenn dieser unmittelbar nach beendeter Fällung und einer Filtrationsdauer von (28 ± 4) min mit XRD untersucht wurde, zeigten Beugungsmessungen des CaP-Fällungsprodukts unterschiedliche Strukturen in Abhängigkeit vom pH-Wert der Fällungslösung. Bei gefällttem, 15 min gealtertem CaP im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 9.0 traten röntgenamorphe Strukturen (Abbildung 5.4) auf.

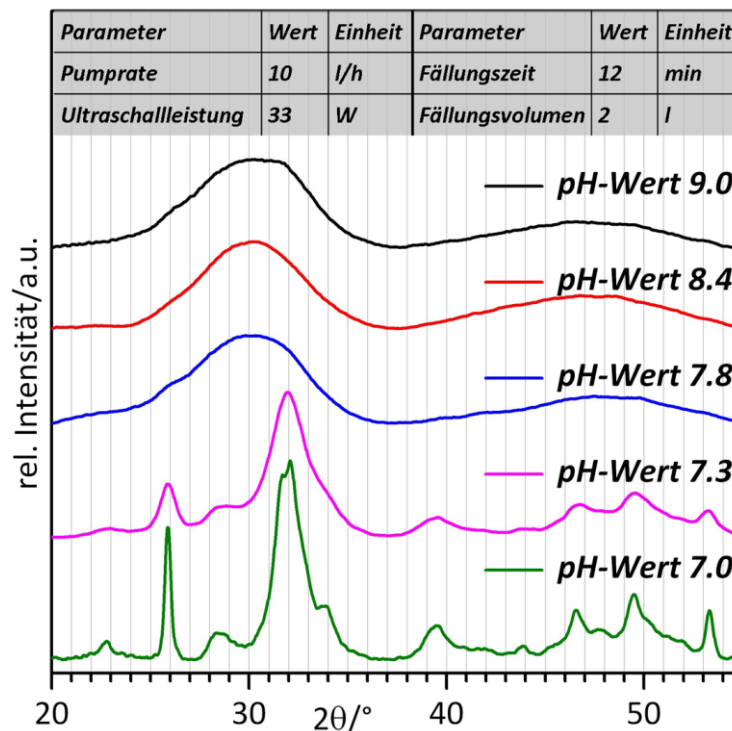


Abbildung 5.4: XRD-Kurven von 15 min nach Fällung gealtertem CaP in Abhängigkeit vom pH-Wert. Alle Messkurven oberhalb von pH-Wert 7.3 gefällttem CaP zeigen das Beugungsbild von amorphem Calciumphosphat (ACP). Das schwache Signal (markiert durch schwarze Pfeile) bei 26° deutet auf die Bildung erster HA-Kristallite hin.

Die Messkurven von 15 min gealtertem, bei pH-Wert 7.0 und 7.3 gefällttem CaP zeigen die Reflexe von HA. Alle Messkurven oberhalb von pH-Wert 7.3 gefällttem CaP zeigen zwei stark verbreiterte Reflexe (Halos) bei $\sim 30^\circ$ und $\sim 48^\circ$, die amorphem Calciumphosphat (ACP) zuzuordnen sind. Der schwache Beugungsreflex bei $\sim 26^\circ$ deutet auf die Bildung erster HA-Kristallite hin. Der (002)-Reflex ist bei HA immer der erste, der bei beginnender Kristallisation erkennbar ist.

TEM-Aufnahmen von bei pH-Wert 7.0 gefälltem, 15 min gealtertem CaP zeigen das Auftreten einer weiteren kristallinen Struktur (Abbildung 5.5). Es wurden Plättchen mit einer Kristalllänge von bis zu $1.2\ \mu\text{m}$, einer Breite von bis zu $150\ \text{nm}$ und einer Dicke von bis zu $20\ \text{nm}$ gefunden. Die Beugungsreflexe der in Frage kommenden kristallinen CaP-Phase OCP wurden erst nach 3 h Alterung in der XRD-Messung gefunden (siehe Abbildung 5.12), was durch eine zu geringe OCP-Konzentration nach 15 min Alterung erklärt werden kann.

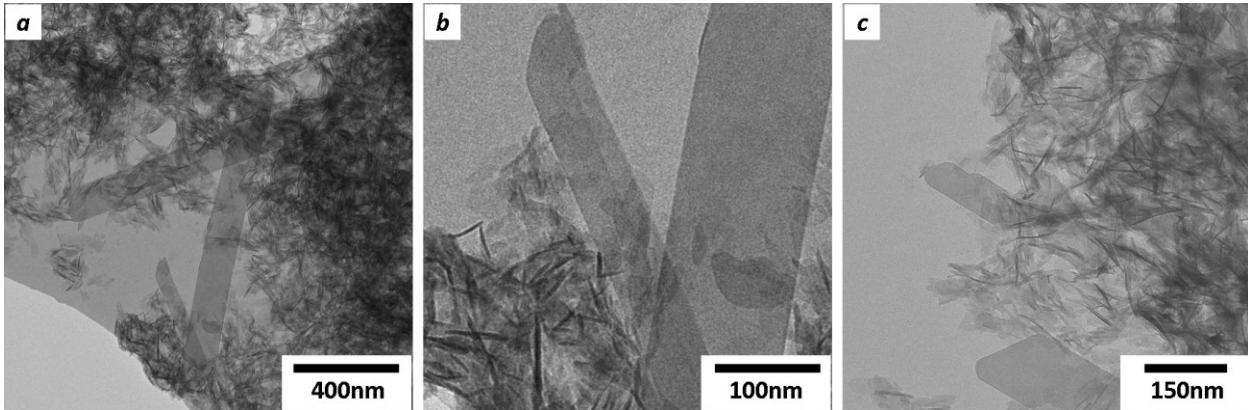


Abbildung 5.5: (a-c) Die TEM-Aufnahmen von bei pH-Wert 7.0 gefälltem, 15 min gealtertem CaP zeigen das Auftreten der weiteren CaP-Phase OCP.

TEM- und STEM-Aufnahmen von gefälltem, 15 min gealtertem CaP zeigen das Auftreten amorpher Strukturen (Abbildung 5.6). Es wurden, bei allen pH-Werten oberhalb von 7.3, miteinander verwachsene, sphärische Strukturen gefunden, die eine lockere Packung bilden.

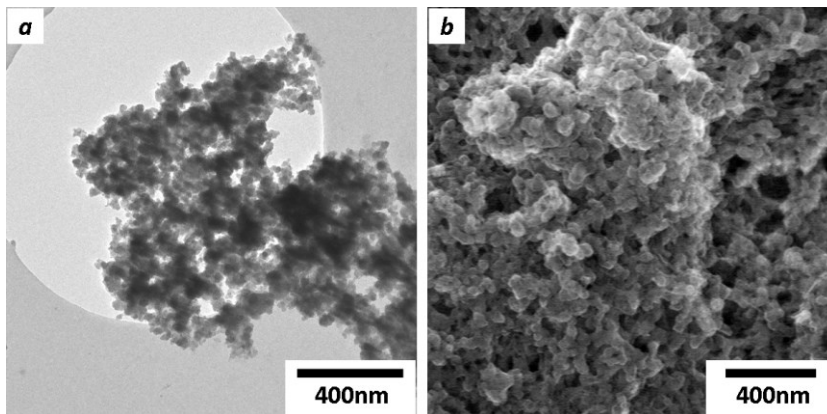


Abbildung 5.6: Die TEM- (a) und die STEM-SE-Aufnahme (b) demonstrieren die typische Morphologie von ACP in der Übersicht.

Die STEM- und TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.7 demonstrieren die typische Morphologie von ACP bei höherer Vergrößerung. Die sphärischen, miteinander verwachsenen Partikel mit einem Durchmesser von $40\ \text{nm}$ bis $60\ \text{nm}$, bestehen aus kleineren, miteinander agglomerierten, sphärischen Partikeln mit einem Durchmesser von $2\ \text{nm}$ bis $20\ \text{nm}$. Innerhalb der Partikel sind helle Bereiche zu erkennen. Es handelt sich hierbei um Poren.

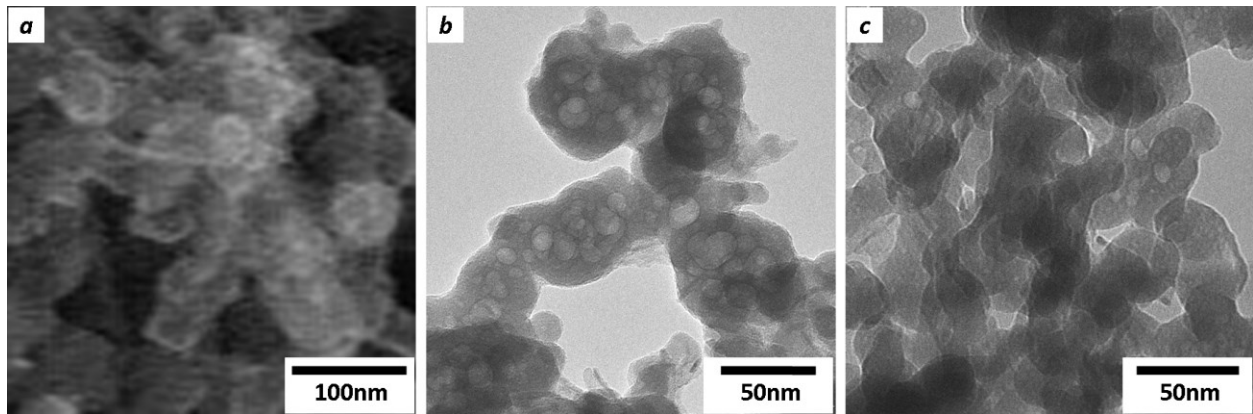


Abbildung 5.7: Die STEM-SE-Aufnahme (a) und die TEM-Aufnahmen (b, c) zeigen die typische Morphologie von ACP mit höherer Auflösung.

Der amorphe Charakter wurde mithilfe von Elektronenbeugung (ED, engl. Electron diffraction) bestätigt. Abbildung 5.8a zeigt das Beugungsbild. Es treten nur diffuse Ringe auf, was auf das Fehlen einer Fernordnung hindeutet. Zum Vergleich zeigt Abbildung 5.8b das Beugungsbild von nanokristallinem HA. Es sind scharf abgegrenzte Beugungsringe sichtbar, die eine fortschreitende Kristallisation und die Entstehung einer Fernordnung kennzeichnen.

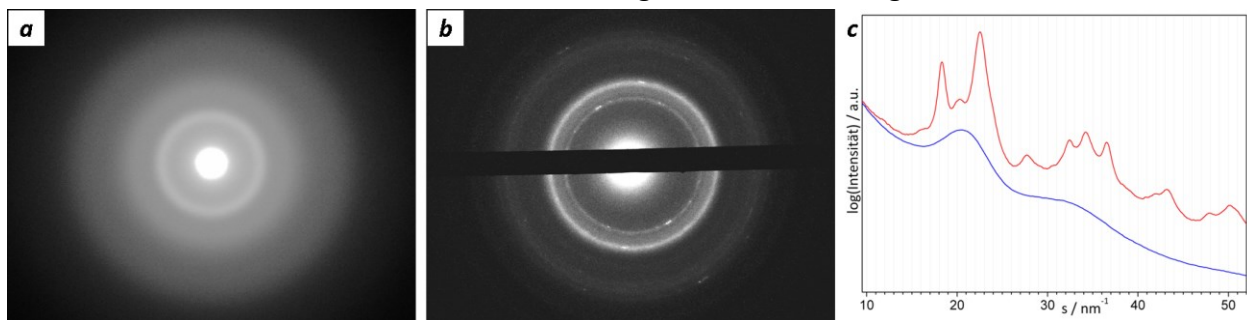


Abbildung 5.8: Die ED-Aufnahme zeigt ein Beugungsbild von ACP (a) und zum Vergleich ein Beugungsbild von nanokristallinem HA (b). Das Diagramm (c) stellt die radiale Intensitätsverteilung von ACP (blaue Kurve) im Vergleich zu nanokristallinem HA (rote Kurve) dar.

In Abbildung 5.8c ist der Verlauf der radialen Intensitätsverteilung von ACP im Vergleich zu nanokristallinem HA anhand der ED-Aufnahmen aus Abbildung 5.8a und 5.8b dargestellt. Beide Proben unterscheiden sich deutlich erkennbar in der Strukturierung des Kurvenverlaufs, was auf Unterschiede in der Anordnung der Atome in beiden Proben zurückzuführen ist. Der Reflex in der roten Kurve bei einem Streuvektor von 18.31 nm^{-1} resultiert aus dem Gitterabstand ($d_{(002)} = 3.44 \text{ \AA}$) der (002)-Netzebenen der HA-Kristallite.

Es kann festgehalten werden, dass von gefällttem, 15 min gealtertem CaP oberhalb von pH-Wert 7.3 bis 9.0 das Auftreten amorpher Strukturen gefunden wurde. Bei pH-Wert 7.0 war 15 min nach der Fällung kein Auftreten von ACP festzustellen. Durch TEM-Aufnahmen wurde neben HA die kristalline CaP-Phase OCP gefunden (Abbildung 5.5). Die Hauptbeugungsreflexe der in Frage kommenden kristallinen CaP-Phase OCP wurden jedoch nicht bei dieser Alterung sondern erst nach 3 h in der XRD-Messung gefunden. Die hier vorgestellten Ergebnisse der Strukturuntersuchungen sollen helfen, ein einfaches Modell für die Umwandlung von ACP zu nanokristallinem HA zu beschreiben.

5.3.2 Umwandlung zu nanokristallinem Hydroxylapatit

Es wurden amorphe CaP-Proben, die bei den pH-Werten oberhalb von 7.3 nach der unter 5.2.1 beschriebenen Fällungsreaktion (Rktgl. 5.7) hergestellt wurden, mit TEM und HRTEM (High Resolution TEM) näher untersucht.

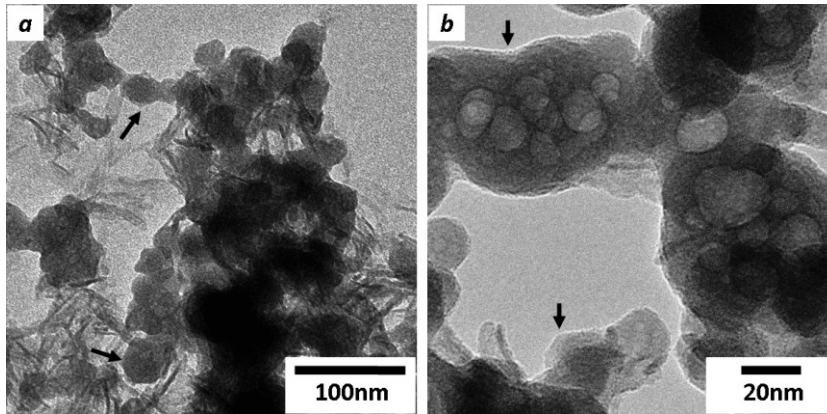


Abbildung 5.9 (a, b) Die TEM-Aufnahmen zeigen den Beginn der Kristallisation von HA an der Oberfläche der sphärischen, miteinander verwachsenen ACP-Partikel (markiert durch schwarze Pfeile).

Der Beginn der einsetzenden Umwandlung von ACP zu HA ist in den TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.9 zu erkennen. Bei einigen der sphärischen, miteinander verwachsenen ACP-Nanopartikel treten an ihren gekrümmten Oberflächen ebene Flächen auf, die in der Projektion im Bild als gerade Kanten zu sehen sind (markiert durch schwarze Pfeile) und stumpfwinklig aufeinandertreffen. Bei höherer Vergrößerung zeigen sich in den TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.10 vereinzelt auftretende, kristalline Bereiche im Nanometerbereich an der Oberfläche der sphärischen ACP-Nanopartikel (rot umrandet). Diese kristalline Struktur entsteht durch Umlagerungsvorgänge innerhalb der amorphen Struktur.

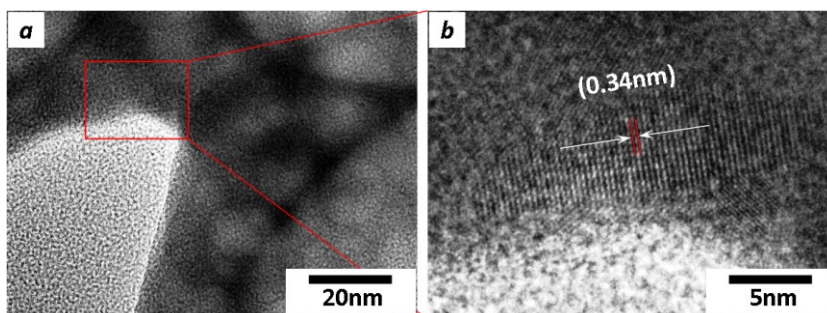


Abbildung 5.10 (a) Die HRTEM-Aufnahme zeigt den Beginn der Kristallisation von HA an den Oberflächen der sphärischen, miteinander verwachsenen ACP-Partikel im rot umrandeten Bildbereich. (b) Die Ausschnittsvergrößerung (rot umrandet) aus Abbildung 5.10a zeigt die kristalline Struktur von HA.

In Abbildung 5.10b ist in der Bildmitte ein etwa 5 nm x 20 nm großer Bereich zu erkennen, der ein regelmäßig angeordnetes Kristallgitter zeigt. Der gemessene interplanare Abstand von 0.34 nm ist auf den Gitterabstand benachbarter (002)-Netzebenen im HA-Kristallit zurückzuführen.

Während der ACP-Umwandlung findet man ACP und thermodynamisch stabileren, nanokristallinen HA. In Abbildung 5.11a zeigt die TEM-Aufnahme das Auftreten von HA-Plättchen innerhalb der sphärischen ACP-Nanopartikel. Die STEM-Aufnahme in Abbildung 5.11b veranschaulicht die Existenz von sphärischen ACP-Nanopartikeln, die sich zu nanokristallinem HA umwandeln. In diesem Bild unten links sowie oben rechts ist ACP erkennbar und in der Bildmitte treten erste HA-Plättchen (schwarze Pfeile) auf.

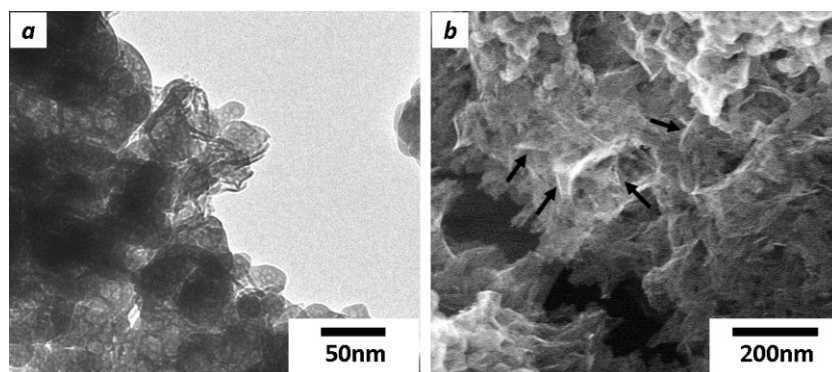


Abbildung 5.11 (a) Die TEM-Aufnahme zeigt das Auftreten erster HA-Plättchen innerhalb der ACP-Nanopartikel. (b) Die STEM-SE-Aufnahme zeigt ACP-Nanopartikel und Bereiche, in denen diese sich bereits zu HA-Nanokristallen umgewandelt haben (schwarze Pfeile).

Die Umwandlungsdauer von ACP zu nanokristallinem HA verlängerte sich oberhalb von pH-Wert 7.3. Die Beugungskurven der röntgenamorphen Proben (Abbildung 5.4) zeigten bei $\sim 26^\circ$ 2θ ein schwaches Signal, das auf die Bildung erster HA-Kristallite hindeutet.

Folglich wurde zunächst mit Pulverdiffraktometrie die Alterung von CaP in der Fällungslösung in Abhängigkeit vom Fällungs-pH-Wert untersucht, um die ungefähre Zeitspanne für die Umwandlung von ACP zu nanokristallinem HA zu ermitteln.

5.4 Materialcharakterisierung

5.4.1 Einfluss der Syntheseparameter auf einige Materialeigenschaften

5.4.1.1 Alterung in der Fällungslösung

Als Alterung wurde die Zeitdauer definiert, die der Summe aus der halben Fällungszeit und der Standzeit des gefällten CaPs in der Fällungslösung nach beendeter Fällung entsprach. Die Untersuchung der Alterung von CaP in der Fällungslösung erfolgte für die pH-Werte 7.0, 7.8 bzw. 9.0.

Dazu wurden je 12 Liter Natriumhydrogenphosphat-Lösung (0.163 mol/l) und Calciumchlorid-Lösung (0.272 mol/l) für die Fällungen angesetzt. Vor Beginn der Fällungsreaktion wurden auf jeweils ca. 10 Liter der Natriumhydrogenphosphat-Lösung für die pH-Wert-Einstellung entsprechend 118.2 ml, 127.8 ml bzw. 142.2 ml 25%ige Ammoniumhydroxid-Lösung gegeben und mit deionisiertem Wasser auf 12 Liter aufgefüllt. Die Konzentration von Ammoniak betrug dann 0.132 mol/l, 0.142 mol/l bzw. 0.158 mol/l. Bei einer konstanten Gesamtpumprate von ca. 10.2 l/h wurde in 12 min jeweils 2 Liter Fällungslösung hergestellt und in einem 2l-Erlenmeyerkolben für die Alterung aufbewahrt. Die Durchmischung erfolgte durch Ultraschall mit einer konstanten Leistung von ca. 33 W. Nach 4 bis 7 unterschiedlichen Standzeiten wurden je 200 ml der Fällungslösung in einem Büchnertrichter überführt und mit Unterdruck zunächst einmal filtriert und anschließend mit je 200 ml deionisiertem Wasser gespült. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Der Filtrationsvorgang war in ca. 24 min bis 32 min abgeschlossen. Zur weiteren Untersuchung war es notwendig mögliche strukturelle Veränderungen der CaP-Partikel mit fortschreitender Alterung zu verlangsamen. Ein Teil des CaP-Schlickers wurde daher mit reinem Ethanol im Überschuss aufbewahrt bzw. bei -20°C eingefroren. Für XRD-Messungen wurden die Schlickerproben zum einen bei ca. 80°C an Luft getrocknet und im Folgenden als WT-Proben bezeichnet, zum anderen bei 20°C und 0.03 mbar mehr als einen Tag lang gefriergetrocknet und im Folgenden als GT-Proben bezeichnet. Die XRD-Messungen der WT-Proben erfolgten in Transmission und die der GT-Proben in Reflexion.

Die Ergebnisse der Alterungsreihen wurden nach aufsteigendem pH-Wert sortiert. Bei pH-Wert 7.0 wurden zu verschiedenen Standzeiten XRD-Messungen durchgeführt. Bereits nach 2 min Standzeit zeigen sich in der Röntgenbeugungskurve die Reflexe von HA (Abbildung 5.12). Dabei deutet die, gegenüber der Integralbreite der Reflexe von gesintertem HA, vergrößerte Integralbreite der Reflexe in allen Messkurven auf die Bildung von nanokristallinem HA hin. Diese Tatsache liegt in der Größe der HA-Kristallite begründet, da aufgrund der nano-dimensionalen Kristalle jeweils nicht ausreichend viele Netzebenen zur Beugung unter einem bestimmten Winkel beitragen.

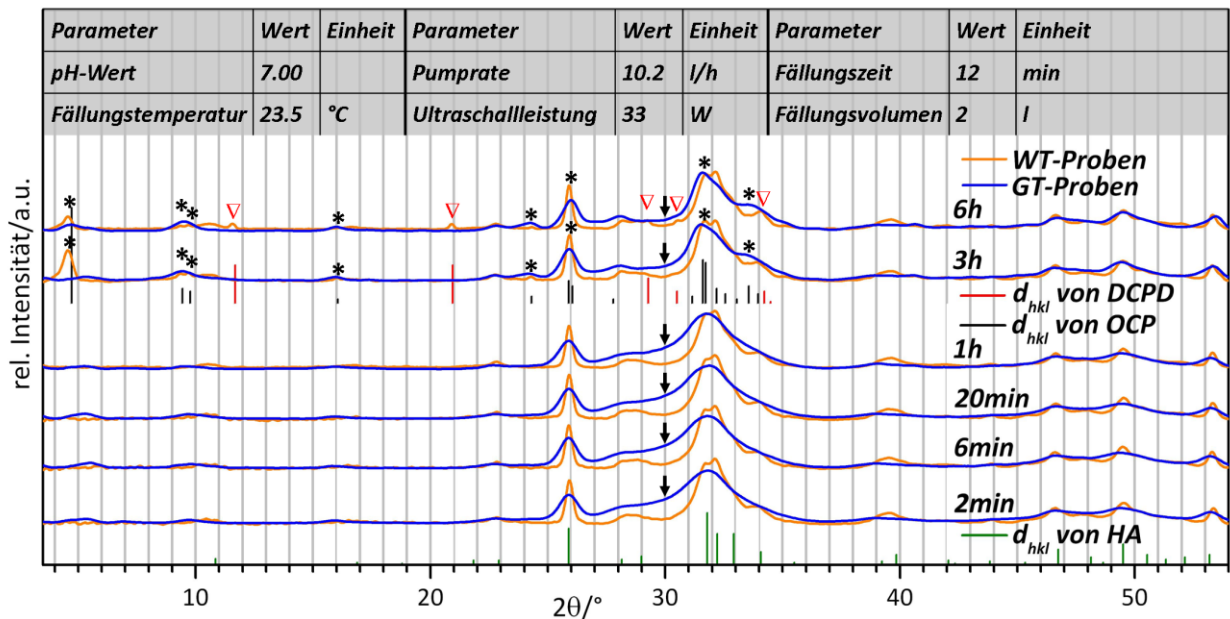


Abbildung 5.12: XRD-Kurven von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.0 mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 2 min bis 6 h. Die schwarzen Pfeile markieren die Abnahme der Signalstärke des Halos bei $\sim 30^\circ$ (ACP) mit zunehmender Standzeit. Sterne bzw. Dreiecke symbolisieren die Hauptreflexe von OCP bzw. DCPD. Die d_{hkl} von HA OCP und DCPD wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432; 26-1056 und 9-77 entnommen. WT-Proben: Transmissionsmessungen bei 80°C getrockneter CaP-Proben, GT-Proben: Reflexionsmessungen gefriergetrockneter CaP-Proben.

Ab 3 h Alterung zeigen sich in der Röntgenbeugungskurve neben den Reflexen von HA die mit Sternen markierten Hauptreflexe von Octacalciumphosphat (OCP). Nach 6 h Alterung reihen sich neben den Reflexen von HA und OCP die mit roten Dreiecken markierten Hauptreflexe von Brushit (DCPD), allerdings nur bei der WT-Probe, dazu.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sofort nach beendeter CaP-Fällung eine Umwandlung von ACP zu nanokristallinem HA einsetzt und ca. 60 min bis max. 3 h andauert. Die Untersuchung der WT- und GT-Proben zeigt, dass die Trocknungsart einen Einfluss auf den Verlauf der ACP-HA-Umwandlung hat. Bei einer 80°C an Luft getrockneten CaP-Probe wird die ACP-Umwandlung gegenüber einer gefriergetrockneten deutlich verkürzt. Oberhalb der Raumtemperatur reagieren die Fällungsprodukte schneller zum thermodynamisch stabilen HA. Daher erfolgt die Gefriertrocknung der CaP-Proben immer dann, wenn es gilt den Alterungsprozess des gefällten CaPs in der Fällungslösung zu untersuchen. Ansonsten wurde die weniger aufwendige Trocknung bei 80°C durchgeführt. Mit zunehmender Alterung entwickelt sich ein mehrphasiges Fällungsprodukt. Dabei treten erst OCP, später DCPD in der WT-Probe als weitere kristalline CaP-Phasen auf.

Die Abbildung 5.13 zeigt die zu verschiedenen Standzeiten durchgeführten XRD-Messungen für pH-Wert 7.8. Nach 2 min und 6 min Standzeit ist in der Röntgenbeugungskurve von 20° bis 40° ein Halo zu erkennen, der auf die Bildung eines röntgenamorphen Materials hindeutet. Der Verlauf beider Beugungskurven entspricht dem von amorphem Calciumphosphat (ACP). Nach 20 min Standzeit zeigt sich in der Röntgenbeugungskurve der WT-Probe die beginnende Kristallisation von HA, während bei der GT-Probe nach wie vor der Verlauf der XRD-Kurve dem vom ACP entspricht. Erkennbar ist die beginnende Kristallisation von HA in der WT-Probe daran, dass bei $\sim 26^\circ$ ein schwaches Signal (markiert durch orangen Pfeil) auftritt.

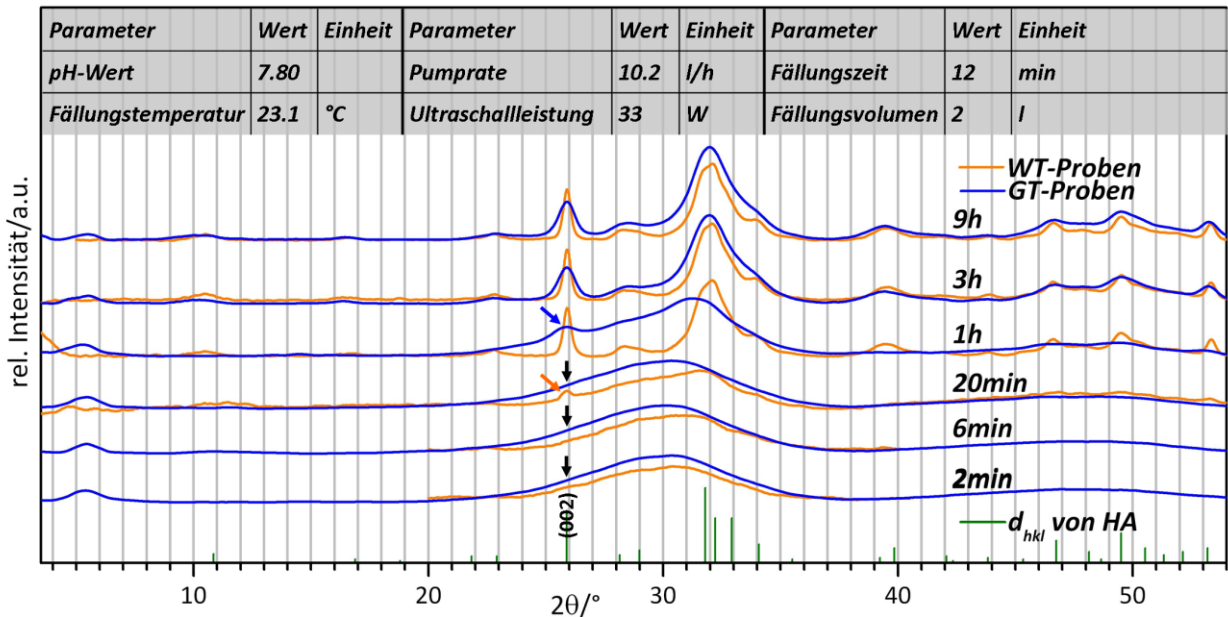


Abbildung 5.13: XRD-Kurven von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.8 mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 2 min bis 9 h. Die d_{hkl} von HA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen.

Der Verlauf der Beugungskurve entspricht dem einer Mischung aus ACP mit zunehmendem Anteil an kristalliner Phase, was aufgrund des strukturierten Verlaufs der XRD-Kurve im Bereich von 25° bis 35° erkennbar ist. Ab 60 min Standzeit zeigt sich dann auch in der Röntgenbeugungskurve der GT-Probe die beginnende Kristallisation von HA. Erkennbar ist die die beginnende Kristallisation von HA in der GT-Probe daran, dass sich bei $\sim 26^\circ$ ein schwaches Signal (markiert durch blauen Pfeil) zeigt. Ab 3 h Standzeit sind in den Messkurven beider Proben nur Reflexe zu beobachten, die HA zuzuordnen sind.

Es kann festgehalten werden, dass innerhalb von 60 min nach beendeter CaP-Fällung eine Umwandlung von ACP zu nanokristallinem HA einsetzt und insgesamt ca. 60 min bis max. 3 h andauert. Die Existenz weiterer kristalliner CaP-Phasen wird mit zunehmender Alterung nicht festgestellt.

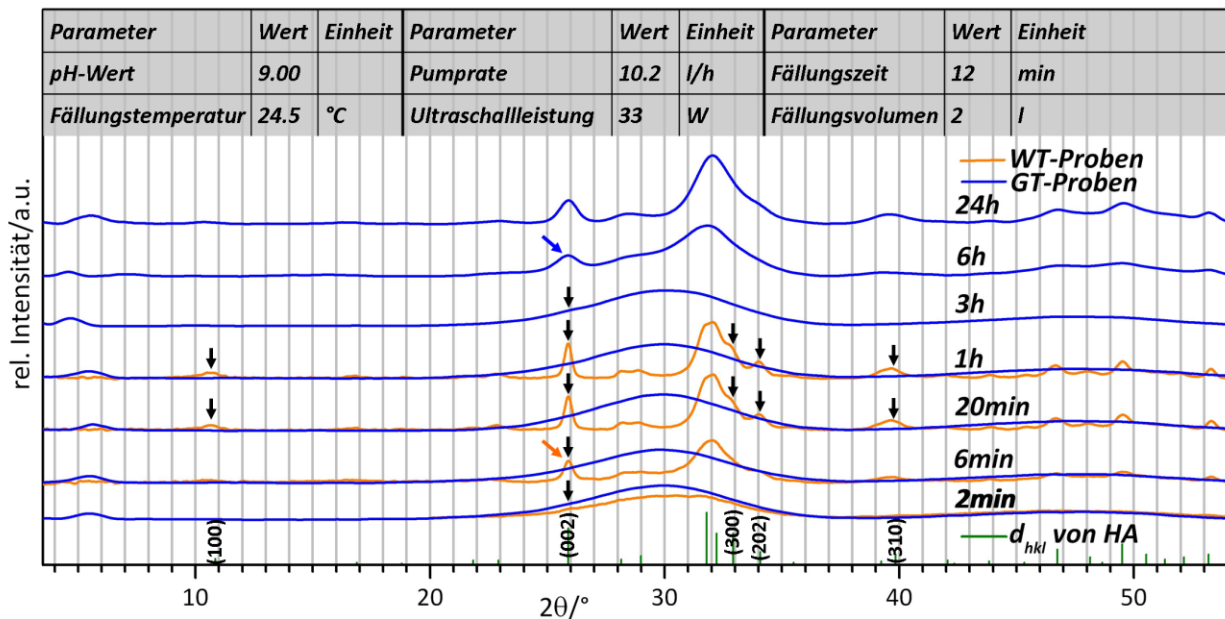


Abbildung 5.14: XRD-Kurven von CaP bei Fällungs-pH-Wert 9.0 mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 2min bis 1h bzw. 24h. Die d_{hkl} von HA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen.

Für pH-Wert 9.0 wurden zu verschiedenen Standzeiten XRD-Messungen durchgeführt, die in Abbildung 5.14 dargestellt sind. Der Verlauf der Beugungskurve entspricht nach 2 min Standzeit hauptsächlich dem von ACP mit der einsetzenden Bildung von HA, da sich bei $\sim 26^\circ$ ein schwaches Signal (markiert durch schwarzen Pfeil) zeigt, das auf die Entstehung erster HA-Kristallite zurückzuführen ist. Nach 6 min Standzeit entspricht der Verlauf der Beugungskurve der WT-Probe einer Mischung aus nanokristallinem HA mit einem geringen Anteil an ACP, was aufgrund des strukturierten Verlaufs der XRD-Kurve im Bereich von 25° bis 35° erkennbar ist. Der orange Pfeil markiert den deutlich erkennbaren (002)-Reflex in der XRD-Kurve der WT-Probe, der deutlich das Einsetzen der Bildung von HA anzeigt. Im Gegensatz dazu ähnelt der Verlauf der Beugungskurve der GT-Probe erst nach 6 h Standzeit dem Verlauf der Beugungskurve der WT-Probe nach 6 min Standzeit. ACP reagiert also sehr empfindlich auf einen Anstieg der Trocknungstemperatur. Dabei deutet die, gegenüber der Integralbreite der Reflexe von gesintertem HA, vergrößerte Integralbreite der Reflexe in der Messkurve auf die Bildung von nanokristallinem HA hin. Die Transformation von ACP zu HA ist demnach zu dieser Standzeit noch nicht vollständig abgeschlossen. Ab einer Standzeit von 20 min ist in den Messkurven der WT-Proben nur das Auftreten der Reflexe von nanokristallinem HA festzustellen. Analog ist erst nach mehr als 6 h Standzeit in den Messkurven der GT-Proben ein ähnliches Ergebnis festzustellen. Der blaue Pfeil markiert den deutlich erkennbaren (002)-Reflex in der XRD-Kurve der GT-Probe, der das Einsetzen der Bildung von HA anzeigt. An der beginnenden Intensitätszunahme bzw. Abnahme der Integralbreite des (100)-, (002)-, (300)-, (202)- und (310)-Reflexes (markiert durch schwarze Pfeile) ist eine beginnende Reifung der Kristallite bzw. Zunahme der Kristallitgröße der WT-Proben erkennbar. Daraus kann eine Zunahme der Länge, Breite und Dicke der HA-Kristallite gefolgert werden.

Summa summarum kann festgestellt werden, dass die ACP-Umwandlung zu HA bei pH-Wert 9.0 im Vergleich zu der bei pH-Wert 7.8 deutlich später einsetzt. Erst innerhalb von 6 h nach beendeter CaP-Fällung tritt der Beginn einer Umwandlung von ACP zu nanokristallinem HA auf, die ca. 6 h bis max. 24 h andauert. Die Existenz weiterer kristalliner CaP-Phasen wird mit zunehmender Alterung nicht festgestellt.

Für die untersuchten Proben nimmt die Dauer der Umwandlung von ACP zu HA mit steigendem pH-Wert zu. Durch eine Trocknung bei 80°C wird ACP in einer kürzeren Zeit zu HA umgewandelt, als es bei der entsprechenden gefriergetrockneten Probe der Fall ist. Bei pH-Wert 7.0 wird eine Umwandlungsdauer von ACP zu HA innerhalb von 1 h bis 3 h beobachtet. Es tritt bereits 2 min nach beendeter Fällung nanokristalliner HA auf. Ab etwa 3 h Alterung und länger macht sich in den Beugungskurven neben HA, das Auftreten der kristallinen CaP-Phasen OCP und DCPD (nur bei der WT-Probe) bemerkbar. Demnach liegt bei pH-Wert 7.0 nanokristallines HA innerhalb von 3 h Alterung ohne weitere kristalline CaP-Phasen vor. Diese Aussage kann aber bei genauerer Untersuchung mithilfe von TEM-Aufnahmen nicht länger bestätigt werden, da bereits 15 min nach beendeter Fällung OCP-Kristallite in TEM-Aufnahmen gefunden wurden (Abbildung 5.5), was durch XRD-Messungen erst bei einer Alterung von 3 h auftritt. Demzufolge ist bei pH-Wert 7.0 von Beginn an mit der Bildung eines mehrphasigen Fällungsproduktes unter den gegebenen Fällungsbedingungen auszugehen. Bei pH-Wert 7.8 ist die ACP-HA-Umwandlung innerhalb von 60 min bis 3 h und bei pH-Wert 9.0 innerhalb von 6 h bis 24 h Alterung abgeschlossen. Mit fortschreitender Alterung zeigt sich, dass bei den beiden letztgenannten pH-Werten, neben nanokristallinem HA, keine weiteren CaP-Phasen auftreten, was auch durch TEM-Aufnahmen überprüft wurde (Abbildungen 5.17(d-f), 5.18(a-c)).

5.4.1.2 pH-Wert

Durch Untersuchungen der Alterung von CaP in der Fällungslösung wurde im Kapitel 5.4.1.1 gezeigt, nach welchen Alterungszeiten im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 9.0 nanokristalliner HA auftrat. Nach abgeschlossener Umwandlung von amorphem Calciumphosphat zu nanokristallinem HA wurden mithilfe von Röntgenbeugung (XRD) und Elektronenmikroskopie (EM) die kristalline Struktur, Morphologie und Kristallitgröße der HA-Nanokristalle bei sechs verschiedenen Fällungs-pH-Werten im Bereich von 7.0 bis 12.6 untersucht. Zusätzlich wurde durch energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX) das molare Ca/P-Verhältnis in den HA-Proben bestimmt.

Die Durchführung der Versuche (pH-Wert-Einstellung, Pumprate, Ultraschalleistung, Filtration) fand wie im Kapitel 5.4.1.1 beschrieben statt. Zur Einstellung der Fällungs-pH-Werte 7.3 und 7.4 wurden entsprechend 121.3 ml bzw. 123.1 ml einer 25%igen Ammoniumhydroxid-Lösung benötigt. Die Konzentration von Ammoniak betrug dann 0.135 mol/l bzw. 0.137 mol/l. Für die pH-Wert-Einstellung der Fällungslösung bei pH-Wert 12.6 wurde Natriumhydroxid (NaOH) mit einer Konzentration von 0.376 mol/l verwendet.

In Abbildung 5.15 sind die Röntgenbeugungskurven von HA, der im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 12.6 gefällt wurde, nach abgeschlossener Transformation von ACP dargestellt. Die oberste Beugungskurve (rote Kurve) ist eine XRD-Messung von humanem Knochen. Es werden für alle pH-Werte nur die Beugungsreflexe von HA gefunden.

Bei den XRD-Messungen der Knochenprobe und den HA-Proben für pH-Wert 7.3 und 12.6 handelt es sich um Kapillarmessungen. In diesen Beugungskurven tritt daher ein Halo (Quarzglas) mit einem Maximum bei 22° auf.

Die Integralbreite der Reflexe in den Beugungskurven der HA-Proben ist im Vergleich zur Integralbreite der Reflexe von gesintertem HA (siehe Abbildung 2.12a) deutlich größer. Diese Tatsache liegt in der Größe der HA-Kristallite begründet, da aufgrund der nanodimensionierten Kristalle jeweils nicht genügend Netzebenen zur Beugung unter einem bestimmten Winkel beitragen. Bei pH-Werten oberhalb von 7.8 ist in den Messkurven eine beginnende Intensitätszunahme bzw. Abnahme der Integralbreite des (300)- und (202)-Reflexes (markiert durch schwarze Pfeile) festzustellen. Dieses Resultat deutet auf eine beginnende Reifung der Kristallite bzw. Zunahme der Kristallitgröße hin.

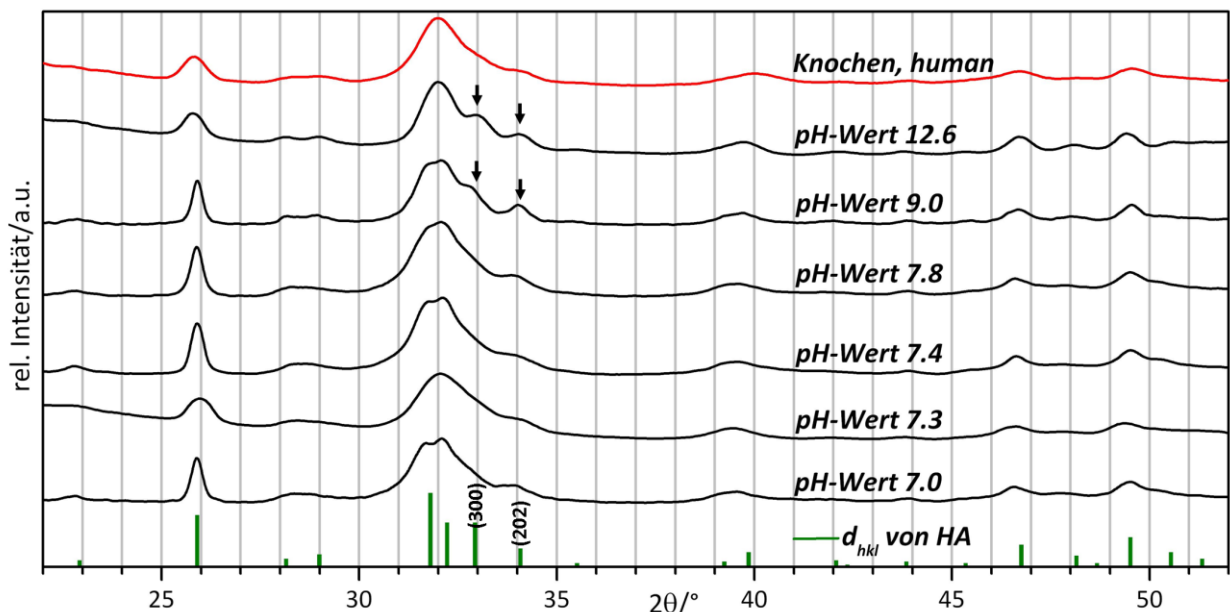


Abbildung 5.15: XRD-Kurven von HA bei verschiedenen Fällungs-pH-Werten von 7.0 bis 12.6 und die Röntgenbeugungskurve von humanem Knochen. Bei den XRD-Messungen der HA-Proben für pH-Wert 7.3, 12.6 und der Knochenprobe handelt es sich um Kapillarmessungen. Die schwarzen Pfeile deuten auf die Abnahme der Integralbreite der markierten Reflexe hin. Die d_{hkl} von HA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen.

Die Röntgenbeugungskurven von HA, der im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 7.8 gefällt wurde, zeigen ähnliche Reflexe und Reflexintensitätsverhältnisse, wie die der Beugungskurve von humanem Knochen. Demzufolge ist die kristalline Struktur und Größe der HA-Kristallite, die in diesem pH-Wert-Bereich gefällt wurden, der der Bioapatitkristallite im Knochen sehr ähnlich.

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.16 von pH-Wert 7.0(a-c) bzw. 7.3(d-f) gefälltem CaP zeigen, dass sich nach 8 min bzw. 15 min Alterung plättchenförmige HA-Kristallite bilden. Bei beiden pH-Werten haben die HA-Kristallite eine Plättchendicke zwischen 3 nm und 4 nm. Plättchenlänge bzw. -breite liegen zwischen 60 nm und 70 nm bzw. zwischen 15 nm und 25 nm. Die HA-Plättchen bilden Agglomerate, deren Größe im Mikrometer-Bereich liegt. Die dunklen, plättchenförmigen Objekte sind dünne HA-Kristallite, die in der Bildebene liegen. Die sehr dunklen, fast schwarzen nadelförmigen Objekte sind HA-Plättchen, die sich in Längsseitenlage senkrecht zur Bildebene befinden. In dieser Orientierung ist die geringe Dicke der HA-Plättchen erkennbar, die der Dicke von Bioapatitkristalliten im humanen Knochen sehr ähnlich ist.

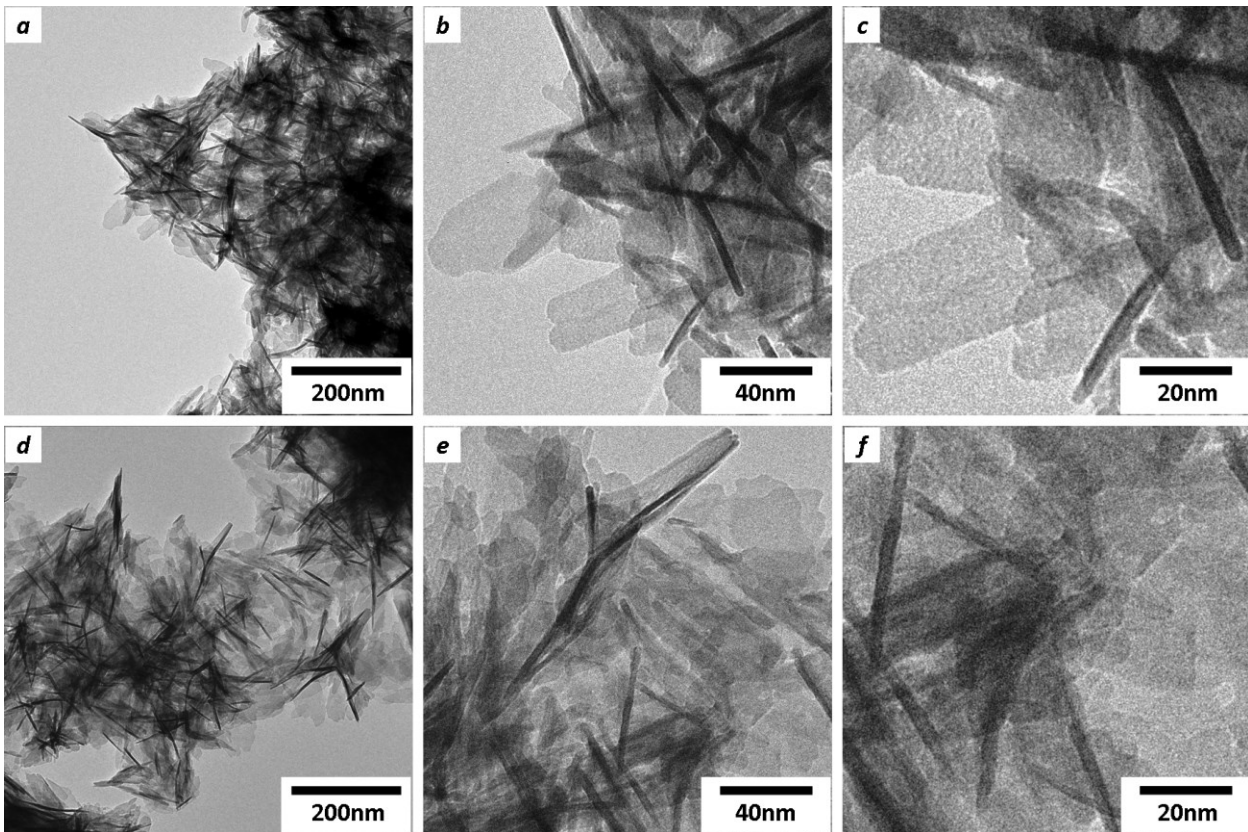


Abbildung 5.16: TEM-Aufnahmen von HA beim Fällungs-pH-Wert 7.0 und 8 min Alterung (a-c) und von HA beim Fällungs-pH-Wert 7.3 und 15 min Alterung (d-f).

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.17 von pH-Wert 7.4(a-c) bzw. 7.8(d-f) gefälltem CaP zeigen, dass sich nach ca. 15 min bzw. 3 h Alterung plättchenförmige HA-Kristallite bilden. Bei beiden pH-Werten haben die HA-Kristallite eine Plättchendicke zwischen 3 nm und 4 nm. Plättchenlänge bzw. -breite liegen zwischen 50 nm und 70 nm bzw. zwischen 15 nm und 20 nm. Auch bei diesen pH-Werten bildeten die HA-Plättchen Agglomerate, deren Größe im Mikrometerbereich liegt.

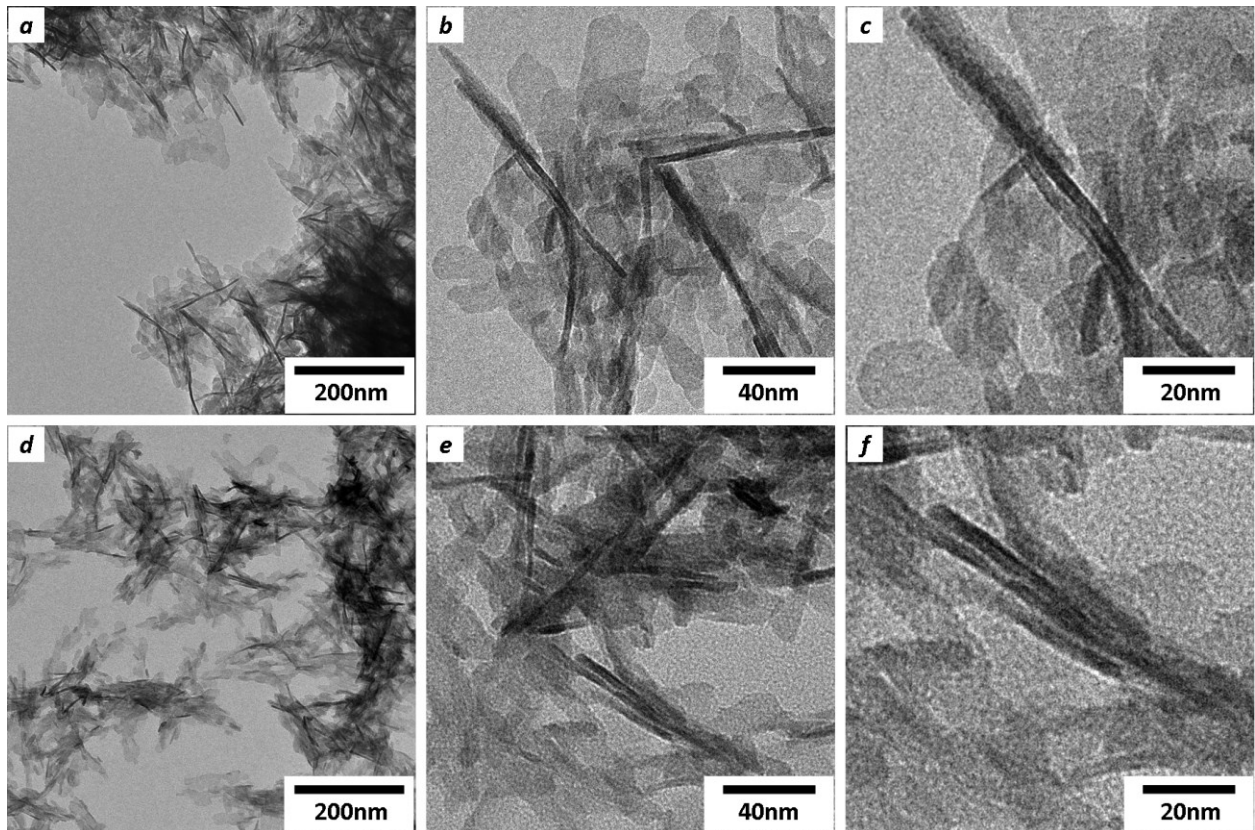


Abbildung 5.17: TEM-Aufnahmen von HA beim Fällungs-pH-Wert 7.4 und 15 min Alterung (a-c) und von HA beim Fällungs-pH-Wert 7.8 und 3 h Alterung (d-f).

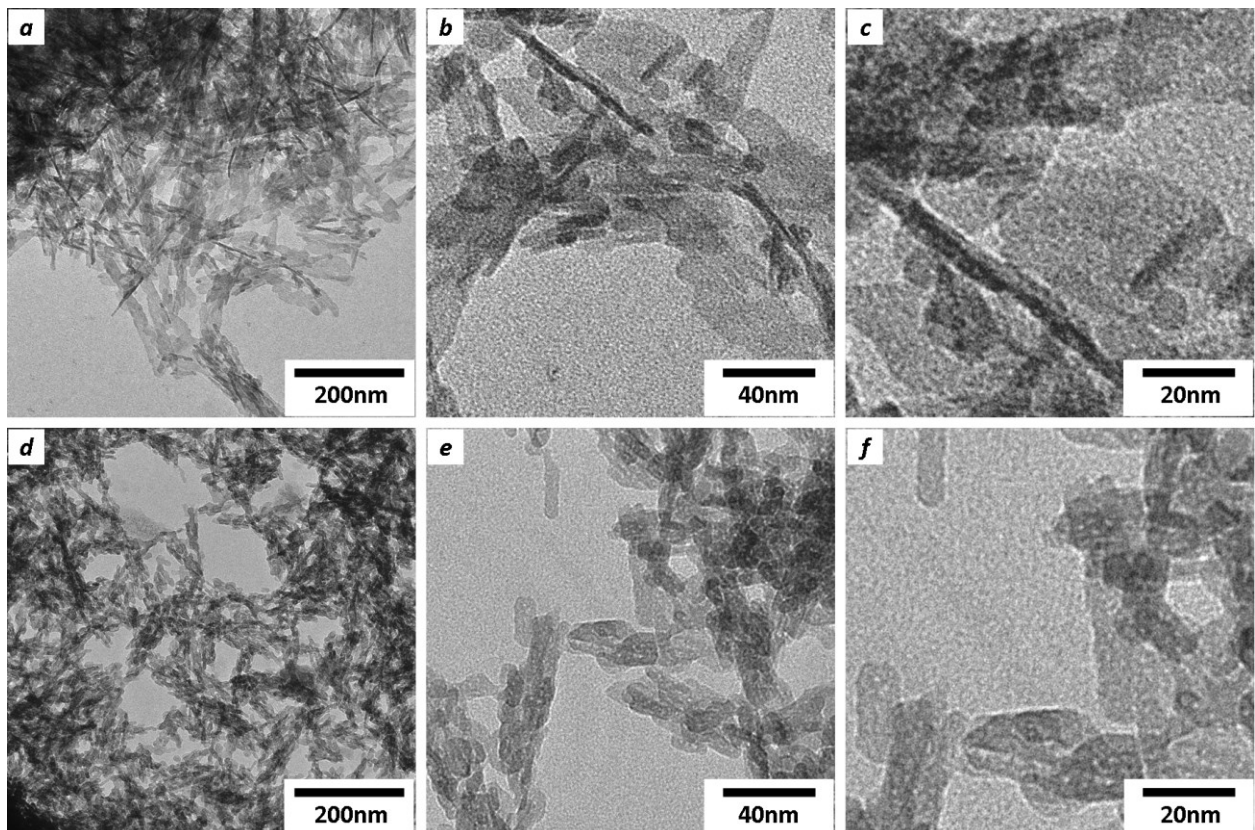


Abbildung 5.18: TEM-Aufnahmen von HA beim Fällungs-pH-Wert 9.0 und 3 h Alterung (a-c) und von HA beim Fällungs-pH-Wert 12.6 und 8 h Alterung (d-f).

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.18 (a-c) von pH-Wert 9.0 gefälltem CaP zeigen, dass sich nach 3 h Alterung plättchenförmige HA-Kristallite bilden. Die HA-Kristallite haben eine Plättchendicke zwischen 4 nm und 6 nm. Plättchenlänge bzw. -breite liegen zwischen 65 nm und 75 nm bzw. zwischen 20 nm und 25 nm. Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.18 (d-f) von pH-Wert 12.6 gefälltem CaP zeigen, dass sich nach 8 h Alterung nicht plättchen- sondern stäbchenförmige HA-Kristallite bilden. Die Kristallite haben eine Breite als auch eine Dicke zwischen 6 nm und 10 nm. Die Länge liegt zwischen 25 nm und 30 nm. Auch bei diesen pH-Werten bilden die HA-Kristallite Agglomerate, deren Größe im Mikrometer-Bereich liegt.

In Tabelle 5.1 sind die aus den TEM-Aufnahmen gewonnenen Ergebnisse zur Größe und Morphologie der HA-Kristallite, das mithilfe von EDX bestimmte molare Ca/P-Verhältnis in den HA-Proben in Abhängigkeit vom pH-Wert der Fällung sowie der Alterung der HA-Kristallite in der Fällungslösung aufgeführt.

Tabelle 5.1: Morphologie und Größe der HA-Kristallite und das molare Ca/P-Verhältnis in den HA-Proben als Funktion von Fällungs-pH-Wert und Alterung der Fällungslösung.

pH-Wert	CaP-Phase	Alterung	mol. Ca/P-Verhältnis	Kristallitgröße			Kristallit-morphologie
				Dicke / nm	Breite / nm	Länge / nm	
7.0	HA	8 min	1.57	3.8 ± 0.3	22.3 ± 6.4	60.2 ± 7.8	plättchenförmig
7.3	HA	15 min	1.69	3.5 ± 0.4	16.0 ± 2.1	68.2 ± 6.6	plättchenförmig
7.4	HA	15 min	1.70	4.1 ± 0.6	17.5 ± 2.3	67.3 ± 5.3	plättchenförmig
7.8	HA	3 h	1.59	3.6 ± 0.3	15.0 ± 1.8	52.5 ± 5.5	plättchenförmig
9.0	HA	3 h	1.86	5.2 ± 0.3	22.8 ± 3.0	68.1 ± 5.8	plättchenförmig
12.6	HA	8 h	2.12	6.7 ± 1.1	9.6 ± 1.0	28.7 ± 2.3	stäbchenförmig

Unter den gegebenen Fällungsbedingungen entstehen im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 9.0 plättchenförmige HA-Nanokristalle. Oberhalb von pH-Wert 7.8 nimmt die Plättchendicke zu. Oberhalb von pH-Wert 9.0 nehmen Plättchenbreite und -länge ab und die Plättchendicke nimmt weiter zu. Bei pH-Wert 12.6 bilden sich stäbchenförmige HA-Nanokristalle. Demzufolge existieren im untersuchten pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 7.8 HA-Nanokristalle mit knochenapatitähnlicher Morphologie. Daher wurde im nachfolgenden Kapitel 5.4.1.3 der Einfluss des weiteren Syntheseparameters Pumprate auf pH-Wert 7.0, 7.4 bzw. 7.8 gefällte HA-Kristallite untersucht.

5.4.1.3 Pumprate

Durch Variation der Pumprate wird die Verweilzeit der Fällungslösung in der Durchflussmischzelle reguliert. Diese Zeit beeinflusst die Kinetik der Umwandlung von ACP zu HA. Um den Umsatz an HA zu steigern, wurde die Pumprate, mit der beide Salzlösungen in die Durchflussmischzelle befördert werden, erhöht.

Der Einfluss der Pumprate auf die kristalline Struktur, Morphologie, Kristallitgröße und elementare Zusammensetzung der HA-Kristallite wurde bei den pH-Werten 7.0, 7.4 bzw. 7.8 bei einer Pumprate von 23.6l/h und einer Ultraschalleistung von ca. 33W mithilfe von Röntgenbeugung (XRD), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) untersucht. Zunächst wurde mit Voruntersuchungen durch XRD-Messungen geklärt, wann die Umwandlung von ACP zu HA für die letztgenannten pH-Werte bei einer Pumprate von 23.6l/h abgeschlossen ist. Es wurde festgestellt, dass die Umwandlung von ACP zu HA bei pH-Wert 7.0 bzw. 7.4 bereits innerhalb von 15min Standzeit in der Fällungslösung vollzogen ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die in Kapitel 5.4.1.1 durch XRD-Kurven (Abbildung 5.12) von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.0 mit zunehmender Alterung der Fällungslösung von 8 min bis 6 h bei einer Pumprate von 10.2l/h gezeigt wurden, war praktisch kaum eine bemerkbare Veränderung der ACP-Umwandlungszeit festzustellen. Daher wurde auf die Darstellung der XRD-Kurven für beide pH-Werte verzichtet. Die Transformation von ACP zu HA bei pH-Wert 7.8 lieferte ein anderes Resultat. In Abbildung 5.19 sind hierzu die Röntgenbeugungsmessungen für diesen pH-Wert dargestellt. Als Vergleich dienen die Ergebnisse, die in Kapitel 5.4.1.1 bereits durch XRD-Kurven (Abbildung 5.13) von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.8 mit zunehmender Alterung der Fällungslösung von 8 min bis 9 h bei einer Pumprate von 10.2l/h gezeigt wurden.

Anschließend wurde anhand von TEM-Aufnahmen die Morphologie und Größe der HA-Kristallite bei den genannten pH-Werten untersucht. Als Vergleich dienen die Ergebnisse, die in Kapitel 5.4.1.2 bereits durch TEM-Aufnahmen (Abbildungen 5.16(a-c) und 5.17) von HA für die drei Fällungs-pH-Werte gezeigt wurden.

Die Durchführung der Versuche (pH-Wert-Einstellung, Ultraschalleistung, Filtration) fand, wie in Kapiteln 5.4.1.1 und 5.4.1.2 beschrieben, statt. Zur Untersuchung durch XRD wurden die Schlickerproben wie üblich bei ca. 80°C an Luft getrocknet (WT-Proben) bzw. bei -20°C eingefrorene Schlickerproben gefriergetrocknet (GT-Proben). Für die Untersuchung der HA-Kristallite mithilfe von EDX wurden üblicherweise die WT-Proben verwendet.

In Abbildung 5.19 zeigt sich in den Röntgenbeugungskurven nach 5 min und 9 min Standzeit der Halo von ACP mit einem Maximum bei ca. 30°. Der Verlauf der XRD-Kurve entspricht nach 23 min Standzeit hauptsächlich dem von ACP mit der einsetzenden Bildung von HA, da sich bei ~26° ein schwaches Signal (markiert durch schwarzen Pfeil) zeigt, das auf die Entstehung der kristallinen Phase mit einer Vorzugsorientierung in (002)-Richtung hindeutet.

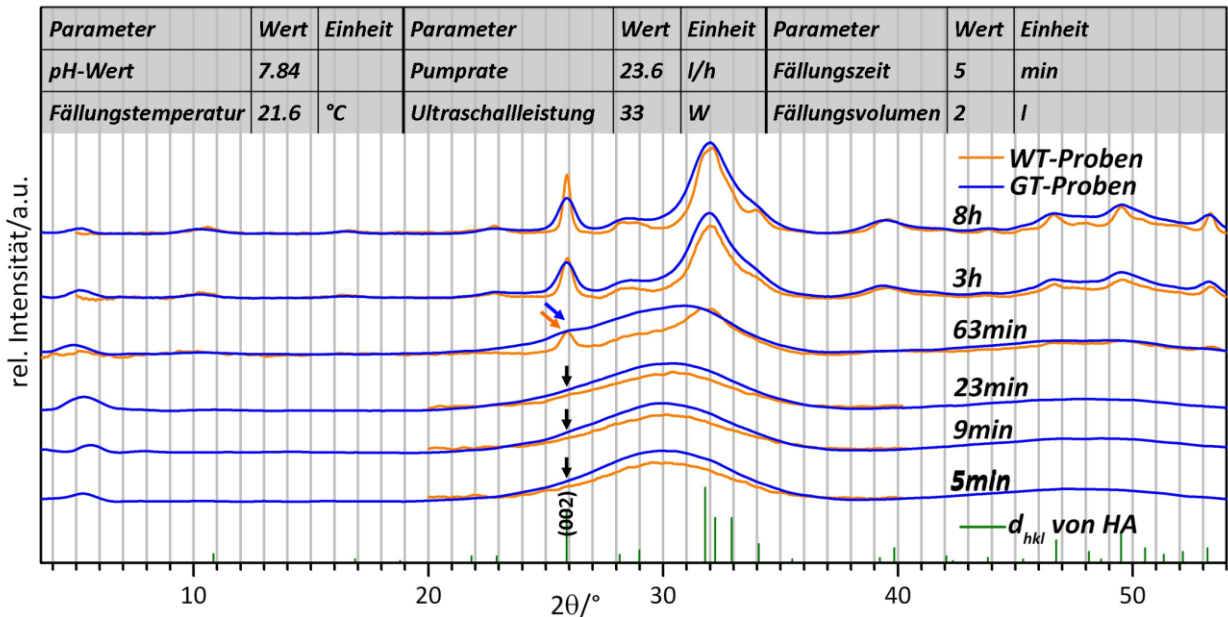


Abbildung 5.19: XRD-Kurven von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.8 mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 5 min bis 8 h bei einer Pumprate von 23.6 l/h. Die d_{hkl} von HA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen.

Nach 63 min Standzeit entspricht der Verlauf der Beugungskurve einer ca. 1:1-Mischung aus nanokristallinem HA und ACP, was aufgrund des strukturierten Verlaufs der XRD-Kurve im 2θ -Bereich von 25° bis 35° erkennbar ist. Der orange Pfeil markiert den (002)-Reflex, der das Einsetzen der Bildung von HA in den WT-Proben kennzeichnet. Analog kennzeichnet der blaue Pfeil den gleichen Hergang in den GT-Proben. Die Transformation von ACP zu HA ist zu dieser Standzeit bei beiden Proben noch nicht vollständig abgeschlossen, wobei diese bei der WT-Probe weiter fortgeschritten ist.

Ab 3 h Standzeit sind Reflexe mit deutlicher Vergrößerung der Integralbreite gegenüber der der Reflexe von gesintertem HA in der Röntgenbeugungskurve zu beobachten, die allein nanokristallinem HA zuzuordnen sind.

Zusammenfassend zeigt sich, dass es innerhalb von 1 h bis 3 h nach beendeter CaP-Fällung zum Abschluss der ACP-HA-Umwandlung kommt. Ab etwa 3 h Standzeit besteht das Fällungsprodukt aus nanokristallinem HA. Eine Erhöhung der Pumprate bewirkt eine leichte Verzögerung der Umwandlung von ACP zu HA, was sich durch die verringerte Verweilzeit der Fällungslösung in der Durchflussmischzelle erklären lässt. Die Existenz weiterer kristalliner CaP-Phasen wird mit zunehmender Alterung nicht festgestellt.

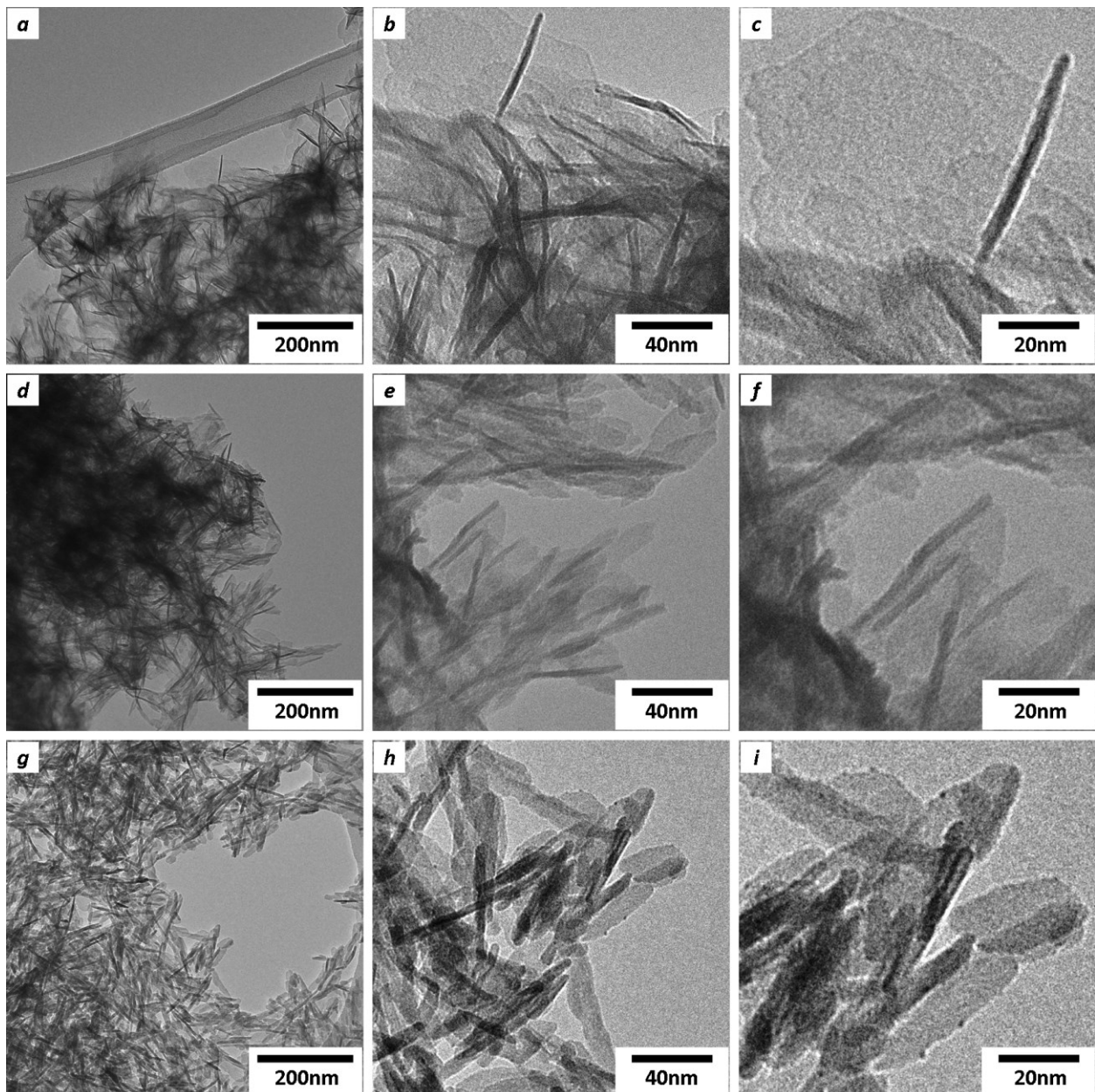


Abbildung 5.20: TEM-Aufnahmen von pH-Wert 7.0 gefälltem HA bei einer Alterung von 15 min (a-c), von pH-Wert 7.4 gefälltem HA bei einer Alterung von 15 min (d-f) und von pH-Wert 7.8 gefälltem HA bei einer Alterung von 3 h (g-i).

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.20 von pH-Wert 7.0(a-c), 7.4(d-f) bzw. 7.8(g-i) gefälltem CaP zeigen, dass sich nach 15 min bzw. 3 h Alterung plättchenförmige HA-Kristallite bilden. Die HA-Kristallite haben eine Plättchendicke zwischen 3 nm und 5 nm. Plättchenlänge bzw. -breite liegen zwischen 50 nm und 65 nm bzw. zwischen 14 nm und 25 nm. Auch bei diesen pH-Werten bilden die HA-Plättchen Agglomerate, deren Größe im Mikrometer-Bereich liegt. Die dunklen, plättchenförmigen Objekte sind dünne HA-Kristallite, die in der Bildebene liegen. Die sehr dunklen, fast schwarzen nadelförmigen Objekte sind HA-Plättchen, die sich in Längsseitenlage senkrecht zur Bildebene befinden.

In Tabelle 5.2 sind die aus den TEM-Aufnahmen gewonnenen Ergebnisse zur Morphologie und Größe der HA-Kristallite, das mithilfe von EDX bestimmte molare Ca/P-Verhältnis in den HA-

Proben in Abhängigkeit von Pumprate, pH-Wert der Fällung sowie einer Alterung von 15 min bzw. 3 h in der Fällungslösung aufgeführt.

Tabelle 5.2: Morphologie und Größe der HA-Kristallite sowie das molare Ca/P-Verhältnis in HA-Proben, die bei den Fällungs-pH-Werten 7.0, 7.4 bzw. 7.8 hergestellt wurden, unter dem Einfluss der Pumprate.

pH-Wert	CaP-Phase	Pumprate in l/h	Alterung	mol. Ca/P- Verhältnis	Kristallitgröße			Kristallit- morphologie
					Dicke / nm	Breite / nm	Länge / nm	
7.0	HA	10.2	8min	1.57	3.8 ± 0.3	22.3 ± 6.4	60.2 ± 7.8	plättchenförmig
7.0	HA	23.6	15min	1.61	4.1 ± 0.5	21.8 ± 4.2	51.6 ± 7.3	plättchenförmig
7.4	HA	10.2	15min	1.70	4.1 ± 0.6	17.5 ± 2.3	67.3 ± 5.3	plättchenförmig
7.4	HA	23.6	15min	1.66	3.6 ± 0.6	15.8 ± 1.3	51.6 ± 5.6	plättchenförmig
7.8	HA	10.2	3h	1.59	3.6 ± 0.3	15.0 ± 1.8	52.5 ± 5.5	plättchenförmig
7.8	HA	23.6	3h	1.68	4.3 ± 0.6	14.4 ± 2.4	63.4 ± 2.8	plättchenförmig

Unter den gegebenen Fällungsbedingungen entstehen im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 7.8 plättchenförmige HA-Nanokristalle. Eine Erhöhung der Pumprate bewirkt eine leichte Verzögerung der Umwandlung von ACP zu HA, was sich durch die verringerte Verweilzeit der Fällungslösung in der Durchflussmischzelle erklären lässt. Die Dicke der HA-Kristallite bleibt für die untersuchten pH-Werte konstant in der Größenordnung von 3.0 nm bis 5.0 nm. Oberhalb von pH-Wert 7.0 nimmt die Plättchenbreite leicht ab und die Länge der Kristallite bleibt für die untersuchten pH-Werte konstant in der Größenordnung von 50 nm bis 70 nm. HA-Nanokristalle, die der Morphologie und Dicke von Knochenapatitkristalliten entsprechen, existieren demzufolge im untersuchten pH-Bereich von 7.0 bis 7.8. Daher wurde im nachfolgenden Kapitel 5.4.1.4 der Einfluss des weiteren Syntheseparameters Ultraschalleistung auf im genannten pH-Wert-Bereich gefällte HA-Kristallite untersucht.

5.4.1.4 Ultraschalleistung

Das Mischen ist ein unumgänglicher, wichtiger Schritt bei der Fällung, denn wie bei den meisten Fällungsprozessen ist die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion sehr hoch. Fortgeschrittene Mischtechnologien und eine genaue Kontrolle der einflussnehmenden Parameter resultieren in kleineren Partikeln und in einer verbesserten Partikelhomogenität. Ultraschall zählt zu den Mischtechnologien, die höhere Scherkräfte und Rührenergie bietet. Die Ultraschallkavitation führt zu einem intensiven Mikromischen und erzeugt lokal hohe Energien. Ultraschall verbessert also das Mischen der Reaktanden und steigert den Masseaustausch an der Partikel- bzw. Kristallitoberfläche. Mit der Annahme das Mikromischen zu intensivieren und die Kristallithomogenität zu verbessern, wurde die Ultraschalleistung erhöht. Weiterhin wurde untersucht, was passiert, wenn das Mischen ohne Ultraschall, also allein durch turbulente Strömungen in der Durchflussmischzelle, stattfindet.

Der Einfluss der Ultraschalleistung auf die kristalline Struktur, Morphologie, Größe und elementare Zusammensetzung der HA-Kristallite wurde bei den pH-Werten 7.0, 7.4 bzw. 7.8,

bei Pumpraten von 10.2l/h bzw. 23.6l/h und einer Variation der Ultraschalleistung von 0W, 80W bzw. ca. 250W mithilfe von Röntgenbeugung (XRD), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX) untersucht. Zunächst wurde anhand von Voruntersuchungen durch XRD-Messungen geklärt, wann die Umwandlung von ACP zu HA für die pH-Werte 7.0 bzw. 7.4 bei einer Ultraschalleistung von ca. 250W abgeschlossen ist. Es wurde festgestellt, dass die Umwandlung bei diesen pH-Werten bereits innerhalb von 15 min Standzeit in der Fällungslösung vollzogen ist. Im Vergleich zu den Ergebnissen, die in Kapitel 5.4.1.1 durch XRD-Kurven (Abbildung 5.12) von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.0 mit zunehmender Alterung der Fällungslösung von 8 min bis 6 h, bei einer Pumprate von 10.2l/h und einer Ultraschalleistung von ca. 33 W gezeigt wurden, ist kaum eine bemerkbare Veränderung der ACP-Umwandlungszeit festzustellen. Daher wird auf die Darstellung der XRD-Messungen für beide pH-Werte verzichtet. Die Transformation von ACP zu HA bei pH-Wert 7.8 lieferte ein anderes Resultat. Anhand von Voruntersuchungen durch XRD-Messungen wurde geklärt, wann die Umwandlung von ACP zu HA bei pH-Wert 7.8, bei einer Pumprate von 10.2l/h und einer Ultraschalleistung von 0W bzw. 80W sowie bei einer Pumprate von 23.6l/h und Ultraschalleistung von 80W auftritt. Als Vergleich dienen die Ergebnisse, die bereits in Kapitel 5.4.1.1 durch XRD-Kurven (Abbildung 5.13) als auch in Kapitel 5.4.1.3 durch XRD-Kurven (Abbildung 5.19) von CaP bei Fällungs-pH-Wert 7.8 mit zunehmender Alterung der Fällungslösung von 8 min bis 9 h, bei Pumpraten von 10.2l/h bzw. 23.6l/h und einer Ultraschalleistung von ca. 33 W gezeigt wurden.

Zunächst wurde anhand von TEM-Aufnahmen die Morphologie und Größe der HA-Kristallite bei pH-Wert 7.0 und 7.4, einer Pumprate von 23.6l/h und ca. 250W Ultraschalleistung untersucht. Anschließend wurde anhand von TEM-Aufnahmen die Morphologie und Größe der HA-Kristallite bei pH-Wert 7.8 mit einer Pumprate von 10.2l/h, bei 0W bzw. 80W Ultraschalleistung sowie mit einer Pumprate von 23.6l/h bei 80W Ultraschalleistung untersucht. Als Vergleich dienen die Ergebnisse, die bereits in Kapitel 5.4.1.2 durch TEM-Aufnahmen (Abbildung 5.17 (d-f)) als auch in Kapitel 5.4.1.3 durch TEM-Aufnahmen (Abbildung 5.20) von HA bei Fällungs-pH-Wert 7.0, 7.4 bzw. 7.8 bei Pumpraten von 10.2l/h bzw. 23.6l/h gezeigt wurden. Die Durchführung der Versuche (pH-Wert-Einstellung, Pumprate, Filtration) fand wie in den Kapiteln 5.4.1.1 bis 5.4.1.3 beschrieben statt. Im Unterschied zu den bisherigen Versuchsdurchführungen wurde die Ultraschalleistung von 33 W auf 0W erniedrigt bzw. auf 80W bis 250W erhöht. Zur Untersuchung durch XRD wurden die Schlickerproben wie üblich bei ca. 80°C an Luft getrocknet (WT-Proben) bzw. bei -20°C eingefrorene Schlickerproben gefriergetrocknet (GT-Proben). Für die Untersuchung der HA-Kristallite mithilfe von EDX wurden üblicherweise die WT-Proben verwendet.

In Abbildung 5.21 entspricht der Verlauf der Röntgenbeugungskurven bei 3 min, 9 min Standzeit, einer Ultraschalleistung von 0W und einer Pumprate von 10.2l/h dem von ACP mit beginnender Umwandlung zu HA. Der orange Pfeil markiert den (002)-Reflex, der das Einsetzen der Bildung von HA kennzeichnet. Nach 1 h Standzeit zeigt die XRD-Kurve der GT-Probe einen ähnlichen Verlauf. Der blaue Pfeil markiert den (002)-Reflex, der den gleichen Vorgang kennzeichnet.

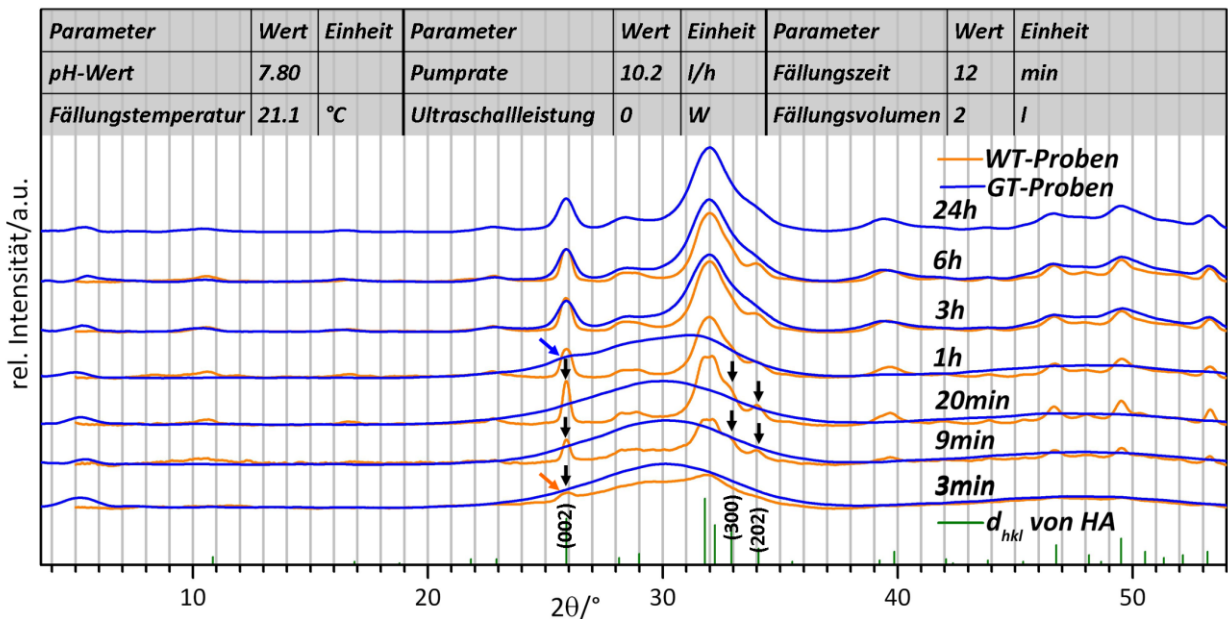


Abbildung 5.21: XRD-Kurven von CaP bei einer Ultraschalleistung von 0 W und einer Pumprate von 10.2 l/h mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 3 min bis 6 h. Die d_{hkl} von HA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen.

Ab 20 min Standzeit zeigen sich in der Röntgenbeugungskurve der WT-Probe allein die Reflexe von HA. Bei den GT-Proben zeigt sich das gleiche Ergebnis erst nach 3 h bis 6 h Standzeit. An der beginnenden Intensitätszunahme bzw. Abnahme der Integralbreite des (002)-, (300)-, und (202)-Reflexes (markiert durch schwarze Pfeile) ist eine anfängliche Reifung der Kristallite bzw. Zunahme der Kristallitgröße der WT-Proben erkennbar. Aus der Zunahme der Intensität und der Abnahme der Integralbreite des (300)- und (202)-Reflexes kann eine Zunahme der Breite und Dicke der HA-Kristallite gefolgert werden. Aus der Zunahme der Intensität und der Abnahme der Integralbreite des (002)-Reflexes kann eine Zunahme der Länge der HA-Kristallite angenommen werden. Eine Ultraschalleistung von 0 W und eine Pumprate von 10.2 l/h sind zur Herstellung von HA für die Alterung der Fällungslösung im Bereich von 1 h bis etwa 3 h geeignet. Kein Eintrag von Ultraschallenergie bewirkt demnach bei pH-Wert 7.8 und einer Pumprate von 10.2 l/h eine leichte Verzögerung der ACP-HA-Umwandlung.

Es kann festgehalten werden, dass es innerhalb von 1 h bis 3 h nach beendeter CaP-Fällung zum Abschluss der ACP-HA-Umwandlung kommt. Ab etwa 3 h Standzeit besteht das Fällungsprodukt aus nanokristallinem HA und einer geringen Menge nanokristallinem OCP. Ein Ausbleiben des Eintrags von Ultraschallenergie bewirkt demnach eine leichte Verzögerung der Umwandlung von ACP zu HA. Die Existenz weiterer kristalliner CaP-Phasen wird mit zunehmender Alterung nicht festgestellt.

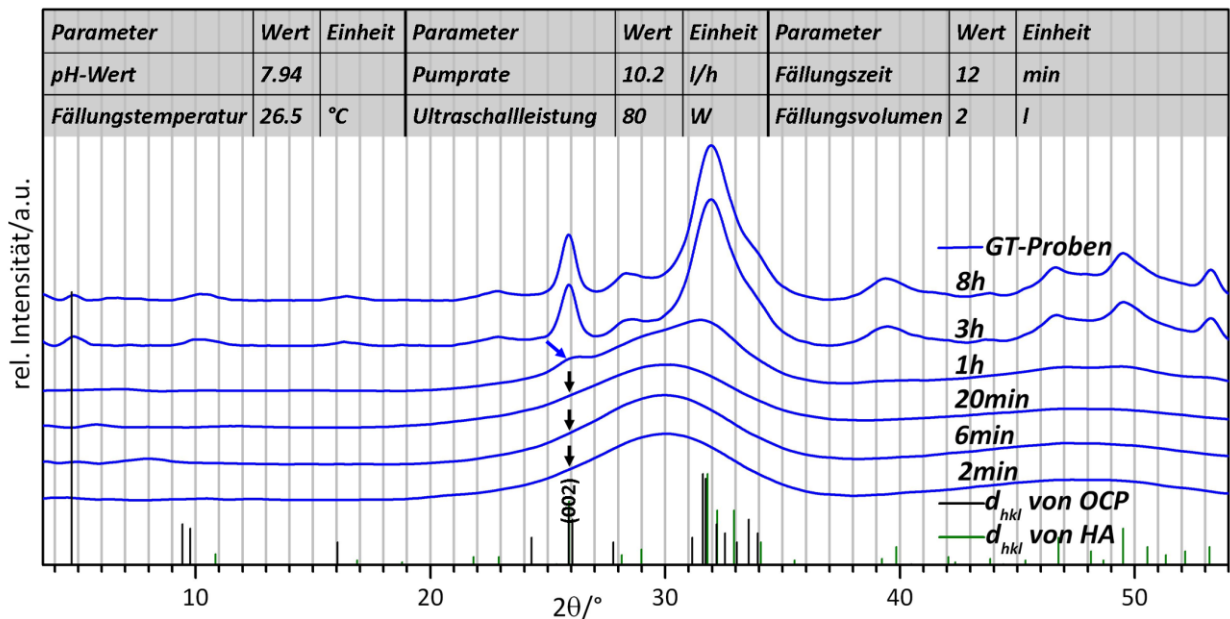


Abbildung 5.22: XRD-Kurven von CaP bei einer Ultraschalleistung von 80W und einer Pumprate von 10.2l/h mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 2 min bis 8h. Die d_{hkl} von HA und OCP wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 bzw. 26-1056 entnommen.

In Abbildung 5.22 zeigt sich in den Röntgenbeugungskurven bei einer Ultraschalleistung von 80W und einer Pumprate von 10.2l/h nach 2 min, 6 min bzw. 20 min Standzeit der Halo von ACP mit einem Maximum bei ca. 30°. Der Verlauf der XRD-Kurve entspricht bis 1h Standzeit hauptsächlich dem von ACP mit der einsetzenden Bildung von HA, da sich ein schwaches Signal bei ~26° (markiert durch schwarze Pfeile) zeigt, das auf die Entstehung der HA-Phase mit einer Vorzugsorientierung in (002)-Richtung hindeutet. Der blaue Pfeil markiert den (002)-Reflex, der das Einsetzen der Entstehung von HA kennzeichnet. Die Transformation von ACP zu HA war demnach zu dieser Standzeit noch nicht vollständig abgeschlossen. Ab 3h Standzeit sind Reflexe mit deutlich größerer Integralbreite bzgl. der der Reflexe von humanem Knochen in der Röntgenbeugungskurve zu beobachten, die nanokristallinem HA zuzuordnen sind. In geringer Menge ist ab 3h Standzeit weiterhin OCP vorhanden, erkennbar am Hauptreflex bei 4.7°.

Zusammenfassend zeigt sich, dass es innerhalb von 1 h bis 3 h nach beendeter CaP-Fällung zum Abschluss der ACP-HA-Umwandlung kommt. Ab etwa 3 h Standzeit besteht das Fällungsprodukt aus nanokristallinem HA und einer geringen Menge nanokristallinem OCP. Eine Erhöhung der Ultraschalleistung bewirkt demnach keine merkliche Zunahme der Umwandlungsrate von ACP zu HA. Der Beitrag der durch den Eintrag von thermischer Energie bedingten Temperaturerhöhung der Fällungslösung ist vernachlässigbar gering. Die Existenz weiterer kristalliner CaP-Phasen wird mit zunehmender Alterung nicht festgestellt.

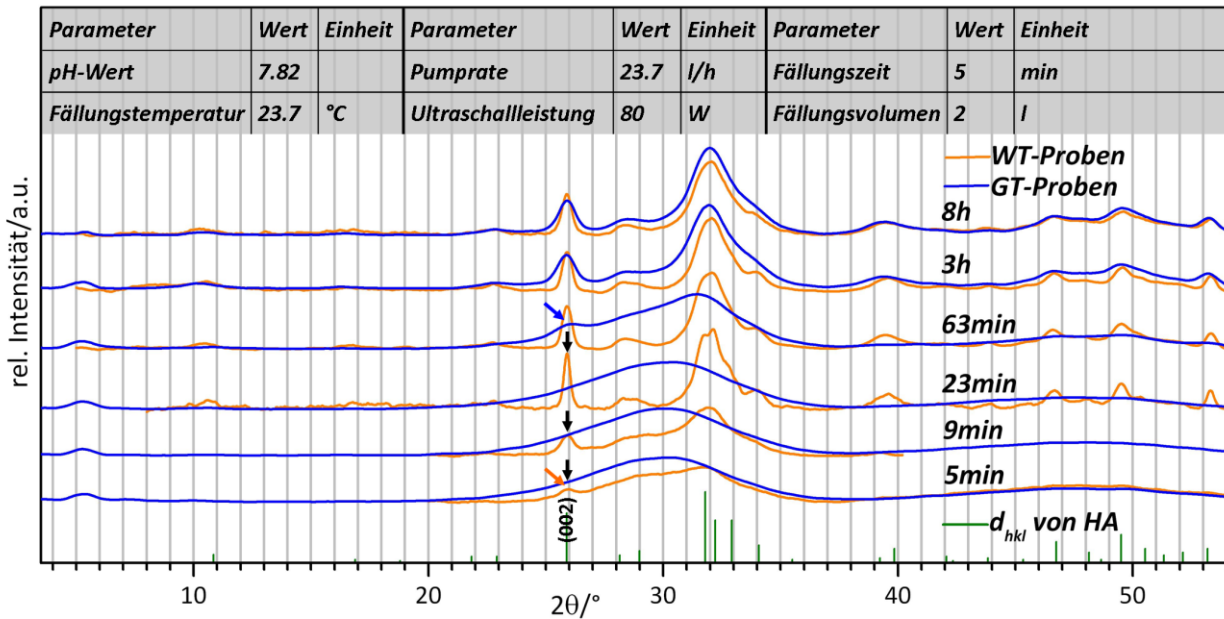


Abbildung 5.23: XRD-Kurven von CaP bei einer Ultraschalleistung von 80 W und einer Pumprate von 23.6 l/h mit zunehmender Standzeit der Fällungslösung von 5 min bis 8 h. Die d_{hkl} von HA wurden aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen.

Nach 5 min und 9 min Standzeit zeigt sich in der Röntgenbeugungskurve bei einer Ultraschalleistung von 80 W und einer Pumprate von 23.6 l/h der beginnende Übergang von ACP zu HA (Abbildung 5.23). Der orange Pfeil markiert den (002)-Reflex, der das Einsetzen der Bildung von HA kennzeichnet. Nach einer Stunde Standzeit zeigt die XRD-Kurve der GT-Probe einen ähnlichen Verlauf. Der blaue Pfeil markiert den (002)-Reflex, der den bereits genannten Vorgang kennzeichnet. Ab 23 min Standzeit zeigen sich in der Röntgenbeugungskurve der WT-Probe allein die Reflexe von HA.

Bei den GT-Proben zeigt sich das gleiche Ergebnis erst nach 3 h bis 8 h Standzeit. Eine Ultraschalleistung von 80 W und eine Pumprate von 23.6 l/h sind zur Herstellung von HA für die Alterung der Fällungslösung im Bereich von einer Stunde bis etwa 3 h geeignet. Eine Erhöhung der Ultraschalleistung von 33 W auf 80 W bewirkt bei pH-Wert 7.8 und einer Pumprate von 23.6 l/h eine geringe Beschleunigung der Umwandlung von ACP zu HA.

Summa summarum kann festgestellt werden, dass es innerhalb von 1 h bis 3 h nach beendeter CaP-Fällung zum Abschluss der ACP-HA-Umwandlung kommt. Ab etwa 3 h Standzeit besteht das Fällungsprodukt aus nanokristallinem HA. Eine Erhöhung der Ultraschalleistung bewirkt eine geringe Abnahme der Umwandlungsdauer von ACP zu HA. Die Existenz weiterer kristalliner CaP-Phasen wird mit zunehmender Alterung nicht festgestellt.

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.24 von pH-Wert 7.0 (a-c) bzw. 7.4 (d-f) gefälltem HA zeigen bei einer Ultraschalleistung von 255 W bzw. 250 W, dass sich nach 15 min Alterung plättchenförmige HA-Kristallite bilden. Die HA-Kristallite haben eine Plättchendicke zwischen 2 nm und 4 nm. Plättchenlänge bzw. -breite liegen zwischen 50 nm und 60 nm bzw. zwischen 15 nm und 25 nm. Die HA-Plättchen bilden wie üblich Agglomerate, deren Größe im Mikrometer-Bereich

liegt. Die dunklen, plättchenförmigen Objekte sind dünne HA-Kristallite, die in der Bildebene liegen. Die sehr dunklen, fast schwarzen nadelförmigen Objekte sind HA-Plättchen, die sich in Längsseitenlage senkrecht zur Bildebene befinden.

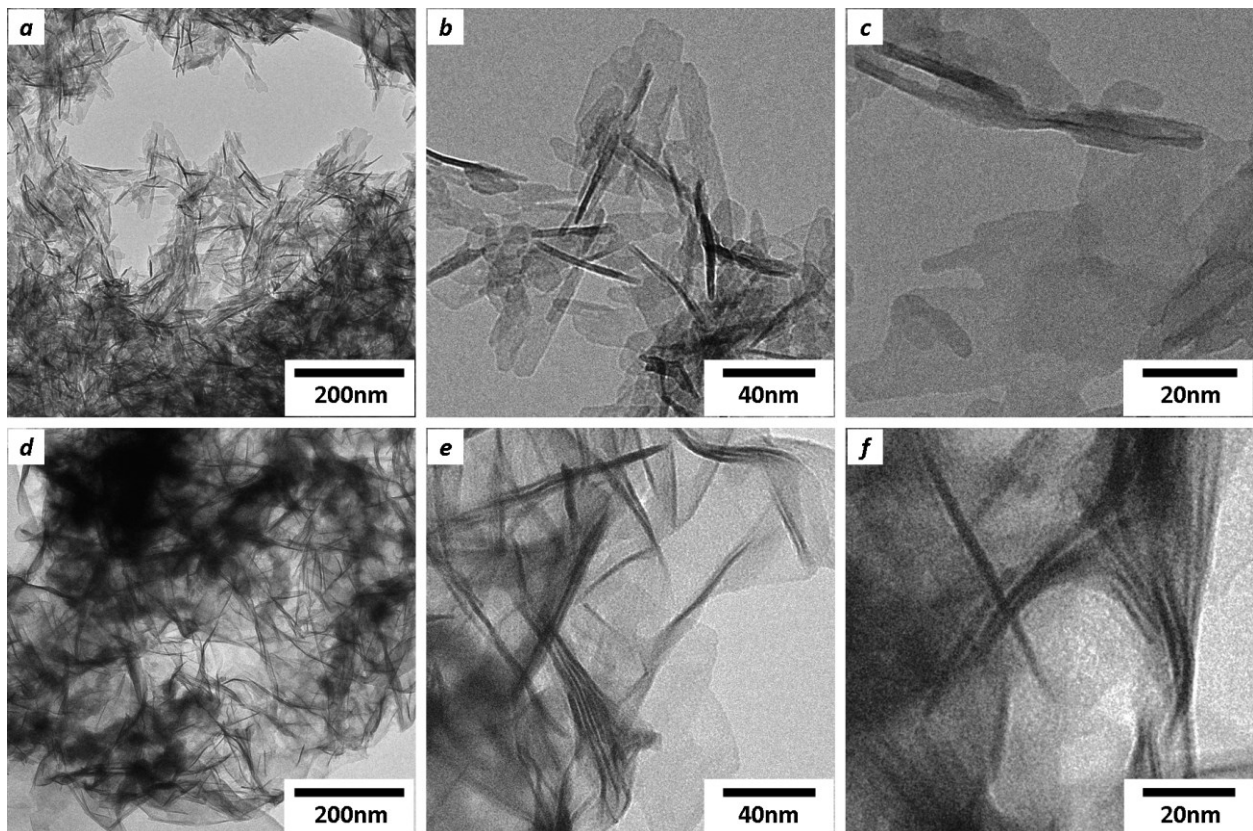


Abbildung 5.24: TEM-Aufnahmen von pH-Wert 7.0 gefälltem HA bei einer Ultraschallleistung von 255 W und einer Alterung von 15 min (a-c) sowie von pH-Wert 7.4 gefälltem HA bei einer Ultraschallleistung von 250 W und einer Alterung von 15 min (d-f).

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.25 (a, c) und die STEM-Aufnahme in Abbildung 5.25b von pH-Wert 7.8 gefälltem HA zeigen bei einer Ultraschallleistung von 0 W und einer Pumprate von 10.2 l/h, dass sich nach 3 h Alterung plättchenförmige HA-Kristallite bilden.

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.25 (d-f) von bei gleichem pH-Wert gefälltem HA zeigen bei einer Ultraschallleistung von 80 W und der letztgenannten Pumprate, dass sich nach der gleichen Alterung ebenfalls plättchenförmige HA-Kristallite bilden.

Die TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.25 (g, i) und die STEM-Aufnahme in Abbildung 5.25h von bei gleichem pH-Wert gefälltem HA zeigen bei der letztgenannten Ultraschallleistung und einer Pumprate von 23.6 l/h, dass sich nach der gleichen Alterung auch hier plättchenförmige HA-Kristallite bilden.

Die HA-Kristallite haben eine Plättchendicke zwischen 4 nm und 6 nm. Die Länge bzw. Breite der Plättchen liegt zwischen 55 nm und 75 nm bzw. zwischen 10 nm und 15 nm. Die HA-Plättchen bilden wie üblich Agglomerate, deren Größe im Mikrometer-Bereich liegt.

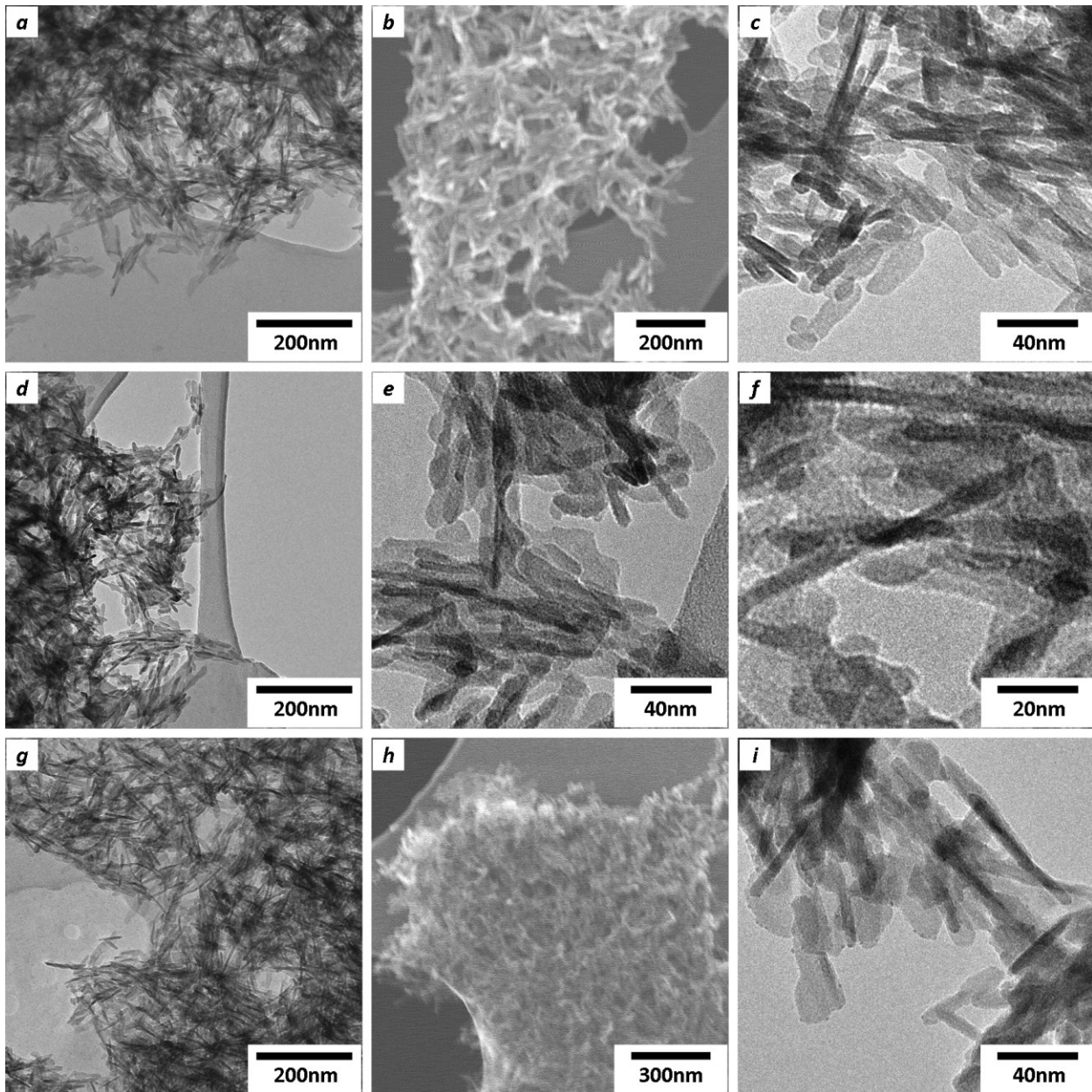


Abbildung 5.25: (a, c) TEM-Aufnahmen und (b) STEM-Aufnahme von pH-Wert 7.8 gefälltem HA, bei einer Ultraschalleistung von 0W, einer Pumprate von 10.2 l/h und einer Alterung von 3 h. (d-f) TEM-Aufnahmen von bei gleichem pH-Wert gefälltem HA, bei einer Ultraschalleistung von 80W, der gleichen Pumprate und Alterung. (g, i) TEM-Aufnahmen und (h) STEM-Aufnahme von bei gleichem pH-Wert gefälltem HA, bei der letztgenannten Ultraschalleistung, einer Pumprate von 23.6 l/h und der gleichen Alterung.

In Tabelle 5.3 sind die aus den TEM-Aufnahmen gewonnenen Ergebnisse zur Morphologie der HA-Kristallite, das mithilfe von EDX bestimmte molare Ca/P-Verhältnis in den HA-Proben in Abhängigkeit von der Ultraschalleistung, pH-Wert, Pumprate sowie der Alterung der HA-Kristallite von 15 min bzw. drei Stunden in der Fällungslösung aufgeführt.

Unter den gegebenen Fällungsbedingungen entstehen im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 7.8 plättchenförmige HA-Nanokristalle. Die Dicke der HA-Kristallite bleibt konstant in der Größenordnung von 3 nm bis 6 nm. Allgemein führt eine Erhöhung der Ultraschallenergie zu

einer leichten Zunahme der Dicke der HA-Plättchen. Oberhalb von pH-Wert 7.0 nimmt die Plättchenbreite leicht ab und die Länge der HA-Kristallite bleibt konstant in der Größenordnung von 50 nm bis 75 nm. HA-Nanokristalle, die der Morphologie von Knochenapatitkristalliten entsprechen, existieren demzufolge im untersuchten pH-Bereich.

Tabelle 5.3: Morphologie und Größe der HA-Kristallite sowie das molare Ca/P-Verhältnis in den HA-Proben, die bei den Fällungs-pH-Werten 7.0, 7.4 bzw. 7.8 hergestellt wurden, unter dem Einfluss der Ultraschalleistung.

pH-Wert	CaP-Phase	Ultraschallleistung /W	Pumprate in l/h	Alterung	mol. Ca/P-Verhältnis	Kristallitgröße			Kristallitmorphologie
						Dicke / nm	Breite / nm	Länge / nm	
7.0	HA	33	23.6	15 min	1.61	4.1 ± 0.5	21.8 ± 4.2	51.6 ± 7.3	plättchenförmig
7.0	HA	255	23.6	15 min	1.58	3.8 ± 0.3	16.9 ± 1.2	56.3 ± 5.1	plättchenförmig
7.4	HA	33	23.6	15 min	1.66	3.6 ± 0.6	15.8 ± 1.3	51.6 ± 5.6	plättchenförmig
7.4	HA	250	23.6	15 min	1.60	2.5 ± 0.3	24.2 ± 2.6	56.7 ± 4.7	Plättchenförmig
7.8	HA	0	10.2	3h	1.71	4.8 ± 0.4	11.4 ± 2.0	64.0 ± 5.5	plättchenförmig
7.8	HA	33	10.2	3h	1.59	3.3 ± 0.6	14.2 ± 1.0	58.2 ± 5.3	plättchenförmig
7.8	HA	80	10.2	3h	1.64	5.1 ± 0.3	13.0 ± 1.7	59.0 ± 8.2	plättchenförmig
7.8	HA	33	23.6	3h	1.68	4.3 ± 0.6	14.4 ± 2.4	63.4 ± 2.8	plättchenförmig
7.8	HA	80	23.6	3h	1.60	5.3 ± 0.5	14.0 ± 1.6	72.3 ± 4.9	plättchenförmig

5.4.2 Struktur nach Temperaturbehandlung

Der hergestellte, nanokristalline Hydroxylapatit soll in Biomaterialien eingesetzt werden. Es ist notwendig eine Temperaturbehandlung durchzuführen, um organische Rückstände, die aus den bei der Herstellung verwendeten Ausgangsstoffen stammen, aufgrund ihrer toxischen Wirkung zu entfernen. Um mögliche Veränderungen der Struktur des nanokristallinen Hydroxylapatits durch die Temperaturbehandlung zu untersuchen, wurden Röntgenbeugungsmessungen durchgeführt. HA wurde durch die in Kapitel 5.2 genannte nasschemische Fällungsreaktion bei pH-Wert 6.6, 7.9 bzw. 9.0 hergestellt. Die Standzeit der Fällungslösung wurde so gewählt, dass ausschließlich nanokristalliner HA als Fällungsprodukt auftritt. Die wässrigen HA-Schlicker trockneten 4 Stunden bei 250°C im Vakuumofen. Anschließend erfolgte eine einstündige Temperaturbehandlung bei 600°C, 700°C bzw. 800°C. Die Trockenproben wurden anschließend gemörsert und in Quarzglas Kapillaren für die XRD-Untersuchungen eingefüllt. In allen Röntgenbeugungskurven ist der auftretende Halo mit einem Maximum bei ca. 22° auf die amorphe Struktur der eingesetzten Quarzglas Kapillaren zurückzuführen. Wie bereits in Kapitel 2.2.1 erwähnt wurde, wandelt sich gefällter calciumdefizienter HA in β -TCP oder eine Mischung aus β -TCP und HA beim Erhitzen auf mehr als 700°C um. In Abbildung 5.26 sind XRD-Kurven von HA dargestellt, das bei pH-Wert 6.6 gefällt wurde. Als einzige kristalline Phase ist HA bis 600°C zu erkennen. Bei ca. 700°C sind neben den Reflexen von HA, Reflexe von β -TCP und zwei Reflexe (mit Fragezeichen gekennzeichnet), die keiner existierenden CaP-Phase eindeutig zuzuordnen sind, zu erkennen. Bei 800°C liegt neben β -TCP in geringer Menge Monetit (DCPA) vor.

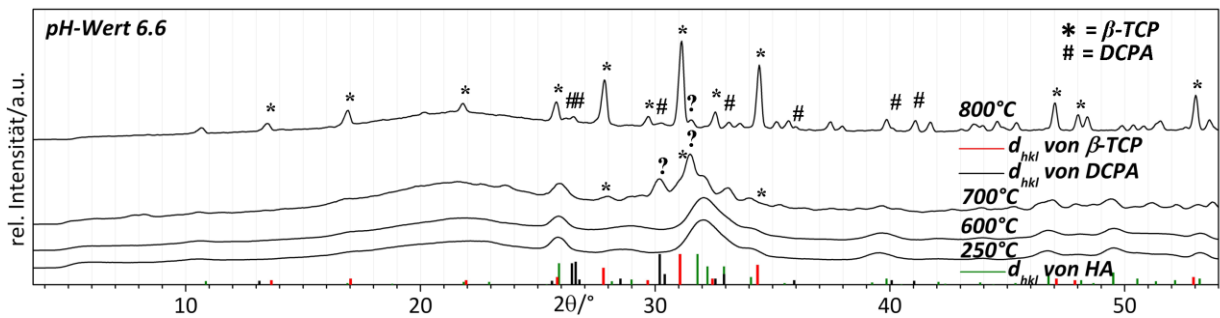


Abbildung 5.26: Röntgenbeugungskurven von HA, das bei pH-Wert 6.6 gefällt und bei verschiedenen Temperaturen behandelt wurde. Die Sterne markieren die Reflexe von β -TCP und die Rauten, die von DCPA. Die Fragezeichen markieren nicht näher bestimmte Reflexe.

In Abbildung 5.27 sind die XRD-Kurven von HA dargestellt, das bei pH-Wert 7.9 gefällt wurde. Es zeigt sich ein vergleichbares Verhalten, wie bei pH-Wert 6.6 zuvor beschrieben wurde.

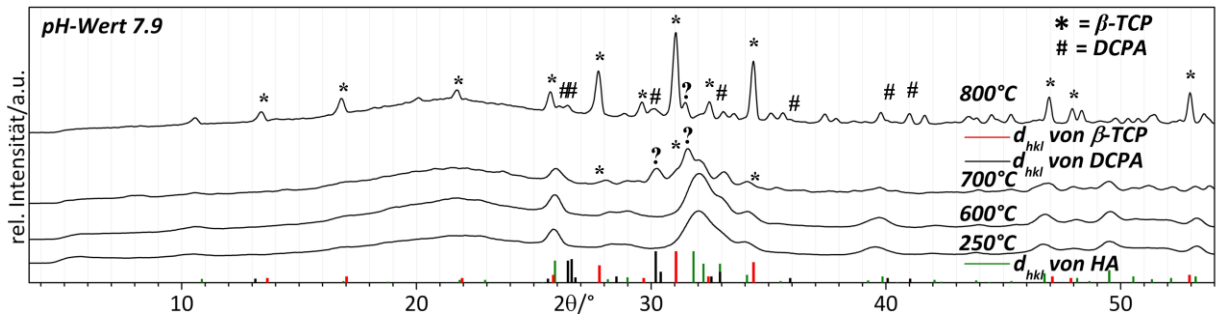


Abbildung 5.27: Röntgenbeugungskurven von HA, das bei pH-Wert 7.9 gefällt und bei verschiedenen Temperaturen behandelt wurde. Die Sterne markieren die Reflexe von β -TCP und die Rauten, die von DCPA. Die Fragezeichen markieren nicht näher bestimmte Reflexe.

In Abbildung 5.28 sind XRD-Kurven von HA dargestellt, dass bei pH-Wert 9.0 gefällt wurde. Es zeigt sich auch hier ein ähnliches Verhalten, wie bei den beiden pH-Werten zuvor.

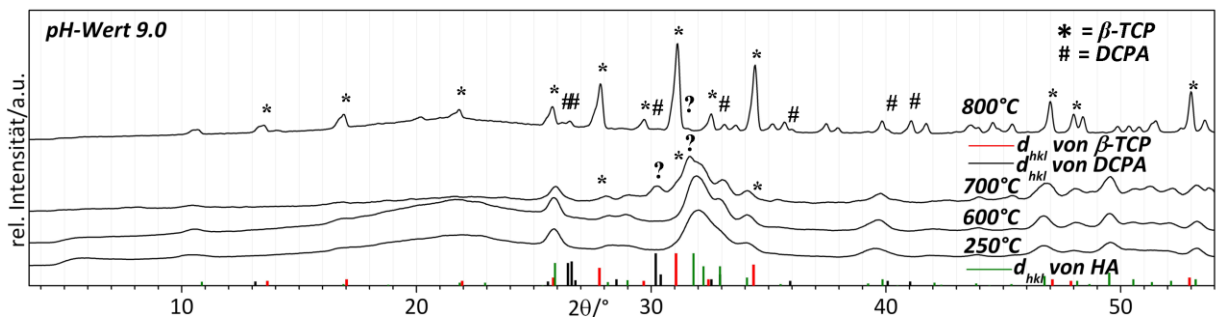


Abbildung 5.28: Röntgenbeugungskurven von HA, das bei pH-Wert 9.0 gefällt und bei verschiedenen Temperaturen behandelt wurde. Die Sterne markieren die Reflexe von β -TCP und die Rauten, die von DCPA. Die Fragezeichen markieren nicht näher bestimmte Reflexe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das bei den pH-Werten 6.6, 7.9 bzw. 9.0 hergestellte HA bis 600°C keinen merklichen Änderungen der kristallinen Struktur unterliegt. Bei pH-Wert

7.9 und 9.0 hergestelltem HA wird bei 600°C eine Zunahme der Intensität des (300)-Reflexes bei 32.9° festgestellt, was mit einem Dickenwachstum der HA-Plättchen korreliert. Bei 700°C treten in den XRD-Kurven erstmals neben den Reflexen von β -TCP zwei weitere Reflexe (angedeutet durch Fragezeichen in den Abbildungen 5.26 bis 5.28) auf, die keiner CaP-Phase eindeutig zuzuordnen sind. Diese Reflexe treten ebenfalls bei 800°C neben β -TCP auf. Die Umwandlung von β -TCP zu HA ist bei 800°C für die untersuchten pH-Werte abgeschlossen. Bei 800°C tritt Monetit (DCPA) in geringer Menge als weitere CaP-Phase auf.

5.4.3 Zusammenfassung bisheriger Ergebnisse

Innerhalb von bis zu 24h nach beendeter Fällung ist die Umwandlung von ACP zu nanokristallinem HA abgeschlossen. Im pH-Wert-Bereich von 6.6 bis 7.8 ist die Umwandlung bereits innerhalb von 3h beendet. Es entstehen im pH-Wert-Bereich von 6.6 bis 9.0 plättchenförmige HA-Nanokristalle. Bei pH-Werten von 6.6 bis etwa 7.3 ist ein Auftreten von Fremdphasen möglich. Oberhalb von pH-Wert 7.8 nimmt die Plättchendicke zu. Die Plättchendicke beträgt im pH-Wert-Bereich von 7.0 bis 7.8 zwischen 3 nm und 6 nm, die Breite zwischen 10 nm und 25 nm und die Länge zwischen 50 nm und 75 nm. Die kristalline Struktur und Kristallitgröße der HA-Kristallite, die in diesem pH-Wert-Bereich gefällt wurden, ist der der Bioapatitkristallite im Knochen sehr ähnlich. Oberhalb von pH-Wert 9.0 nehmen Plättchenbreite und -länge ab und die Plättchendicke nimmt weiter zu. Bei pH-Wert 12.6 bilden sich stäbchenförmige HA-Nanokristalle.

Eine Erhöhung der Pumprate bewirkt eine leichte Verzögerung der Umwandlung von ACP zu HA, was sich durch die verringerte Verweilzeit der Fällungslösung in der Durchflussmischzelle erklären lässt. Ein Ausbleiben des Eintrags von Ultraschallenergie bewirkt eine geringe Abnahme der Umwandlungsrate von ACP zu HA. Eine Erhöhung der Ultraschalleistung bewirkt eine geringe Zunahme der Umwandlungsrate von ACP zu HA und eine leichte Zunahme der Dicke der HA-Plättchen.

Der nanokristalline HA bleibt im pH-Wert-Bereich von 6.6 bis 9.0, bei einer Temperaturbehandlung bis 600°C phasenstabil. Erst bei Temperaturen von etwa 700°C findet eine Umwandlung zu β -TCP statt. Diese Umwandlung ist bei 800°C für die untersuchten pH-Werte abgeschlossen.

Ausgehend von diesen Resultaten wurden weitere Untersuchungen an HA durchgeführt, der bei pH-Wert 7.8 gefällt wurde. Dieser pH-Wert stellt einen guten Kompromiss dar, um einerseits plättchenförmige HA-Kristallite mit einer Kristallitgröße zu erhalten, die der der Bioapatitkristallite im Knochen sehr ähnlich ist, und andererseits die Sicherheit, dass das Auftreten von Fremdphasen ausbleibt. Der nanokristalline HA wurde fortan bei einer Gesamtpumprate von 10.2l/h, einer Ultraschalleistung von 33 W und einer Alterung zwischen 1 h und 3 h hergestellt.

5.5 Charakterisierung von pH-Wert 7.8 hergestelltem Hydroxylapatit

5.5.1 Makro- bis Nanostruktur

In Abbildung 5.29 wurde die Struktur von nanokristallinem HA im Makro- bis hin zum Nanobereich durch Digitalkamera- bzw. REM-Aufnahmen charakterisiert.

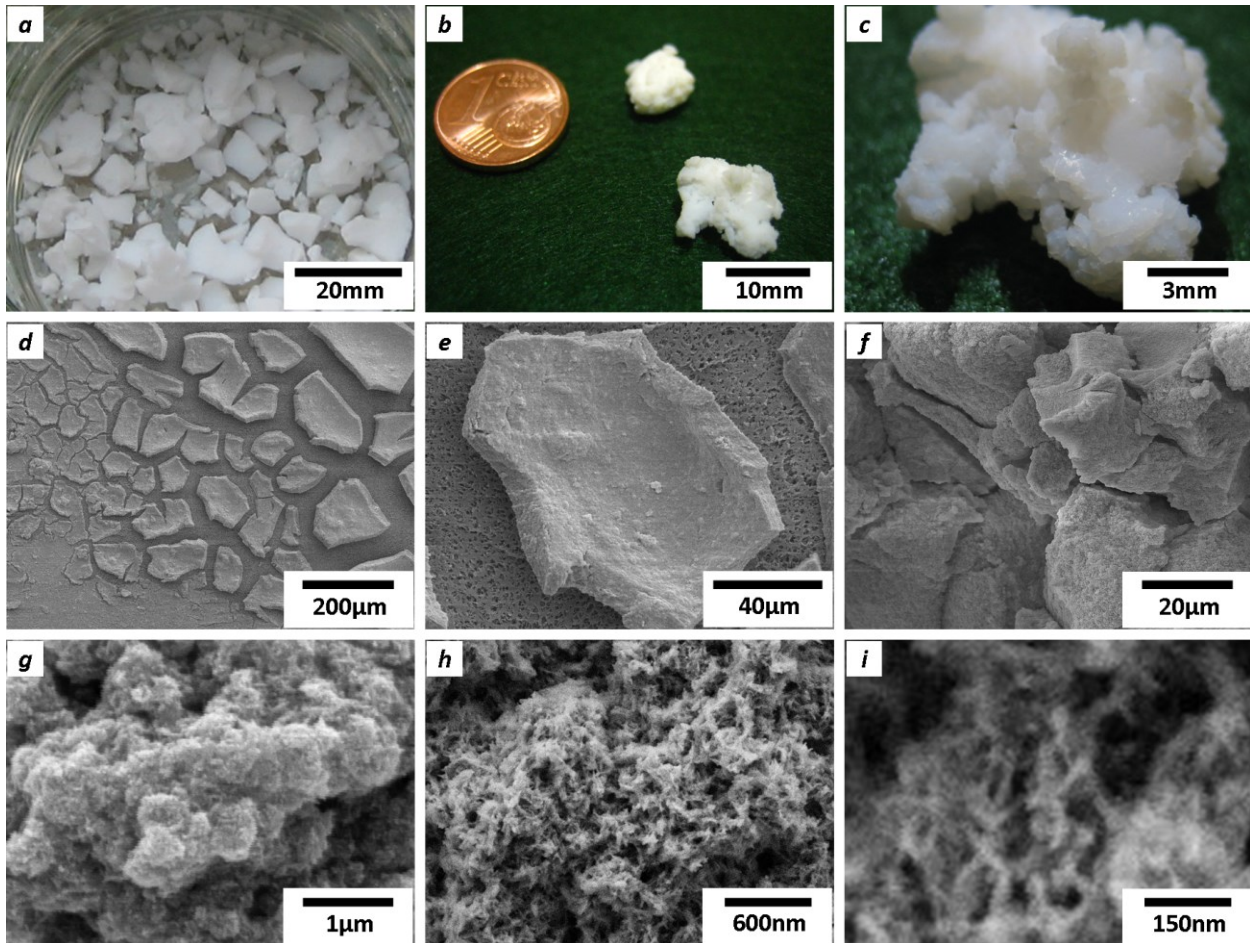


Abbildung 5.29: (a-c) Digitalkamerabilder von eingetrocknetem HA-Schlicker. REM-Aufnahmen eines auf einem Membranfilter aus Celluloseacetat eingetrockneten (d-f) und eines direkt auf dem Klebetab eingetrockneten HA-Schlickers (g-i).

In Abbildung 5.29(a-c) zeigen Kamerabilder eine HA-Trockenprobe. Diese ist ein weißer kristalliner Feststoff, der in Form eines festen Granulats vorliegt. In Abbildung 5.29(d-f) sind REM-Aufnahmen von HA-Schlicker zu erkennen, der auf einem Membranfilter eingetrocknet ist. Das Granulat setzt sich aus kleineren Granulatkörnern zusammen, die eine dichte Packung bilden. In Abbildung 5.29(g-i) zeigen REM-Aufnahmen einen direkt auf dem Klebetab eingetrockneten HA-Schlicker bei hoher Vergrößerung. Es sind Agglomerate von HA-Kristalliten zu erkennen. Die HA-Nanokristalle haben eine einheitliche Größe und liegen in der Gestalt dünner Plättchen vor.

Durch Umwandlung entsteht aus ACP nanokristalliner HA mit einer längs der kristallographischen c-Achse bevorzugten Wachstumsrichtung (anisotropes Kristallwachstum). Bei weiterer Vergrößerung sind in den TEM-Aufnahmen in Abbildung 5.30 HA-Nanokristalle zu erkennen, die der Morphologie von Knochenmineral-kristalliten entsprechen. Die dunklen, scheinbar nadelförmigen Objekte sind auf der Längsseite liegende HA-Plättchen. In Abbildung 5.30b sind bereits die einzelnen, parallel angeordneten (100)-Netzebenen vom HA zu sehen. Die Abbildung 5.30c stellt eine Ausschnittsvergrößerung (rot umrandet) aus Abbildung 5.30b dar. Es ist ein HA-Plättchen mit einer Dicke dargestellt, die durch vier Lagen parallel liegender Netzebenen und einer dünnen Oberflächenschicht gekennzeichnet ist. Der interplanare Abstand von 0.82 nm ist auf den Gitterabstand benachbarter (100)-Netzebenen zurückzuführen.

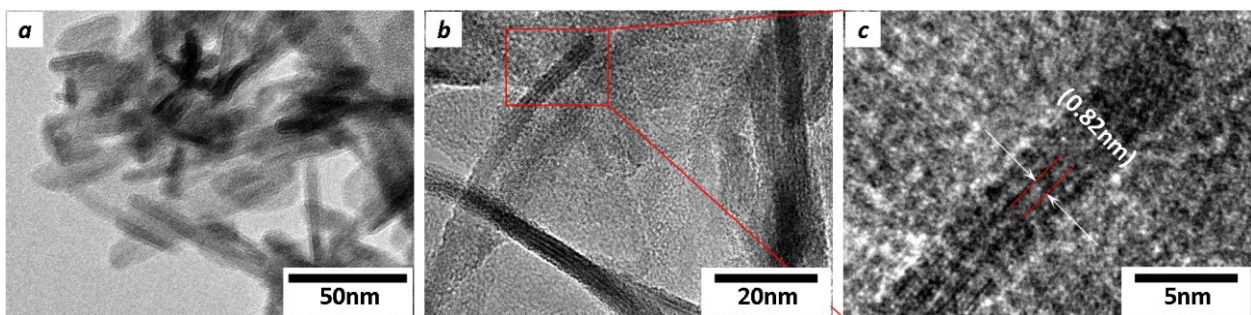


Abbildung 5.30: (a-c) HRTEM-Aufnahmen eines direkt auf dem mit Kohlelochfilm überzogenem Kupfernetzchen eingetrockneten HA-Schlickers. In (b) sind bereits einzelne parallel angeordnete Netzebenen der HA-Plättchen zu sehen. (c) Die Ausschnittsvergrößerung (rot umrandet) aus Abbildung 5.27b zeigt die (100)-Netzebenen von einem HA-Plättchen.

Die Plättchendicke d lässt sich nach Gleichung 5.12 berechnen. Man erhält in etwa eine Plättchendicke von 3.0 nm. Dieser Wert liegt im Fehlerintervall der in Tabelle 5.1 (Kapitel 5.4.1.2) eingetragenen mittleren Plättchendicke für HA, der bei pH-Wert 7.8 hergestellt wurde.

$$d_{\text{HA-Plättchen}} = (n - 1) \cdot d_{(100)} + 2 \cdot d_{\text{OF}} \quad (5.12)$$

mit	Anzahl der parallel angeordneten (100)-Netzebenen	n	= 4
	Gitterabstand benachbarter (100)-Netzebenen	$d_{(100)}$	= 0.82 nm
	abgeschätzte Dicke der Oberflächenschicht	d_{OF}	= 0.25 nm

5.5.2 Chemische Zusammensetzung

Die chemische Zusammensetzung von nanokristallinem HA, das bei pH-Wert 7.8 nach Standarddurchführung gefällt wurde, ist bisher mit EDX untersucht worden. Es wurde dabei festgestellt, dass das gereinigte und getrocknete Fällungsmaterial sich aus den Elementen Calcium, Phosphor und Sauerstoff zusammensetzt. Kohlenstoff kann zum einen als Verunreinigung im Fällungsmaterial (z. B. als Carbonat, organische Moleküle), und zum anderen in Form von Trockeneis auf dem, mit flüssigem Stickstoff gekühltem, Detektorkristall

abgelagertem CO_2 auftreten. Da die Fällung von HA an Luft durchgeführt wird, ist zu untersuchen, ob Carbonat in die HA-Kristallstruktur durch Substitution eingebaut wird. Gleiches gilt für Ammonium als möglichen Substituenten. Weil mit EDX allein nicht festzustellen ist, ob Carbonat bzw. Ammonium ein Bestandteil der chemischen Zusammensetzung des Fällungsmaterials ist, wurden IR-Messungen durchgeführt. Es wurde 250°C bzw. 600°C temperaturbehandelter, nanokristalliner Hydroxylapatit (ncHA, nanocrystalline HA) zur Untersuchung verwendet. Als Vergleich dient humaner Femurknochen, der etwa 7.4 Gew.-% Carbonat enthält (Tabelle 2.4). Abbildung 5.31a zeigt die FTIR-Spektren der nanokristallinen HA-Proben in der Übersicht und Abbildung 5.31b im Wellenzahlbereich von 1300 cm^{-1} bis 525 cm^{-1} in Gegenüberstellung mit dem FTIR-Spektrum von humanem Femurknochen.

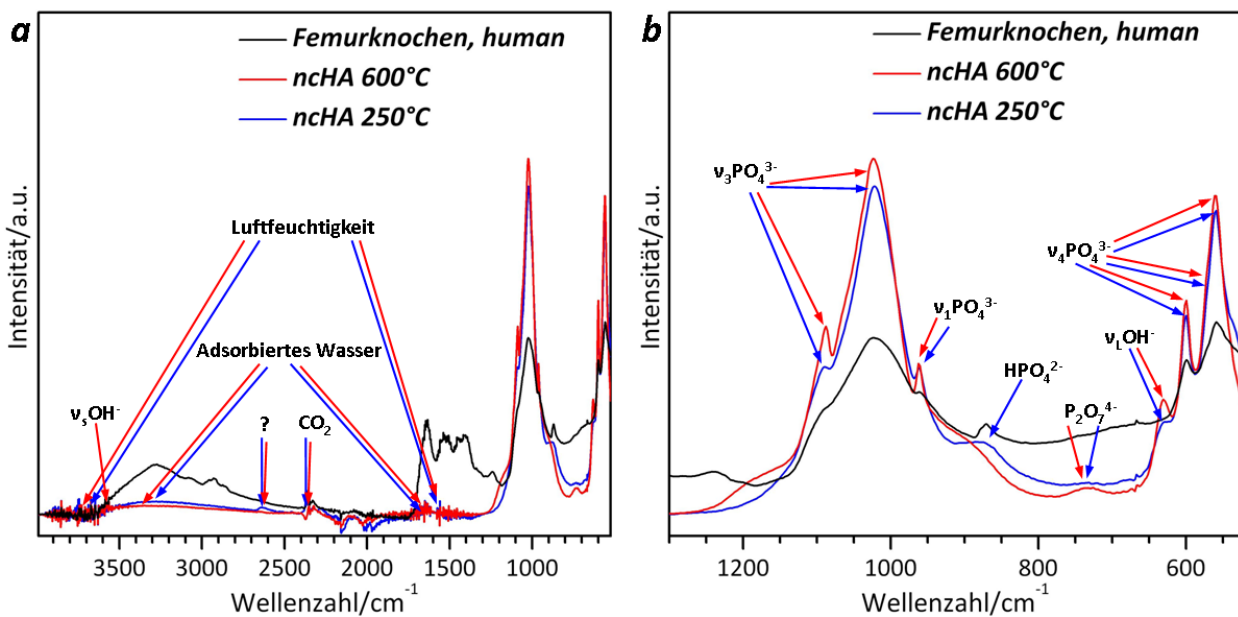


Abbildung 5.31: FTIR-Spektren von bei pH-Wert 7.8 gefälltem nanokristallinem HA (ncHA), das bei 250°C (blaue Kurve) bzw. 600°C temperaturbehandelt (rote Kurve) wurde und von humanem Femurknochen (schwarze Kurve) im Wellenzahlbereich von (a) 3990 cm^{-1} bis 525 cm^{-1} und (b) von 1300 cm^{-1} bis 525 cm^{-1} . Die blauen Pfeile geben die Zuordnung der IR-Banden für das bei 250°C getrocknete ncHA, die roten analog die der höher temperaturbehandelten Probe wieder. Für die IR-Bande bei 2625 cm^{-1} wurde keine Zuordnung gefunden (markiert durch ein Fragezeichen). Für die FTIR-Messungen wurde die ATR-Methode angewendet.

Tabelle 5.4 fasst die IR-Daten und jeweiligen Zuordnungen der einzelnen Schwingungsbanden der untersuchten HA-Proben zusammen. Die Zuordnung erfolgt ausgehend von bekannten Literaturdaten. Als Vergleich dienen die IR-Daten und jeweiligen Zuordnungen der einzelnen Schwingungsbanden von humanem Femurknochen die im Kapitel 2.2.2 in der Tabelle 2.5 zusammengefasst wurden.

Tabelle 5.4: IR-Daten und Zuordnungen für 250°C bzw. 600°C temperaturbehandeltes ncHA.

ncHA 250°C Wellenzahl/cm ⁻¹	ncHA 600°C Wellenzahl/cm ⁻¹	Zuordnung	Referenz
560 (s); 574 (s, sh); 601 (s, shp)		$\nu_4\text{PO}_4^{3-}$	[Fur01, Pal08, Pra06, Sam07]
631 (w, sh)	631 (m)	$\nu_1\text{OH}^-$	[Big07, Mob07, Fur01, Pra06]
733 (vw, br)	733 (w, br)	$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	[Ray02, Sid05]
875 (w, br)	-	P-O(H) von HPO_4^{2-}	[Heu77, Ray02, Sam07]
962 (m)		$\nu_1\text{PO}_4^{3-}$	[Fur01, Pal08, Pra06, Sam07]
1023 (vs), 1089 (s)		$\nu_3\text{PO}_4^{3-}$	[Fur01, Pal08, Pra06, Sam07]
1595 (vw), 3800-3500 (vw, br)		Luftfeuchtigkeit	[Ber67, Jor71]
1640 (w), 3400 (w, br)		Adsorbiertes Wasser	[Kan05, Pal08]
2359 (w, shp)		CO_2	[Suc04]
2625 (w)	2625 (vw)	keine gefunden	-
-	3572 (vw)	$\nu_5\text{OH}^-$	[Big07, Mob07, Pra06, Ray02]

Es wurden folgende Abkürzungen für die Bandenzuordnungen verwendet: vs:sehr stark; s:stark; m:mittelstark; w:schwach; vw:sehr schwach; br:breit; shp:scharf; sh:Schulter; v:Valenzschwingung; δ : Deformationsschwingung.

In beiden HA-Proben sind Phosphat, Pyrophosphat und Hydroxylgruppen enthalten. Im Gegensatz dazu, enthält der anorganische Anteil der Knochenprobe Phosphat, Carbonat und Hydrogenphosphat.

In der 250°C behandelten HA-Probe ist Hydrogenphosphat und eine geringe Menge Pyrophosphat vorhanden. Im Gegensatz dazu, lässt sich anteilig mehr Pyrophosphat in der 600°C behandelten HA-Probe nachweisen. Hydrogenphosphat wird nicht mehr gefunden.

Es ist eine Zunahme der Intensität der IR-Banden sowie eine Abnahme der Breite der Schwingungsbanden mit Zunahme der Behandlungstemperatur und gegenüber der Knochenprobe festzustellen.

Die IR-Bande der Valenzschwingung der Hydroxylgruppe bei 3572 cm^{-1} tritt nur bei der HA-Probe mit der höheren Temperaturbehandlung als schwaches Signal auf. Parallel dazu, zeigt sich die IR-Bande der Librationsschwingung der Hydroxylgruppe bei 631 cm^{-1} bei beiden HA-Proben mit einer Zunahme der Intensität bei steigender Behandlungstemperatur. Das deutet auf nichtstöchiometrischen HA hin, bei dem Hydroxylgruppen in der Kristallstruktur aufgrund der veränderten Ladungsbilanz fehlen, was sich durch die Substitution von Phosphat mit Hydrogenphosphat erklären lässt.

Für die IR-Bande bei 2625 cm^{-1} wurde keine Zuordnung gefunden. Diese Bande zeigt sich bei beiden HA-Proben mit einer Abnahme der Intensität bei größer werdender Behandlungstemperatur. Dabei muss es sich um eine Spezies handeln, die mit zunehmender Temperatur zersetzt oder umgewandelt wird. Am ehesten trifft dies auf Hydrogenphosphat zu, das oberhalb von 200°C bis 600°C durch Kondensation zu Pyrophosphat umgewandelt wird [Sid05].

Zusammenfassend zeigt sich, dass es trotz atmosphärischer Bedingungen bei einem Fällungs-pH-Wert von 7.8 nicht zu einer nachweisbaren Inkorporation von Ammonium oder Carbonat in die HA-Kristallstruktur kommt. Die Einlagerung von Hydrogenphosphat in die HA-Kristallite kann als sicher erachtet werden, da bei einem pH-Wert von 7.8 ein großer Teil des in der Fällungslösung vorkommenden Phosphats als Hydrogenphosphat vorliegt.

Oberhalb von 200°C bis 600°C wandelt sich Hydrogenphosphat durch Kondensation zu Pyrophosphat um.

Der synthetische Hydroxylapatit und der mineralische Anteil der Knochenprobe unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung. Im Gegensatz zur Knochenprobe enthält das synthetische Material kein Carbonat.

Die Substitution von Phosphat durch Hydrogenphosphat führt aufgrund des Fehlens einer negativen Ladung zum Verlust von Calcium- und Hydroxid-Ionen, um eine ladungsneutrale Substanz zu erhalten. Infolgedessen bildet sich ein nichtstöchiometrischer Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10-x}\square_x(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}\square_x$; $0 \leq x \leq 1$; \square bedeutet Leerstelle oder Vakanz; molares Ca/P-Verhältnis von 1.5 bis 1.67) [Mon81, Win74]. Dieses Material wird als calciumdefizienter Hydroxylapatit bezeichnet.

Kapitel 6

Einsatz des synthetisierten Materials zur Biomaterialweiterentwicklung

Das bereits erwähnte Unternehmen entwickelt und produziert auf Basis der NanoBone®-Technologie seit 2003 Biomaterialien für den Knochenaufbau, die sich an den natürlichen Prozessen im menschlichen Körper orientieren. Durch wissenschaftliche Zusammenarbeit mit der Universität Rostock ist das synthetische Knochenaufbaumaterial NanoBone® (NB) entstanden. Dieses Biomaterial wurde anfangs in der Darreichungsform eines ungesinterten Granulats mit kontrollierter Morphologie in einem patentierten Sol-Gel-Verfahren bis 700°C entwickelt. Die Struktur des Biomaterials wurde experimentell untersucht. In Kapitel 4.2.2 sind die Resultate der Charakterisierung zusammengefasst dargestellt worden. Es wurde festgestellt, dass die für das Biomaterial eingesetzten HA-Nanokristalle sich in ihrer Morphologie, Kristalldicke und kristallinen Struktur von Bioapatitkristalliten des humanen Knochens unterscheiden.

6.1 Charakterisierung von NanoBone® der neuen Generation — NanoBone®S

Das im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelte nasschemische Verfahren zur Herstellung von HA-Nanokristallen mit plättchenförmiger Morphologie wird für die Produktion von NB-Produkten der neuen Generation verwendet. Die in den NanoBone®S-Materialien (NBS-Materialien) eingesetzten, synthetischen HA-Nanokristalle entsprechen in ihrer Morphologie und Kristallitgröße den Bioapatitkristalliten des humanen Knochens. In Abbildung 6.1 ist ein Schema der Nanostruktur von NBS dargestellt. Die Eigenschaften sind durch die Morphologie und Größe der HA-Kristallite und der Silicagelmatrix mit interkonnektierenden Poren bestimmt. Für unterschiedliche biomedizinische Anwendungen wurde der SiO₂-Massenanteil von 4% bis 50% variiert.

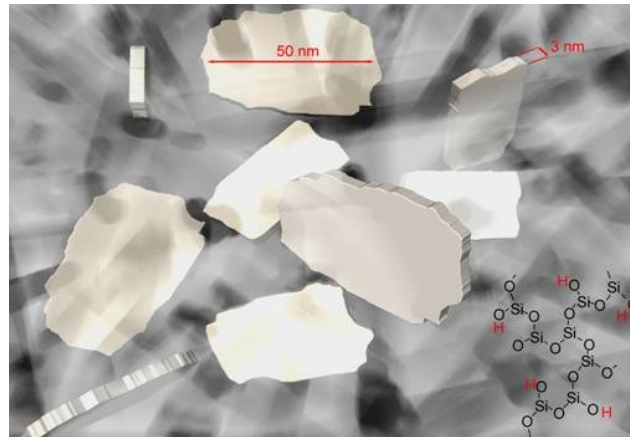


Abbildung 6.1: Schema der Nanostruktur von NBS. HA-Nanokristalle mit plättchenförmiger Morphologie, die der von Knochenapatitkristalliten sehr ähnelt, sind in eine poröse Silicagelmatrix mit interkonnektierenden Poren eingebettet.

Die Herstellung der Silicagelmatrix basiert auf einem Sol-Gel-Prozess oberhalb des isoelektrischen Punktes von SiO_2 und einer Temperaturbehandlung bis 700°C , um zum einen Dispersionsmittel und organische Rückstände zu entfernen, und zum anderen eine möglichst hohe innere Oberfläche bzw. hohe Porosität zu erhalten. Abbildung 6.2 demonstriert am Beispiel des Materials mit 39 Gew.-% SiO_2 keine Änderung der Kristallstruktur. Behandelt man stattdessen den bei pH-Wert 7.8 gefällten HA bis ca. 700°C , so zeigt sich als Resultat der röntgendiffraktometrischen Untersuchung, dass sich das temperaturbehandelte Material zu einer Mischung aus β -TCP und HA umgewandelt hat, die als biphasisches Calciumphosphat (BCP) bezeichnet wird und in der Abbildung 5.27 im Kapitel 5.4.2 gezeigt wurde.

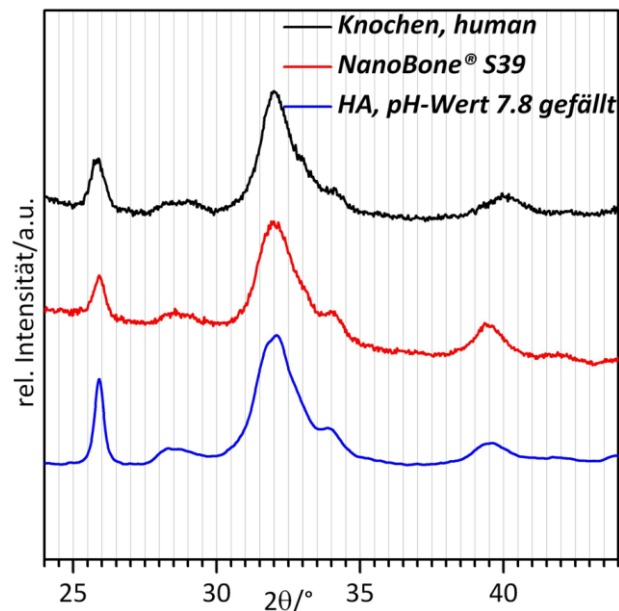


Abbildung 6.2: Röntgenbeugungskurven von humanem Femurknochen, NBS39 und HA, das bei pH-Wert 7.8 gefällt wurde.

Es scheint, als ob wegen der Ummantelung der HA-Nanokristalle durch die SiO_2 -Gelmatrix sowohl eine Phasenumwandlung zu β -TCP als auch eine Zunahme der Größe der HA-Kristallite

bis 700°C verhindert wird. Die dazu notwendigen Platzwechsellvorgänge in den Kristalliten finden bis 700°C nicht statt, da die dafür notwendige Aktivierungsenergie nicht erreicht worden ist. Sobald diese Temperatur um etwa 10°C bis 15°C überschritten wird, tritt eine Phasenumwandlung zu β -TCP auf [Rad10].

Bei einer mittleren Größe der HA-Plättchen von 50 nm x 20 nm x 4 nm und einer angenommenen Dichte von 3.16 g/cm³ erhält man für eine Masse von einem Gramm dieser Kristallite eine Oberfläche von ca. 200 m². Diese Größenordnung der spezifischen Oberfläche spiegelt sich in guter Näherung in den NBS-Materialien wieder (Tabelle 6.1).

Tabelle 6.1: Werte zur spezifischen Oberfläche und Porosität von NB und Produktvarianten von NBS.

Biomaterial	Quecksilberporosimetrie				BET	
	Spezifische Oberfläche in m ² /g	Mittlerer Porendurchmesser in nm	Totales kumulatives Volumen in cm ³ /g	Totale Porosität in %	Spezifische Oberfläche in m ² /g	Porenspezifisches Volumen in cm ³ /g
NB (NanoBone®)	81.77	34.6	0.54	51.5	85.10	0.20
NBS24	59.18	14.9	0.20	31.3	152.33	0.19
NBS39	54.61	16.0	0.18	21.8	206.83	0.20
NB Esthetics	144.01	13.6	0.46	52.8	145.57	0.49

Durch N₂-Gasadsorptionsmessungen wurde eine spezifische Oberfläche von 85 m²/g für NB und von 152 m²/g für NBS24 bestimmt. Beide Materialien weisen einen Massenanteil von 24 % SiO₂ auf und unterscheiden sich durch Morphologie und Größe der eingesetzten HA-Kristallite, womit die annähernde Verdoppelung der spezifischen Oberfläche zu erklären ist. Durch die Erhöhung des SiO₂-Gewichtanteils auf 39% wurde eine größere spezifische Oberfläche von 206 m²/g für NBS39 und durch die Verringerung des SiO₂-Gewichtanteils auf 4% eine gegenüber NBS24 etwa gleich große spezifische Oberfläche von 145 m²/g für NB Esthetics bestimmt. Für NBS24 bzw. NBS39 wurde eine deutlich geringere spezifische Oberfläche von 59 m²/g für NBS24 bzw. von 54 m²/g für NBS39 durch Quecksilberporosimetrie erhalten, da bei dieser Methode Poren, die kleiner als 4 nm sind, nicht berücksichtigt werden.

Zwischen dem SiO₂-Massenanteil und der Porosität lässt sich ein direkter Zusammenhang herstellen. In erster Näherung kann gesagt werden, dass die Porosität mit steigendem SiO₂-Massenanteil abnimmt, da die Packungsdichte zunimmt.

Für viele aktuelle Anwendungen in der Biomedizin ist es erforderlich, aus den nanostrukturierten Biomaterialien Applikationsformen zu entwickeln, die injizierbar sind und damit in bestimmte Geweberegionen gelangen. Von der Entwicklung, Charakterisierung und der biologischen Funktionalität des NBS-Materials in dieser bislang noch nicht entwickelten Darreichungsform handelt das nachfolgende Kapitel 7.

Kapitel 7

Entwicklung & Charakterisierung eines injizierbaren Biomaterials

Bislang wurden NanoBone®S-Materialien (NBS-Materialien) nur in grober Trockenform als Granulat bzw. als Block entwickelt. Um das Knochenaufbaumaterial punktgenauer und feindosierter anwenden zu können, sollte eine Darreichungsform von NBS entwickelt werden, die mikroinvasiv verabreicht werden kann. Mikropartikel eignen sich im Besonderen für diese Form der Darreichung, da sie injizierbar sind. Es lassen sich damit neue Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der Orthopädie, Unfallchirurgie sowie der zahnärztlichen Chirurgie erschließen. Die Mikropartikel wurden mittels Sol-Gel-Prozess mit anschließender Sprühtrocknung hergestellt, charakterisiert und deren Eignung als Knochenaufbaumaterial im Tierexperiment getestet. Neben der Biokompatibilität ist die Größe der Mikropartikel eine weitere wichtige Anforderung an das injizierbare Knochenaufbaumaterial. Die Mikropartikel sollen eine definierte Größe haben und in einem Bereich liegen, in dem sie keiner Phagozytose unterliegen. Bei einem idealen Knochenaufbaumaterial soll die Resorption durch Osteoklasten erfolgen, da hiermit der Abbau des Materials an die Knochenneubildung gekoppelt ist. Alle Resorptionsmechanismen laufen letztendlich über eine resorptive Entzündung, die, insbesondere wenn sie zu stark wird, immer eine Gewebeneubildung hemmt.

Durch eine geeignete Porenstruktur im Nanometerbereich und eine große innere Oberfläche soll das injizierbare Knochenaufbaumaterial in der Lage sein, körpereigene (z. B. Knochenmarksflüssigkeit) oder körperfremde (z. B. synthetische Wachstumsfaktoren) osteoinduktive Komponenten aufzunehmen und zu binden. Hierdurch soll eine extreme Gewebefreundlichkeit, eine schnelle Resorption und damit eine schnelle Neubildung von Knochengewebe erreicht werden.

7.1 Herstellung poröser Mikropartikel durch Sprühtrocknung

Viele Produkte werden vorzugsweise als Feststoff verwendet. Dies vereinfacht die Lagerung und Dosierung oder ist für den Gebrauch unerlässlich. Die Sprühtrocknung (auch Zerstäubungstrocknung) ist eine Methode aus der Verfahrenstechnik zur Trocknung von Lösungen, Suspensionen oder pastösen Massen. Sie ist eine zeitsparende und schonende Methode, um auch kleine Mengen von Substanzen als Pulver zu gewinnen. Beim Sprühtrocknen werden die Suspensionen bzw. Lösungen in viele kleine Tröpfchen überführt. Das führt zur Oberflächenvergrößerung und folglich zu schnellerem Wärme- und Stofftransport zwischen Trägergas und Tropfen. Die geringe Tropfengröße begünstigt einen höheren Dampfdruck im

Inneren der Tropfen und setzt so die Siedetemperatur herab. Vorteile gegenüber der Gefriertrocknung sind der größere Durchsatz und die kurzen Prozesszeiten. Die geringen Verweilzeiten und der Kühleffekt durch die Verdampfung ermöglichen es, auch temperaturempfindliche Produkte schonend zu verarbeiten. Falls organische Lösungsmittel zum Einsatz kommen, wird die thermische Belastung auf ein Minimum reduziert.

In Abbildung 7.1 ist der apparative Aufbau und die Funktionsweise eines Sprühtrockners anhand des eingesetzten Mini-Sprühtrockners B-290 der Firma Büchi Labortechnik AG dargestellt. Das Sprühgut, eine Suspension aus nanokristallinem, plättchenförmigem Hydroxylapatit (HA) und SiO_2 -Sol in reinem Ethanol, wurde über eine Peristaltikpumpe in die Zweistoffsprühdüse (1) befördert und mithilfe von komprimiertem Stickstoff in viele kleine Tröpfchen zerkleinert. Die Zweistoffsprühdüse ist mit einer Kühlvorrichtung versehen, um störende, externe Temperatureffekte zu vermeiden. Ein Verstopfen der Düse wurde durch pneumatisch betriebenes Durchstechen der Düsenöffnung mit einer Reinigungsnadel vermieden. Diese Reinigungsvorrichtung wurde automatisch betrieben und gesteuert. Auf Grund des Kontaktes dieser Tröpfchen mit dem über einen Aspirator (6) angesaugten und einer Heizung (2) auf bis zu 200°C erwärmten Stickstoff gelang es, das Suspensionsmittel im Sprühzylinder (3) sehr schnell zu verdampfen und mit dem Kälteaggregat Inert Loop B-295 abzutrennen.

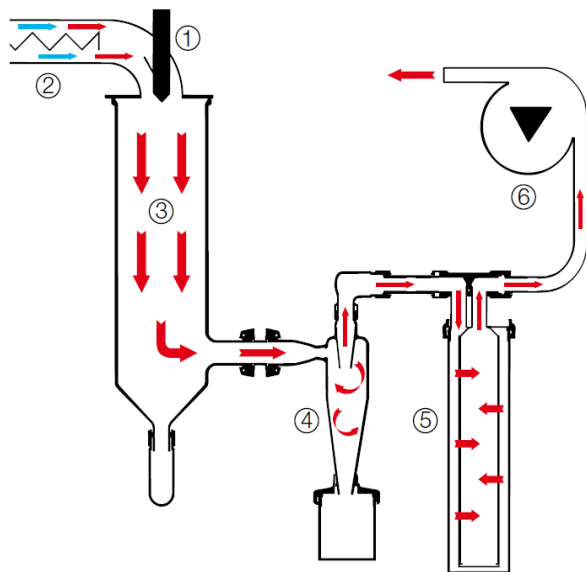


Abbildung 7.1: Schematischer Aufbau und Funktionsweise des Mini-Sprühtrockners B-290 (Büchi Labortechnik AG, Schweiz). Die Sprühsuspension wurde über eine Peristaltikpumpe in die Zweistoffsprühdüse (1) befördert und mithilfe von komprimiertem Stickstoff in viele kleine Tröpfchen zerkleinert. Auf Grund des Kontaktes dieser Tröpfchen mit dem über einen Aspirator (6) angesaugten und einer Heizung (2) auf bis zu 200°C erwärmten Stickstoff gelang es, das Suspensionsmittel im Sprühzylinder (3) sehr schnell zu verdampfen. Das trockene Pulver wurde über einen Zyklon (4) isoliert. Zur Abscheidung von Feinpartikeln diente der Ausgangsfilter (5). Die Abtrennung von leicht entzündlichem Suspensionsmittel wurde durch die Kombination mit dem Kälteaggregat Inert Loop B-295 ermöglicht.

Die Messgröße Inlet-Temperatur ist die Temperatur, die unmittelbar beim Eintritt der Tröpfchen in den Sprühzylinder gemessen wurde. Sie ließ sich entsprechend den Erfordernissen des zu versprühenden Gutes über ein Display verfolgen und wurde über die Leistung der Heizung auf bis zu 220°C reguliert. Unter Outlet-Temperatur versteht man die Temperatur, die das Sprühgut/Stickstoff-Gemisch nach Passieren des Sprühzylinders besitzt. Sie wurde durch geeignete Variation des Verhältnisses Sprühgut/Stickstoff bzw. der Förderleistung der Peristaltikpumpe gesteuert. Die Differenz zwischen Inlet- und Outlet-Temperatur sollte erfahrungsgemäß nicht kleiner als 80°C sein. Das trockene Pulver wurde über einen Zyklon (4) isoliert. Zur Abscheidung von Feinpartikeln diente der Ausgangsfilter (5).

Folgende Parameter ließen sich am Sprühtrockner einstellen: die Inlet-Temperatur, die Durchflussmenge an Stickstoff, die Förderleistung der Peristaltikpumpe und die Frequenz der automatischen Düsenreinigung.

Bis vor kurzem war das Sprühtrocknen mit leicht entzündlichen Lösungsmitteln aufgrund des Explosionsrisikos gesetzlich nicht erlaubt. Zahlreiche Applikationen und Anwendungsgebiete erfordern jedoch den Einsatz von organischen Lösungsmitteln. Speziell für diese Bereiche kommt das Kälteaggregat Inert loop B 295 zum Einsatz (Abbildung 7.2). Dieses Gerät ist zwischen Aspirator und Ausgangsfilter integriert. Durch die Kombination Mini-Sprühtrockner B-290/ Inert Loop B-295 wurde die Sprühtrocknung als geschlossener Kreislauf unter inerten Bedingungen betrieben. Die Abwesenheit von Sauerstoff verhindert, dass ein zündfähiges Gemisch entsteht. Der mit Suspensionsmittel beladene heiße Stickstoff wurde über einen Vorwärmetauscher (1) abgekühlt und das Suspensionsmittel (D) auf diese Weise durch Kondensation (2) mithilfe eines Kühlaggregats (3) zurückgewonnen.

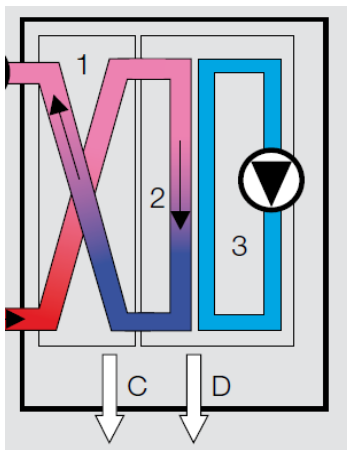


Abbildung 7.2: Schematischer Aufbau und Funktionsweise Inert-Loop B-295 (Büchi Labortechnik AG, Schweiz). Die Sprühtrocknung wurde mit der Kombination Mini Sprühtrockner B-290/ Inert Loop B-295 als geschlossener Kreislauf unter inerten Bedingungen betrieben. Die Abwesenheit von Sauerstoff verhindert, dass ein zündfähiges Gemisch entsteht. Der mit Suspensionsmittel beladene heiße Stickstoff wurde über einen Vorwärmetauscher (1) abgekühlt und das Suspensionsmittel (D) auf diese Weise durch Kondensation (2) mithilfe eines Kühlaggregats (3) zurückgewonnen. Der regenerierte Stickstoff wurde über den Vorwärmetauscher erwärmt und gelangte wieder zum Sprühtrockner. Ein Teil verließ als Abgas (C) den Kreislauf.

Der regenerierte Stickstoff wurde über den Vorwärmetauscher erwärmt und gelangte durch die Saugwirkung des Aspirators wieder zum Sprühtrockner. Ein Teil verließ als Abgas (C) den Kreislauf. Das Kälteaggregat Inert Loop B-295 ist als fahrbare Einheit montiert und wird über zwei Schläuche und ein Kommunikationskabel an den Mini-Sprühtrockner B-290 angeschlossen. Zwei Signallampen zeigen den Zustand der integrierten Sauerstoff- und Drucküberwachung an. Falls ein Fehlerzustand auftritt, führt die Anlage den Prozess automatisch in einen sicheren Zustand.

7.1.1 Herstellung einer alkoholischen Sprühsuspension

Vor Beginn der eigentlichen Herstellung einer sprühfertigen Suspension aus knochenmineral-ähnlichen Nanokristallen, SiO_2 -Sol und reinem Ethanol wurden zum einen wässriger HA-Schlicker in reinem Ethanol durch Austausch des Dispersionsmittels eingebracht und zum anderen ein SiO_2 -Sol durch den Sol-Gel-Prozess hergestellt. Die Abbildung 7.3 zeigt ein Flusschema, das die Herstellung einer sprühfertigen Suspension und die experimentellen Bedingungen erklärt.

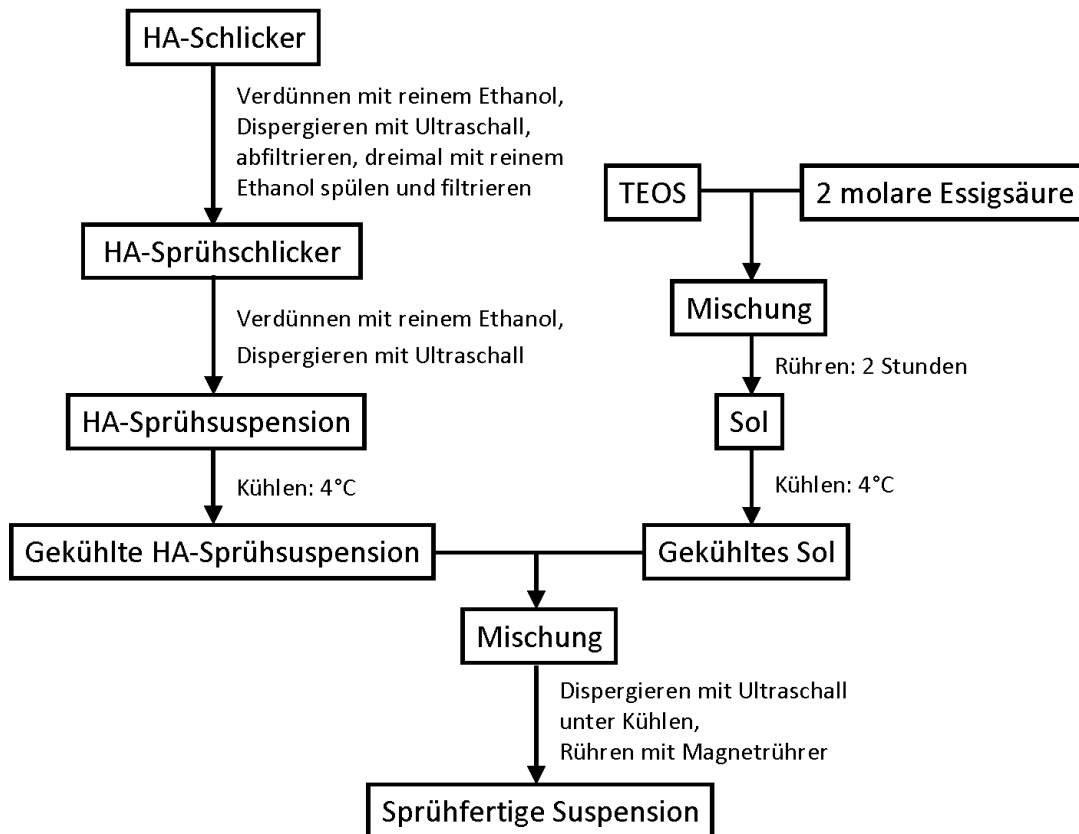


Abbildung 7.3: Flussschema der Prozedur zur Herstellung einer alkoholischen Sprühsuspension aus HA-Schlicker und SiO_2 -Sol.

Eingesetzt wurde wässriger HA-Schlicker, der nach der in Kapitel 5.2 beschriebenen Methode hergestellt wurde. Die folgenden Werte für die Fällungsparameter wurden festgelegt, um knochenmineralähnliche Nanokristalle zu erhalten:

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| • Temperatur der Fällungslösung | Raumtemperatur |
| • pH-Wert der Fällungslösung | 7.8 ± 0.1 |
| • Pumprate der Ausgangslösungen | $(5.0 \pm 0.1) \text{ l/h}$ |
| • Ultraschalleistung | $(33 \pm 1) \text{ W}$ |
| • Fällungszeit | 30 min |
| • Alterung | bis zu 3 Stunden |
| • Rührerdrehzahl (Alterung) | 100 U/min |

Zur Gewinnung von HA-Sprühschlicker wurde der wässrige HA-Schlicker in reinem Ethanol durch Ultraschallanwendung dispergiert und anschließend gefiltert. Dadurch erhält man beim Sprühtrocknen das Sprühgut schneller und mit mehr Umsatz. Ein weiterer Vorteil ist, dass HA in Ethanol weniger löslich ist, als in Wasser. Das Volumen an reinem Ethanol wurde in Abhängigkeit vom Wasseranteil des HA-Schlickers nach Gleichung (7.1) berechnet, um reproduzierbare Ausgangsbedingungen zu schaffen.

$$V = \frac{m}{82g} \cdot \left(1 - \frac{TR_{HA}}{100\%} \right) \cdot 450ml \quad (7.1)$$

- V zu berechnendes Volumen an reinem Ethanol
- m Masse vom HA-Schlicker
- TR_{HA} Trockenrückstand als der Anteil der Trockenmasse vom HA an der Masse vom HA-Schlicker

Nach insgesamt drei weiteren Spülvorgängen mit je 300 ml reinem Ethanol und anschließender Abfiltrierung wurde für die Sprühtrocknung geeigneter HA-Schlicker, sogenannter „HA-Sprühschlicker“ erhalten. Der Feststoffgehalt an HA wurde nach mehrstündiger Vakuumtrocknung durch Rückwiegen bestimmt.

Im nächsten Schritt wurde ein SiO_2 -Sol durch den Sol-Gel-Prozess (siehe Rktgl. 2.1 bis 2.2b in Kapitel 2.1.1) hergestellt. Das hier herzustellende SiO_2 -Sol wurde durch Essigsäure-katalysierte Hydrolyse des Silicium-Präkursors Tetraethylorthosilicat (TEOS) erzeugt. Dabei wurde ein molares Wasser/TEOS-Verhältnis (r_w -Wert) von 6.55 und ein molares Essigsäure/TEOS-Verhältnis (r_s -Wert) von 0.25 verwendet. Durch den Katalysator Essigsäure ließ sich die Hydrolyse beschleunigen. Mit steigendem r_s -Wert entstehen mehr Primärteilchen, damit mehr und kleinere Cluster. Dabei wird aber gleichzeitig auch mehr Wärme freigesetzt, die die Gelbildungsrate erhöht. Der hohe r_w -Wert diente dazu die Hydrolyse- gegenüber der Kondensationsrate zu steigern. Dadurch ließ sich die Gelbildung verlangsamen. Nach beendeter Hydrolyse wurde das SiO_2 -Sol auf ca. 4°C gekühlt und konstant gehalten, um den Zeitraum der Gelbildung weiter auszudehnen. Bei der gewählten Zusammensetzung waren die beschriebenen Reaktionen innerhalb von 2 Stunden weitestgehend abgeschlossen.

Zur Herstellung einer in reinem Ethanol verdünnten Suspension aus knochenmineralähnlichen Nanokristallen und SiO_2 -Sol wurde der HA-Sprühschlicker ausgewogen. Um eine sprühfertige Suspension mit einem HA-Massenanteil von 7% und einem SiO_2 -Massenanteil von 24% im Endprodukt herzustellen, wurde die Masse vom reinem Ethanol (m_2) nach Gleichung (7.2) berechnet und eingewogen:

$$m_2 = \left(\frac{TR_{HA}}{Y_1} - 1 - \frac{TR_{HA}}{TR_{SiO_2}} \cdot \frac{X_1}{(100\% - X_1)} \right) \cdot m_1 \quad (7.2)$$

- m_1 Masse vom HA-Sprühschlicker
- m_2 zu berechnende Masse an reinem Ethanol
- X_1 Massenanteil SiO_2 im Produkt, mit $X_1 = 24\%$
- Y_1 Massenanteil HA in der Sprühlösung, mit $Y_1 = 7\%$
- TR_{HA} Trockenrückstand als der Anteil der Trockenmasse vom HA an der Masse vom HA-Sprühschlicker
- TR_{SiO_2} Trockenrückstand als der Anteil der Trockenmasse vom SiO_2 an der Masse vom SiO_2 -Sol

Dem HA-Sprühschlicker wurde die berechnete Masse an reinem Ethanol zugefügt, durch Ultraschallanwendung dispergiert und die resultierende Suspension auf ca. 4°C in einem Temperierbecher durch ein Umwälzthermostat gekühlt.

Die Masse des gekühlten SiO_2 -Sols (m_3) wurde nach Gleichung (7.3) berechnet und eingewogen. Um Mikropartikel mit einer HA/ SiO_2 -Zusammensetzung von 76/24 Gewichts-% herzustellen, wurde der SiO_2 -Massenanteil im Produkt entsprechend auf 24 % festgelegt. Der nach einer Vakuumtrocknung und einer Temperaturbehandlung bis 700°C des SiO_2 -Gels bestimmte SiO_2 -Trockenrückstand betrug 17.8%.

$$m_3 = \frac{TR_{HA}}{TR_{\text{SiO}_2}} \cdot \frac{X_1}{(100\% - X_1)} \cdot m_1 \quad (7.3)$$

- m_3 zu berechnende Masse vom SiO_2 -Sol

Der gekühlten HA-Sprühsuspension wurde die berechnete Masse an gekühltem SiO_2 -Sol zugefügt und durch gepulste Ultraschallanwendung für 2 min in einem Zeitraum von 4 min dispergiert (2s Puls + 2s Pause). Der Temperierbecher wurde auf einen Magnetrührer gestellt und ein Magnetrührkörper zugegeben, um eine permanente Durchmischung der Suspension sicherzustellen. Nach einer Abkühlung der Suspension auf ca. 4°C wurde erneut durch gepulste Ultraschallanwendung für 2 min in einem Zeitraum von 2 min und 24s dispergiert (5s Puls + 1s Pause). Nach Abkühlung auf 19°C wurden Inhomogenitäten aus der Suspension durch Filtern mit einem Edelstahlsieb der Maschenweite $80\ \mu\text{m}$ entfernt. Die sprühfertige Suspension wurde in die 500 ml-Weithalsflasche der Masse m_4 überführt und diese dann nach dem Auswiegen der Suspension der Masse $m_{\text{SL},1}$ in den Temperierbecher gestellt.

7.1.2 Sprühtrocknung

Zur Sprühtrocknung wird eine außenmischende Zweistoffdüse verwendet. Diese besteht aus einer Düsen Spitze mit Loch- \varnothing 2.0mm, einer Düsenkappe mit Loch- \varnothing 2.8mm und der dazugehörigen Düsenreinigungsnadel. Die Düsenkappe wurde nicht fest an die Düse angeschraubt, sondern auf eine viertel Umdrehung bis vor Anschlag. Diese Einstellung entspricht einem Düsenkappenöffnungswinkel α von 90° . Das Thermostat und die Zweistoffdüse wurden durch Schläuche verbunden. Am Thermostat wurden -2.0°C eingestellt und die Thermostatpumpe angeschaltet. Der Mini-Sprühtrockner B-290 wurde im Saugmodus angeschaltet und das Flaschenventil der Stickstoffflasche aufgedreht. Am Druckminderer wurde ein Arbeitsdruck von 7 bar eingestellt und das Ausgangsventil aufgedreht. Das Pumpenbett der Peristaltikpumpe wurde justiert, um den Silikonschlauch nahezu vollständig abzuklemmen.

Einstellungen der Geräteparameter am Mini-Sprühtrockner B-290:

Rotameter (Gasdurchfluss)	=	25 mm
Aspiratorleistung	=	100 %
Eingangstemperatur T_{inlet}	=	200 °C
Pumprate	=	30 %
Düsenreinigung	=	0
Umschaltventil	=	1
B-295-Kühltemperatur	=	14 °C

Nach dem Einschalten des Aspirators fand eine Prüfung der Dichtverbindungen statt. Sobald der Sauerstoffanteil unter 6 % fiel, konnte die Heizung angeschaltet werden. Wenn T_{inlet} etwa 180 °C erreicht hatte, wurde die Peristaltikpumpe angeschaltet. Zunächst wurde reiner Ethanol versprüht. Schläuche und Düse wurden auf Verstopfungen hin geprüft. Reiner Ethanol (EtOH) wurde über eine Zeitdauer von (15 ± 2) min bei $T_{\text{inlet}} = (200 \pm 3)$ °C versprüht. Über beide Silikonschläuche, die in eine mit EtOH befüllten 500 ml-Weithalsflasche münden, wurde abwechselnd über Betätigung vom Umschaltventil EtOH versprüht.

Die Sprühtrocknung der sprühfertigen Suspension begann, als sich die Temperatur der Suspension bei (20.0 ± 1.0) °C, T_{inlet} bei (200 ± 3) °C und die Ausgangstemperatur T_{outlet} bei (140 ± 10) °C Soll-Temperatur befand. Das Umschaltventil wurde auf Einstellung 1 umgestellt und der Silikonschlauch aus dem Umschaltventil genommen. Daraufhin begann die eigentliche Sprühtrocknung der sprühfertigen Suspension. Bei Verkrustungen der Düsenöffnung wurde die Düsenreinigung manuell betätigt. Nach dem Sprühtrocknen wurde der Rest der Suspension der Masse $m_{\text{SL},2}$ zurückgewogen.

Die Produktausbeute kann nach Gleichung (7.4) berechnet werden.

$$PA = \frac{m(P)}{m_1} \cdot \frac{(100\% - X_1)}{TR_{HA}} \cdot \frac{(m_1 + m_2 + m_3)}{m_{\text{SL},1} - m_{\text{SL},2}} \cdot 100\% \quad (7.4)$$

- PA zu berechnende Produktausbeute
- $m(P)$ Masse vom sprühgetrocknetem Produkt
- m_1 Masse vom HA-Sprühschlicker
- m_2 Masse vom reinem Ethanol
- m_3 Masse vom SiO_2 -Sol
- $m_{\text{SL},1}$ Masse der Sprühsuspension vor der Sprühtrocknung
- $m_{\text{SL},2}$ Masse der Sprühsuspension nach der Sprühtrocknung
- X_1 Massenanteil SiO_2 im Produkt, mit $X_1 = 24\%$
- TR_{HA} Trockenrückstand als der Anteil der Trockenmasse vom HA an der Masse vom HA-Sprühschlicker

7.2 Partikelcharakterisierung

7.2.1 Makro- bis Nanostruktur

Mithilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte sichtbar gemacht werden, dass das weiße pulverförmige Biomaterial überwiegend aus „Donut“-förmigen Mikropartikeln und einseitig eingefallenen, sphärischen Mikropartikeln besteht (Abbildung 7.4a, b). Von der REM-Aufnahme aus Abbildung 7.4a mit einer Größe von $175\mu\text{m} \times 175\mu\text{m}$ wurde durch Anwendung der 2D-Bildanalyse-Software MeX (Alicona Imaging GmbH, Graz, Österreich) die Größenverteilung der Mikropartikel bestimmt. Dabei wurden die Anzahl der Mikropartikel und deren Radius nach vorheriger, manueller Markierung automatisch durch MeX erfasst. Die Partikelgrößenverteilung wurde durch Auftragen der relativen Häufigkeit der Mikropartikel gegen den Partikeldurchmesser erhalten. Mikropartikel mit einem Partikeldurchmesser zwischen $2\mu\text{m}$ und $5\mu\text{m}$ treten in der Anzahl am häufigsten auf (Abbildung 7.4c). Diese Partikelgröße war notwendig, um den Abbau durch Phagozytose vorzubeugen.

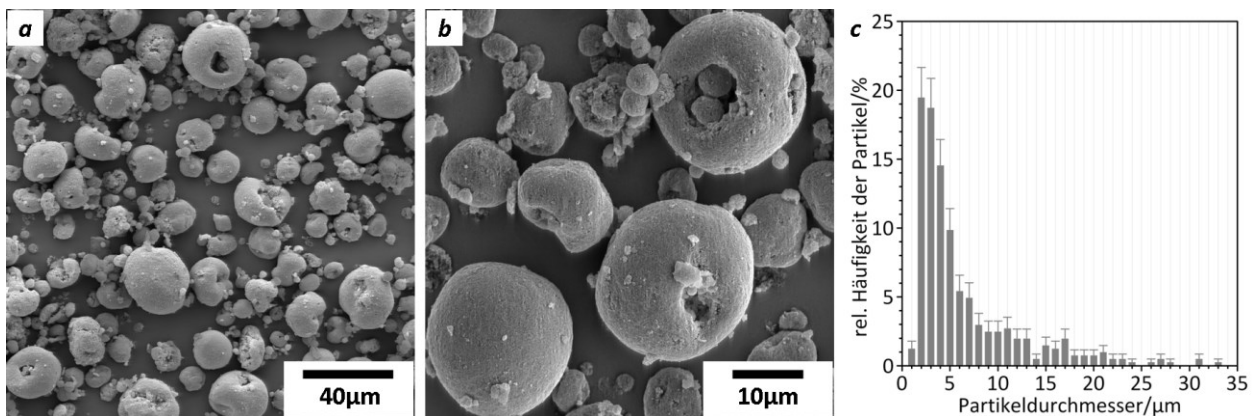


Abbildung 7.4: (a, b) REM-Aufnahmen sprühgetrockneter Mikropartikel, (c) Quantitative Analyse der Größenverteilung der Mikropartikel aus Abbildung 7.4a ($n=406$).

In Abbildung 7.5 sind TEM-Aufnahmen eines dünnen Querschnitts nahe der Oberfläche eines in Araldit® eingebetteten Mikropartikels, der mithilfe von TEM (Abbildung 7.5a), Dunkelfeld-STEM (Abbildung 7.5b) und STEM-SE (Abbildung 7.5c) untersucht wurde, dargestellt.

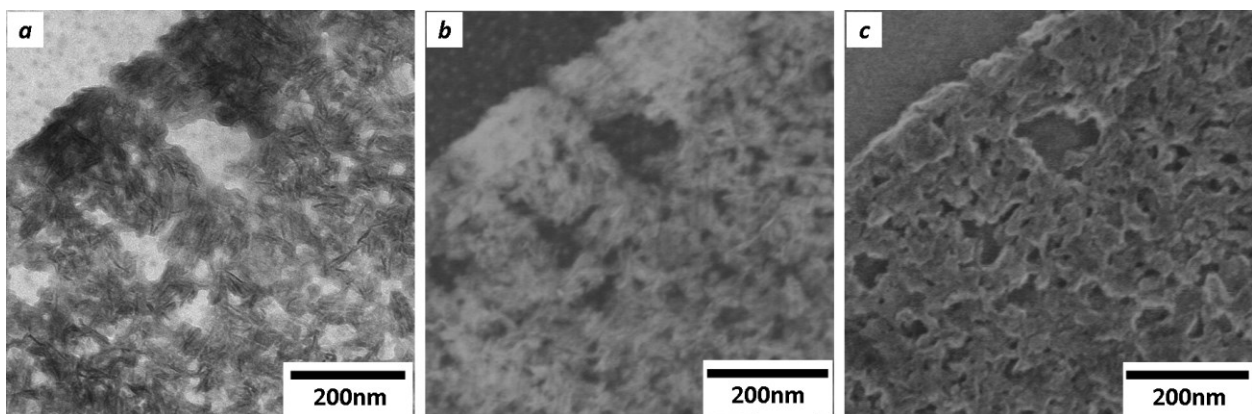


Abbildung 7.5: TEM-Aufnahmen eines dünnen Querschnitts (40nm) nahe der Oberfläche eines Mikropartikels mittels TEM (a), STEM-DF (b) und STEM-SE(c).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen den nanostrukturierten Aufbau der Mikropartikel. Das Einbettmaterial wurde durch Temperaturbehandlung bis 180°C entfernt, da sich Einbettmaterial und SiO₂-Gelmatrix nicht unterscheiden lassen. Die dunklen, plättchenförmigen Objekte sind dünne HA-Kristallite, die in der Bildebene liegen. Die fast schwarzen, nadelförmigen Objekte sind HA-Plättchen, die sich in Längsseitenlage senkrecht zur Bildebene befinden. In dieser Orientierung ist die geringe Dicke der HA-Plättchen ersichtlich, die in guter Näherung der Kristallitdicke von biologischem Apatit im humanen Knochen entspricht. Die HA-Plättchen sind von einer porösen Kieselgelmatrix ummantelt (Abbildung 7.5a). Ein Dunkelfeld-STEM-Bild derselben Region ist in Abbildung 7.5b dargestellt. Es gibt das komplementäre Bild zur Abbildung 7.5a wieder. Die Position der HA-Plättchen (helle Objekte) ist aufgrund der stärkeren Streuung von HA im Vergleich zum Kieselgel stärker ausgeprägt. Ein STEM-SE-Bild derselben Region zeigt die nanoporöse Struktur der Silicagelmatrix. Es sind miteinander verbundene Poren, mit einem Durchmesser im Bereich von 10 nm bis 100 nm, sichtbar (Abbildung 7.5c).

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen, dass die Mikropartikel nach außen durch eine Kruste oder Hülle umgeben sind. Diese ist kompakter bzw. zeigt eine größere Packungsdichte, als die darunterliegende Region. Dieses Resultat ist im Einklang mit dem Mechanismus der Sprühagglomeration, bei der sich durch schnelles Trocknen der Primärtropfen eine feste äußere Hülle bildet (Abbildung 7.6).

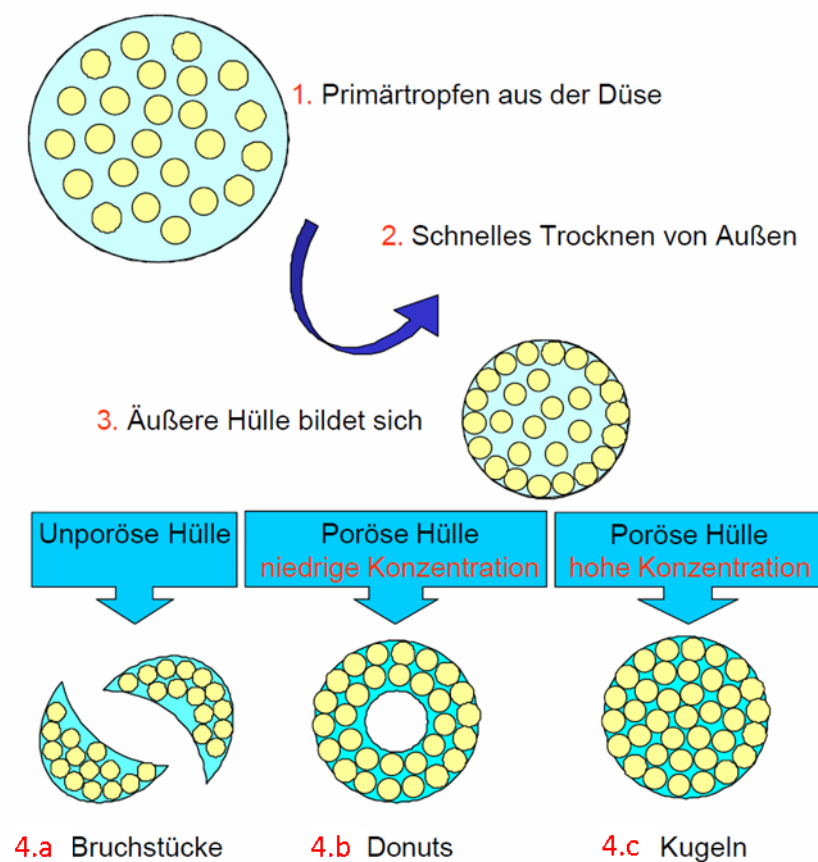


Abbildung 7.6: Mechanismus der Sprühagglomeration (Abbildung entnommen aus [Hoh02]).

Eine Schüttdichte von $(0.26 \pm 0.05) \text{g/cm}^3$, eine spezifische Oberfläche von $168 \text{m}^2/\text{g}$ und eine Porosität von ca. 81% (Tabelle 7.1) im Nanometerbereich kennzeichnen die NBS24-Mikropartikel mit einem Massenanteil von 24% SiO_2 als ein hochporöses Material.

Tabelle 7.1: Werte zur spezifischen Oberfläche und Porosität von NB und Produktvarianten von NBS.

Biomaterial	Quecksilberporosimetrie				BET	
	Spezifische Oberfläche in m^2/g	Mittlerer Porendurchmesser in nm	Totales kumulatives Volumen in cm^3/g	Totale Porosität in %	Spezifische Oberfläche in m^2/g	Porenspezifisches Volumen in cm^3/g
NB (NanoBone®)	81.77	34.6	0.54	51.5	85.10	0.20
NBS24	59.18	14.9	0.20	31.3	152.33	0.19
NBS39	54.61	16.0	0.18	21.8	206.83	0.20
NBS24 μ -Partikel	192.87	4046.5	3.16	81.4	168.27	0.97

Die Mikropartikel (μ -Partikel) sind durch ein System interkonnektierender Mesoporen gekennzeichnet (Definition: Mikroporen (< 2 nm), Mesoporen (2 nm bis 50 nm) und Makroporen (>50 nm)). Die Mehrzahl der Poren haben Durchmesser im Bereich von 10 nm bis 50 nm (Abbildung 7.7a). Die Abbildung 7.7b zeigt eine TEM-Aufnahme eines in Araldit® eingebetteten Mikropartikels als Ultradünnschnitt. Deutlich ist ein Hohlraum im Inneren des Mikropartikels erkennbar.

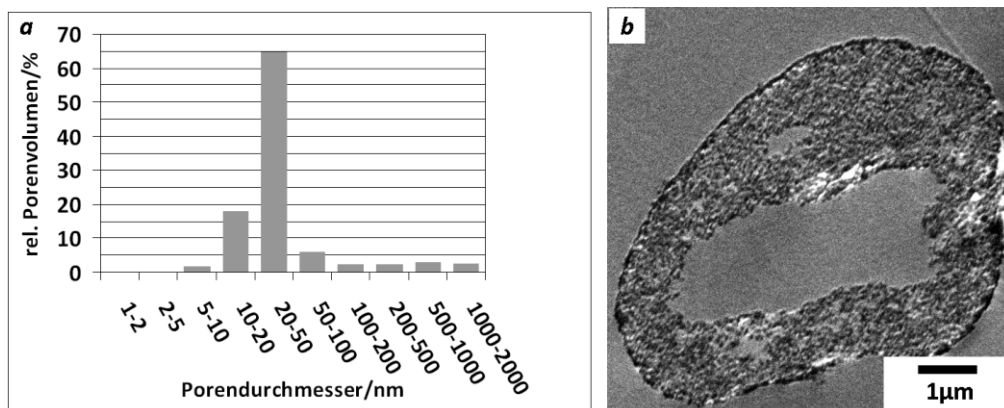


Abbildung 7.7: (a) Porengrößenverteilung der NBS24-Mikropartikel. (b) TEM-Aufnahme eines in Araldit® eingebetteten Mikropartikels als Ultradünnschnitt.

Durch die Porenstruktur ist das entwickelte Material hervorragend geeignet, körpereigene (z. B. Knochenmarksflüssigkeit, endogene BMPs) oder körperfremde (z. B. synthetische BMPs) osteoinduktive Komponenten aufzunehmen (knochenmorphogenetische Proteine (englisch bone morphogenetic proteins, BMPs)). Hierdurch wird eine extreme Gewebefreundlichkeit und damit ein schnelles Einwachsen von Knochengewebe erreicht. Die große innere Oberfläche der Mikropartikel ermöglicht es, körpereigene oder synthetische Wachstumsfaktoren (z. B. BMPs) zu binden.

7.2.2 Struktur nach Temperaturbehandlung

Für die *in vivo* Untersuchungen wurden die organischen Bestandteile des injizierbaren Knochenaufbaumaterials durch anschließende Temperaturbehandlung bis 700°C in einem Rohröfen entfernt, um eine toxische Wirkung zu vermeiden. In Abbildung 7.8 ist die XRD-Kurve von NBS24-Mikropartikeln dargestellt. Es ist keine Änderung der Kristallstruktur durch die Temperaturbehandlung festzustellen. Es scheint, als ob wegen der Ummantelung der HA-Nanokristalle durch die SiO₂-Gelmatrix sowohl eine Phasenumwandlung zu β -TCP als auch eine Zunahme der Größe der HA-Kristallite bis 700°C verhindert wird. Die dazu notwendigen Platzwechselvorgänge der Ionen finden bis 700°C nicht statt, da die dafür notwendige Aktivierungsenergie nicht erreicht wurde. Sobald diese Temperatur um etwa 10°C bis 15°C überschritten wird, tritt eine Phasenumwandlung zu β -TCP auf [Rad10]. Die Integralbreite der Reflexe des Biomaterials ist identisch mit der des biologischen Hydroxylapatits im humanen Knochen, was auf eine gleichartige Morphologie und Größe der Kristallite hindeutet. Wird stattdessen der bei pH-Wert 7.8 gefällte HA bis 700°C behandelt, so zeigt sich als Resultat der röntgendiffraktometrischen Untersuchung, dass sich das temperaturbehandelte Material in eine Mischung aus β -TCP und HA umwandelt, die als biphasisches Calciumphosphat (BCP) bezeichnet wird und in der Abbildung 5.27 im Kapitel 5.4.2 gezeigt wurde.

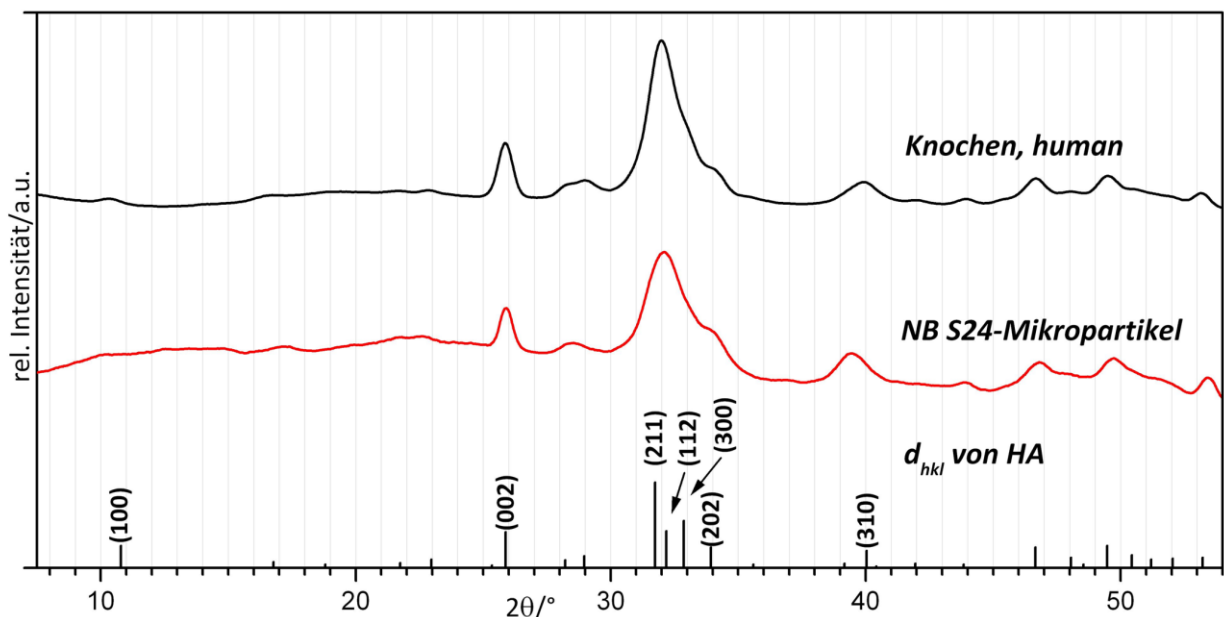


Abbildung 7.8: Röntgenbeugungskurven vom Biomaterial und humanen Knochen. Zur Phasenbestimmung sind einige d_{hkl} mit zugeordneten Millerschen Indizes von stöchiometrischem HA angegeben, die aus dem A.S.T.M. card file No. 9-432 entnommen wurden.

7.2.3 Chemische Zusammensetzung

In Abbildung 7.9 zeigt die Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einen Schnitt durch einen hohlen Mikropartikel. Mit EDX wurde die elementare Zusammensetzung entlang der grün eingezeichneten Pfade bestimmt. In der Abbildung sind die Konzentrationsprofile von Calcium, Silicium und Phosphor entlang zweier Pfade L1 und L2 dargestellt. Kohlenstoff repräsentiert die Kunststoffeinbettung, die für die Messungen notwendig war.

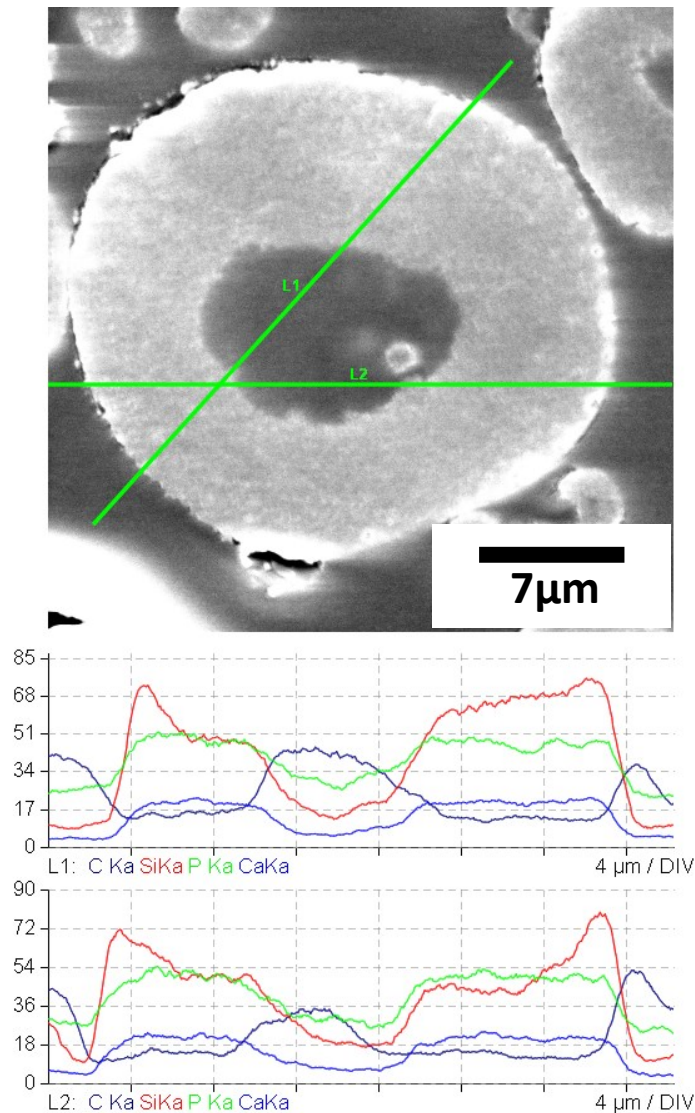


Abbildung 7.9: Rasterelektronenmikroskopische Abbildung eines hohlen Mikropartikels und die über EDX ermittelte chemische Zusammensetzung. Die Mikropartikel wurden in Araldit® eingebettet und mit einem Ultramikrotom Leica EM UC6 eine Aufschnittfläche vom Kunststoffblock erzeugt.

Die chemische Zusammensetzung der Mikropartikel zeigt, dass sie nach außen durch eine Kruste oder Hülle umgeben sind, die anteilig mehr SiO_2 enthält (rote Kurven in Abbildung 7.9), als die darunterliegende Region. Die Verteilung der Elemente gibt Aufschluss über den Trocknungsprozess, der in Sekundenschnelle erfolgt.

7.3 Experimente *in vivo*

Die *in vivo* Untersuchungen der Mikropartikel zur Biokompatibilität, deren Charakterisierung während des *Remodeling*-Prozesses und der Degradationsprozess erfolgte im Versuchsmodell Ratte. Männliche Wistar-Ratten (Körpergewicht 350g bis 450g, Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) wurden für die Experimente verwendet. Während des Versuchs wurden die Tiere unter Bereitstellung von Standardlaborfutter für Nager und Wasser ad libitum in Einzelkäfigen gehalten. Die Ratten wurden mit intraperitonealer Injektion einer 6%igen Natrium-Pentobarbitallösung (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) mit einer Dosis von 60 mg/kg anästhesiert. Die betäubten Tiere wurden in Rückenlage auf einer beheizten Unterlage zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur (36°C bis 37°C) positioniert. Nach der Rasur der Hinterläufe eines Tieres und dessen Desinfektion wurde ein 2 cm langer Hautschnitt am oberen Bereich des Schienbeins zum Freilegen der Tibia gemacht. In den proximalen Tibiaschaft wurde ein im Durchmesser 3.5mm großer monokortikaler Defekt mit einem Dentalbohrer (SU 100, BEGO, Bremen, Deutschland) unter ständiger Kühlung mit 0.9%iger NaCl-Lösung gefräst. Ein Gemisch aus Mikropartikeln und autologem Blut wurde in den Defektbereich implantiert. Die Wunden wurden mit resorbierbaren Fäden verschlossen (Marlin, Markneukirchen, Germany). Nach Versuchszeiträumen von 3, 6, 9, 12, 21, 42 und 63 Tagen (n=7 pro Zeitpunkt) erfolgte die Probenahme und die anschließende histologische Aufarbeitung der zu untersuchenden Tibia-Bereiche, die in Kapitel 3.6 beschrieben wurde.

7.3.1 Histomorphometrische Analyse

Während des gesamten Versuchszeitraumes traten keine postoperativen Komplikationen auf. Werden histologische Schnitte nach 3 Tagen ausgewertet (Abbildung 7.10a), sind Mikropartikel erkennbar, die von einem Hämatom eingeschlossen worden sind. Des Weiteren ist eine beginnende Vaskularisierung im Defektbereich zu erkennen. Der natürliche Heilungsprozess setzt ein, das Hämatom wird in den nachfolgenden Tagen abgebaut und die Knochenneubildung beginnt. Die Mikropartikel werden durch vorhandenes Bindegewebe eingeschlossen und bilden somit einen lockeren Verbund. Nach ca. 9 Tagen postoperativ (Abbildung 7.10e) können eine beginnende Knochenneubildung sowie einige mehrkernige Riesenzellen beobachtet werden. Das Hämatom ist nach 12 Tagen vollständig abgebaut. Osteoblastensäume sind auf der Oberfläche des neugebildeten Geflechtknochens nachzuweisen, wobei bereits einige Osteoblasten als Osteozyten in den Knochen eingebaut vorliegen (Abbildung 7.10f). Anhand der Schnitte können histologische Beurteilungen zum Versuchsverlauf vorgenommen werden.

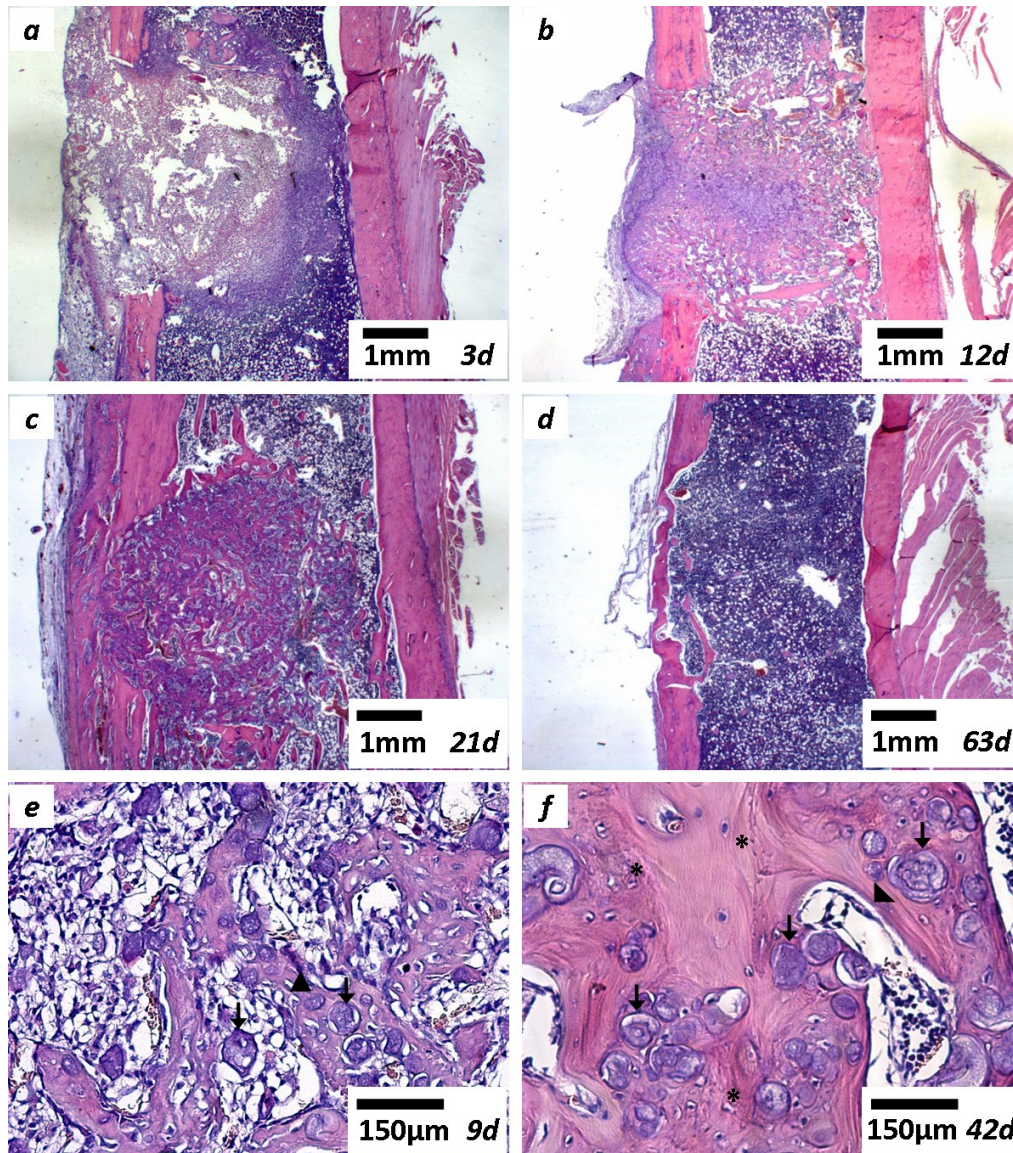


Abbildung 7.10: Aufnahmen von HE-gefärbten Proben vom Tibiadeфекt der Ratten. Die Pfeile in den Aufnahmen (e) und (f) markieren die implantierten Mikropartikel. Die Aufnahmen (a-d) zeigen histologische Veränderungen während des Versuchszeitraumes. Die Sternchen markieren den neu gebildeten Geflecht- (e) und Lamellenknochen (f). Einige mehrkernige Riesenzellen (Pfeilkopf in Aufnahme (e)) und eine Schicht aus Osteoblasten im Markraum (Pfeilkopf in Aufnahme (f)), die das Knochenaufbaumaterial und den neu gebildeten Knochen umgeben, wurden im Versuchszeitraum 9 bis 42 Tage postoperativ gefunden.

Im Bereich der Kortikalis wurde von Tag 12 an bis zum Versuchsabschluss eine fortschreitende Bildung von neuem Knochen gefunden. Dagegen wurde im Markraum anfangs neugebildeter Knochen ab Tag 21 wieder abgebaut. Dies ist mit dem Implantationsort zu erklären. Da es sich bei dem Tibia-Knochen um einen Röhrenknochen handelt, wird im inneren Bereich kein Knochen benötigt. Die Belastung liegt auf der Kortikalis, somit erfolgt der Abbau des gebildeten Knochens im Markraum (Abbildung 7.11a).

Eine histomorphometrische Auswertung erfolgte unter zwei Gesichtspunkten. Zum einem wurde der Flächenanteil des neugebildeten Knochens als Prozentsatz an der Gesamtfläche des kortikalen Wundbereiches sowie des Markraumes 12, 21, 42 und 63 Tage postoperativ bestimmt. Der Flächenanteil des neugebildeten Knochens im Markraum beträgt $27.8\% \pm 1.3\%$

am Tag 12, der auf $43.6\% \pm 2.4\%$ am Tag 21 ansteigt und schrittweise auf $5.7\% \pm 1.4\%$ am Tag 63 absinkt (Abbildung 7.11a). Umgekehrt steigt der Flächenanteil des neugebildeten Knochens in der Kortikalis von $32.0\% \pm 3.3\%$ am Tag 12 und auf $67.8\% \pm 2.1\%$ am Tag 63 an.

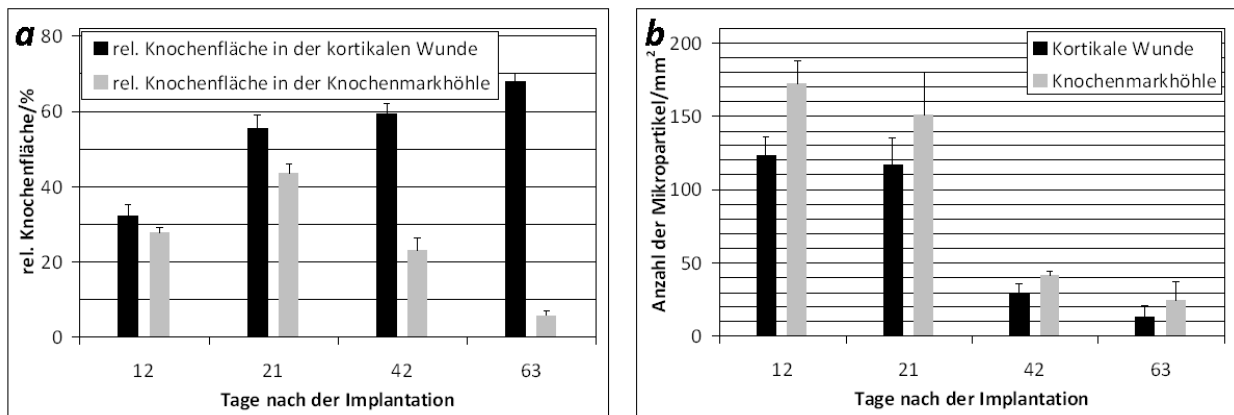


Abbildung 7.11: Quantitative Bestimmung des Anteils an neu gebildetem Knochen im Bereich der Kortikales und des Markraums (a). Abbau der Mikropartikel in den genannten Bereichen (b).

Zum anderen wurde die Anzahl noch vorhandener Mikropartikel pro mm² für den kortikalen Wundbereich sowie den Markraum im Versuchszeitraum 12 bis 63 Tage postoperativ bestimmt (Abbildung 7.11b). Die Anzahl noch vorhandener Mikropartikel pro mm² beträgt 12 Tage postoperativ ~172 im Markraum und ~123 in der Kortikalis. Deutlich erkennbar nimmt die Anzahl der Mikropartikel mit fortschreitender Zeit ab. Der Abbau erfolgt über Osteoklasten [Xu11]. Es wird ein Rückgang der Anzahl noch vorhandener Mikropartikel pro mm² nach 63 Tagen postoperativ auf ~24 im Markraum und ~13 in der Kortikalis festgestellt. Neu gebildeter Knochen und Biomaterial im Markraum sind am 63. Tag fast vollständig resorbiert. Der Abbau des Knochenersatzmaterials sowie des Knochens im inneren Bereich des Röhrenknochens weisen darauf hin, dass ein *Remodeling*-Prozess in ausreichendem Maße stattgefunden hat.

7.3.2 *Ex vivo* Analyse

Des Weiteren wurde eine *ex vivo* Charakterisierung der implantierten Mikropartikel durchgeführt. Am Tag 9 postoperativ wurden Gewebeproben entnommen und für die Untersuchung mittels REM durch Kritisch-Punkt-Trocknung in einem K850 Critical Point Dryer (Quorum Technologies Ltd, East Grinstead, UK) vorbereitet. Um qualitative Änderungen der Elementkonzentrationen zu bewerten, wurde die chemische Zusammensetzung des hergestellten Materials zum einen vor und zum anderen nach der Implantation mit EDX untersucht.

In Abbildung 7.12 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen explantierter Mikropartikel dargestellt. Nach 9 Tagen sind Ablagerungen einer organischen Matrix auf der Oberfläche der Mikropartikel zu sehen. Die Mikropartikel behalten *in vivo* ihre äußere Form.

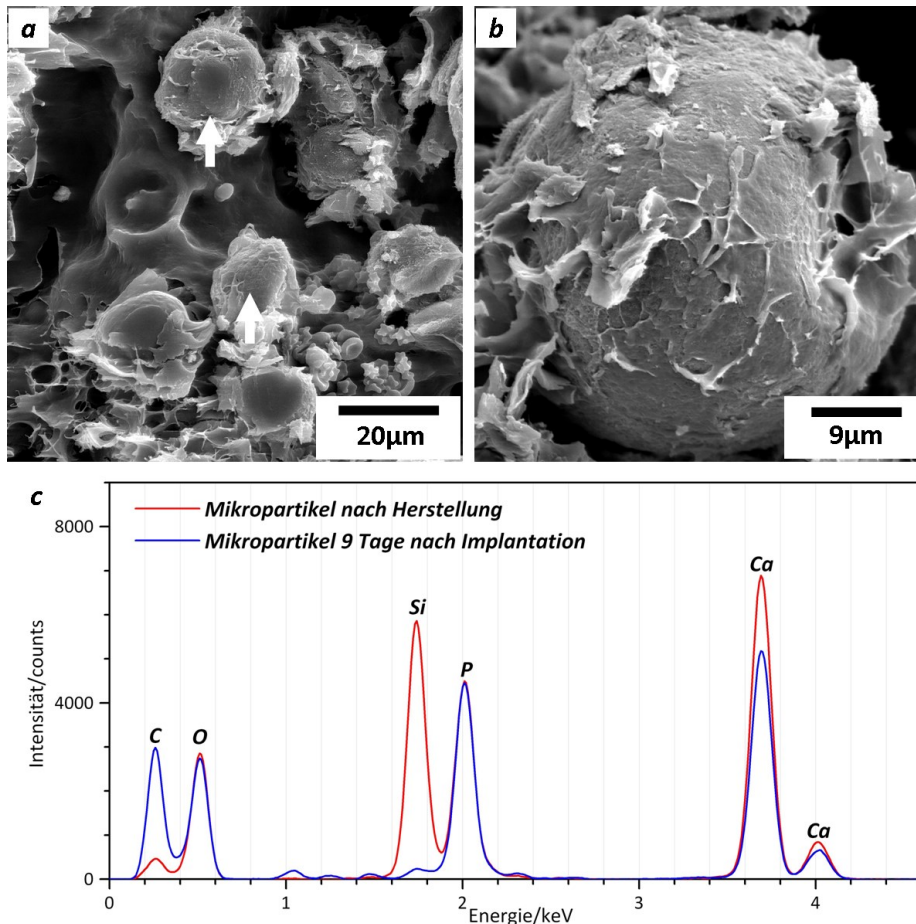


Abbildung 7.12: (a, b) Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Mikropartikel *ex vivo* (9 Tage postoperativ). Weiße Pfeile deuten auf Mikropartikel. (c) EDX-Analyse zur Bestimmung der Zusammensetzung ($n=3$).

Des Weiteren belegen EDX-Analysen einen Austausch der SiO_2 -Gelmatrix der Mikropartikel durch eine organische Matrix, bestehend aus autologen Proteinen (Abbildung 7.12c). Die rote Kurve zeigt die Zusammensetzung des Biomaterials direkt nach der Herstellung. Sowohl die Bestandteile vom HA (Ca und P) als auch vom Kieselgel (Si) sind nachweisbar. Die blaue Kurve zeigt die Veränderung der chemischen Zusammensetzung des Biomaterials 9 Tage nach der Implantation in den Tibia-Knochen. Die Si-Konzentration ist *in vivo* wesentlich verringert worden. Nahezu das gesamte Siliciumdioxid wurde durch organisches Material ersetzt. Die frühzeitig beginnende Knochenneubildung (nachweisbar bereits nach 9 Tagen) kann auf die osteoinduktiven Eigenschaften der Mikropartikel zurückgeführt werden.

Die Ergebnisse zur Entwicklung und Charakterisierung des neuen, injizierbaren Biomaterials – NanoBone®S24-Mikropartikel wurden im Jahr 2011 in der Zeitschrift "International Journal of Nanomedicine" erfolgreich publiziert [Xu11].

Kapitel 8

Zusammenfassung

Die Untersuchung einiger kommerziell erhältlicher Hydroxylapatit-Materialien hinsichtlich kristalliner Struktur und Morphologie der Kristallite zeigt, dass Unterschiede zu Bioapatitkristalliten im humanen Knochen bestehen. Nanokristalliner Hydroxylapatit mit einer den Bioapatitkristalliten im humanen Knochen identischen kristallinen Struktur und Morphologie ist derzeit nicht auf dem Markt verfügbar. Ziel war es daher, ein möglichst einfaches und kostengünstiges Verfahren zu entwickeln, mit dem nanokristalliner Hydroxylapatit mit den zuvor genannten Eigenschaften in ausreichender Menge reproduzierbar hergestellt werden kann, um diesen als Ausgangsmaterial für die Weiterentwicklung von auf dem Markt etabliertem Biomaterial anzuwenden. Diese Herangehensweise bietet den Vorteil einer vom Markt unabhängigen Herstellung.

Als Problemlösung wurde im Rahmen dieser Promotion ein nasschemisches Fällungsverfahren für die Synthese von nanokristallinem Hydroxylapatit mit kontrollierter Morphologie entwickelt, das durch besonders milde Synthesebedingungen (Raumtemperatur, Normaldruck, Reinraumluft) gekennzeichnet ist und somit eine einfache Handhabung ermöglicht. Für den Fällungsprozess in wässrigem Medium wurden unter Verwendung von deionisiertem Wasser eine calcium- und eine phosphathaltige Lösung in separaten Rührgefäßen vorgelegt. Das Verhältnis der Stoffmengenkonzentrationen der Ausgangslösungen wurde so eingestellt, wie es formal dem molarem Calcium/Phosphor-Verhältnis von stöchiometrischem Hydroxylapatit (5:3) entsprach. Durch die Zugabe einer kontrollierten Menge von 25%igem Ammoniakwasser zur phosphathaltigen Lösung erfolgte die Einstellung des Fällungs-pH-Wertes vor der Durchführung einer Fällung, so dass der gewünschte pH-Wert bei der Mischung der Salzlösungen erreicht wurde. Die so präparierten Lösungen wurden mit einer vorgegebenen Pumprate in eine Durchflusmischzelle befördert. Dort fand die Fällungsreaktion unter kontrolliertem Eintrag von Ultraschallwellen statt. Die Kontrolle der Syntheseparameter Pumprate, Ultraschallleistung, Alterung, Fällungs-pH-Wert und eine durch die Durchflusmischzelle definierte räumliche Eingrenzung der Fällungsreaktion ist wichtig, um stabile Fällungsbedingungen und eine reproduzierbare Produktqualität zu erreichen. Es wird eine Ausbeute von etwa 10g bis 11g Trockenmaterial pro Liter Fällungslösung erzielt.

Die Untersuchung der Abhängigkeit der Kristallstruktur und Kristallmorphologie von den Syntheseparametern Alterung, Fällungs-pH-Wert, Pumprate und Ultraschallleistung ergab, dass den beiden erst genannten Parametern eine entscheidende Rolle zukam.

Bei pH-Wert 7.0 entstehen nach 8 min Alterung plättchenförmige Hydroxylapatitkristallite und zu geringem Anteil deutlich größere, plättchenförmige Kristallite, die Octacalciumphosphat zuzuordnen sind. Oberhalb von pH-Wert 7.3 entstehen unter den gleichen Bedingungen

miteinander verwachsene, sphärische Nanopartikel aus amorphem Calciumphosphat, die sich mit fortschreitender Alterung zu plättchenförmigen Hydroxylapatit-Nanokristallen umwandeln. Der Umwandlungsprozess startete hierbei an der Oberfläche der Nanopartikel. Hierbei zeigen sich ebene Flächen an der Partikeloberfläche, die stumpfwinklig aufeinandertreffen. Diese Flächen sind durch Bereiche mit einer kristallinen Struktur gekennzeichnet, die der von Hydroxylapatit mit einer längs der kristallographischen c-Achse bevorzugten Wachstumsrichtung (anisotropes Kristallwachstum) entspricht. Mit zunehmendem pH-Wert nimmt die Existenzdauer von amorphem Calciumphosphat stetig zu. Bei pH-Wert 7.8 ist eine Alterung von 60 min bis max. 3 h einzuhalten, um Hydroxylapatit-Nanokristalle mit plättchenförmiger Morphologie durch Umwandlung von amorphem Calciumphosphat herzustellen. Die kristalline Struktur und Morphologie der hergestellten Hydroxylapatitkristallite ist von der von Bioapatitkristalliten im humanen Knochen nicht zu unterscheiden, was auf eine identische Kristallitdicke zurückzuführen ist. Bei pH-Wert 9.0 ist eine Alterung von 6 bis max. 24 h einzuhalten. Es ist eine Zunahme der Kristallitdicke der Plättchen festzustellen, die sich bei pH-Wert 12.6 weiter fortsetzt und zu einer Änderung der Kristallmorphologie von Plättchen hin zu Stäbchen führt.

Pumprate und Ultraschalleistung wirken sich in geringerem Maße auf die Kristalleigenschaften aus. Eine Erhöhung der Pumprate bewirkt eine leichte Verzögerung der Umwandlung von amorphem Calciumphosphat zu nanokristallinem Hydroxylapatit, was durch eine verringerte Verweilzeit der Fällungslösung in der Durchflussmischzelle zu erklären ist. Die Dicke der Hydroxylapatitkristallite bleibt für pH-Werte im Bereich von 7.0 bis 7.8 konstant. Oberhalb von pH-Wert 7.0 nimmt die Plättchenbreite leicht ab und die Länge der Hydroxylapatitkristallite bleibt für die pH-Werte im genannten Bereich konstant. Eine Erhöhung der Ultraschalleistung bewirkt eine geringe Zunahme der Umwandlungsrate von amorphem Calciumphosphat zu nanokristallinem Hydroxylapatit und eine leichte Zunahme der Kristallitdicke. Es ist eine geringe Abnahme der Umwandlungsrate festzustellen, wenn kein Ultraschall eingesetzt wird.

Das synthetische, bei pH-Wert 7.8 hergestellte Material und humaner Knochenapatit unterscheiden sich hinsichtlich ihrer chemischen Zusammensetzung. In humanem Knochenapatit ist Carbonat nachzuweisen und in synthetischem Hydroxylapatit nicht. Hydrogenphosphat kommt in beiden Materialien vor. Die Substitution von Phosphat durch Hydrogenphosphat führt aufgrund des Verlustes einer negativen Ladung zu einem nichtstöchiometrischen Hydroxylapatit. Folgedessen kommt es zum Verlust von Calcium- und Hydroxid-Ionen, um ein ladungsneutrale Kristallite zu erhalten. Das Material wird üblicherweise als calciumdefizienter Hydroxylapatit bezeichnet.

Eine Temperaturbehandlung des nanokristallinen Hydroxylapatits zeigt, dass bei den pH-Werten 6.6, 7.9 und 9.0 hergestelltes Material bei ca. 700°C einer Umwandlung zu β -TCP unterliegt, die bei 800°C nahezu abgeschlossen ist. Das Verhalten ist typisch für calciumdefizienten Hydroxylapatit.

Auf Grundlage des hergestellten Hydroxylapatits wurden verschiedene Darreichungsformen des Biomaterials NanoBone® entwickelt, charakterisiert und am Markt etabliert. Zur Erschließung neuer biomedizinischer Anwendungen wurde die Entwicklung und Charakterisierung einer bislang neuen injizierbaren Applikationsform des genannten Biomaterials im Rahmen dieser Promotion beschrieben. Der synthetisierte, nanokristalline Hydroxylapatit mit knochenapatit-ähnlichen Eigenschaften wird hierbei eingesetzt, um in einem silicabasierten Sol-Gel-Verfahren mit anschließender Sprühtrocknung ein weißes, pulverförmiges Biomaterial herzustellen. Das Pulver besteht überwiegend aus hohlen, „Donut“-förmigen und einseitig eingefallenen, hohlen, sphärischen Mikropartikeln. Das Maximum der Partikelgrößenverteilung liegt zwischen 2 µm und 5 µm. Die Mikropartikel haben eine definierte Zusammensetzung (Massenverhältnis Hydroxylapatit:Siliciumdioxid=76:24) und Größe, die in einem Bereich liegt, in dem keine Phagozytose auftritt (Aufnahme von festen Partikeln mit anschließendem intrazellulärem Abbau). Die Hydroxylapatit-Nanokristalle bilden ein lockeres Gefüge und sind von einer porösen Kieselgelmatrix ummantelt. Die interkonnektierenden Poren im Nanometerbereich sorgen für eine hohe innere Oberfläche von 168 m²/g, eine Porosität von ca. 81% und einer Schüttdichte von (0.26±0.05)g/cm³. Die Zusammensetzung der Mikropartikel zeigt, dass sie nach außen durch Kruste oder Hülle umgeben sind, die durch eine höhere Siliciumkonzentration als die darunter liegenden Bereiche gekennzeichnet ist. Die Verteilung der Elemente gibt Aufschluss über den sehr schnell ablaufenden Trocknungsprozess. Für die *in vivo* Untersuchungen wurden die organischen Bestandteile vom Biomaterial durch Temperaturbehandlung bis 700°C in einem Rohofen entfernt. Dabei ist keine Änderung der Kristallstruktur erkennbar. Es zeigt sich, dass durch die Ummantelung der Hydroxylapatitkristallite von der porösen Silicagelmatrix sowohl eine Phasenumwandlung zu β-TCP als auch eine Zunahme der Größe der Hydroxylapatitkristallite verhindert wird. Die Integralbreite der Röntgenbeugungsreflexe des Biomaterials ist identisch mit der des biologischen Hydroxylapatits in humanem Knochen, was auf eine gleichartige Morphologie und Größe der Kristallite schließen lässt.

Das *in vivo* Verhalten des Biomaterials wurde an Wistar-Ratten untersucht. Dabei ist eine frühzeitig beginnende Knochenneubildung (9 Tage postoperativ) festzustellen, die auf die osteoinduktiven Eigenschaften der Mikropartikel zurückzuführen ist. Im Bereich der Kortikalis wird von Tag 12 an bis zum Versuchsabschluss eine fortschreitende Bildung von neuem Knochen gefunden. Dagegen wird im Markraum anfangs neugebildeter Knochen ab Tag 21 wieder abgebaut. Deutlich erkennbar nimmt die Anzahl der Mikropartikel mit fortschreitender Zeit ab. Der Abbau erfolgt durch Osteoklasten. Die Mikropartikel behalten *in vivo* ihre äußere Form. Nahezu das gesamte Siliciumdioxid wird durch organisches Material ersetzt (Matrixwechsel). Durch die hohe Porosität und Porenstruktur ist das entwickelte Biomaterial in hohem Maße geeignet, körpereigene (z. B. Knochenmarksflüssigkeit), osteoinduktive Komponenten aufzunehmen. Hierdurch wird eine extreme Gewebefreundlichkeit und damit ein schnelles Einwachsen von Knochengewebe erreicht.

Literaturverzeichnis

- [Ala01] Alam I., Asahina I., Ohmamiuda K., Enomoto S., J. Biomed. Mater. Res. (2001), 54:129-138.
- [Ang00] Angelov A.I., Levin B.V., Chernenko Yu.D. *Phosphate ore, A reference book.* (in Russian), Nedra Busyness Centre: Moscow, Russia, 2000, p.120.
- [Aob98] Aoba T., Komatsu H., Shimazu Y., Yagishita H., Taya Y., Connect. Tissue Res. (1998), 38:129-145.
- [Art06] Arts J.J.C., Verdonshot N., Schreurs B.W., Buma P. *The use of a bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite paste in acetabular bone impaction grafting.* Biomaterials (2006), 27: 1110-1118.
- [Bar98] Barralet J., Best S., Bonfield W. *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.
- [Bec89a] Becker P. in *Fertilizer Science and Technology Series.* Marcel Dekker, New York, USA, 1989, S.6-20.
- [Bec89b] Becker P., Phosphates and phosphoric acid: raw materials technology and economics of the wet process, 2nd Ed. In *Fertilizer science and technology series.* Marcel Dekker: New York, USA, 1989, p.760.
- [Ber07] Berger S. *Entwicklung von in-situ härtenden Polymer/Apatit-Kompositmaterialien.* Diss., Technische Universität Bergakademie Freiberg, 2007.
- [Ber67] Berry E.E., Baddiel C.B. *Some assignments in the infrared spectrum of octacalcium phosphate.* Spectrochim. Acta A (1967), 23:1781-1792.
- [Bel94] Bellia J.P., Birchall J.D., Roberts N.B. *Beer: a dietary source of silicon.* The Lancet (1994), 343:235.
- [Big07] Bigi A., Boanini E., Capuccini C. and Gazzano M. *Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals.* Inorganica Chimica Acta (2007), 360:1009-1016.
- [Bod98] Bodier-Houllé P.S., Voegel P.J.C., Cuisinier F.J.G., Acta Crystallogr. Sect. D (1998), 54:1377-1381.
- [Bos64] Boskey A.L. *Amorphous calcium phosphate: the contention of bone.* J. Dent. Res. (1997), 76:1433-1436.

- [Bos73] Boskey A.L., Posner A.S. *Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent solution-mediated solid-solid conversion.* J. Phys. Chem. (1973), 77:2313-2317.
- [Bou96] Bouler J.M., Trecant M., Delecrin J., Royer J., Passuti N., Daculsi G., J. Biomed. Mater. Res. (1996), 32:603-609.
- [Bri90] Brinker C.J., Scherer G.W. *Sol-Gel Science – The Physics and chemistry of Sol-Gel Processing.* Academic Press Elsevier Science, San Diego, 1990.
- [Bro99] Brown P.W., Martin R.I., J. Phys. Chem. B (1999), 103:1671-1675.
- [Bru94] de Bruijn J.D., Bovell Y.P., van Blitterswijk C.A. *Osteoblast and osteoclast responses to calcium phosphates.* Bioceramics (1994), 7:293-298.
- [Bud73] Buddecke E. *Grundriss der Biochemie.* Walter de Gruyter, Berlin, 1973.
- [Bus98] Busch S. *Selbstorganisation und Morphogenese von Apatit-Gelatine-Kompositen unter biomimetischen Bedingungen.* Diss., Technische Universität Darmstadt, 1998.
- [Car70] Carlisle E.M. *Silicon: A possible factor in bone calcification.* Science (1970), 167(3916):279-280.
- [Car72] Carlisle E.M. *Silicon: An Essential Element for the Chick.* Nature (1972), 178:619-621.
- [Car76] Carlisle E.M. *In vivo requirement for silicon in articular cartilage and connective tissue formation in the chick.* J. Nutr. (1976), 106(4):478-484.
- [Car86] Carlisle E.M. *Silicon as an essential trace element in animal nutrition.* Ciba Foundation Symposium (1986), 121:123-139.
- [Car06] Carr A., Kemp A., Tibbetts I., Truss R., Drennan J. *Microstructure of pharyngeal tooth enameloid in the parrotfish *Scarus rivulatus* (Pisces: Scaridae).* J. Microscopy (2006), 221:8-16.
- [Cha02] Chang M.C., Tanaka J. *FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde.* Biomaterials (2002), 23:4811-4818.
- [Cha08] Chau D.Y.S., Agashi K., Shakesheff K.M. *Microparticles as tissue-engineering scaffolds: Manufacture, manipulation and modification.* Materials Science Technology (2008), 24(9):1031-1044.
- [Cho01] Chow L.C., Eanes E.D., *Octacalcium Phosphate.* Vol. 18, Karger, Basel, 2001.
- [Cra87] Crall J.J., Bjerga J.M., J. Oral Pathol. (1987), 16:488-491.

- [Cur02] Currey J.D., *Bones: Structure and mechanics*. New Jersey: Princeton University Press, 2002.
- [Dac80] Daculsi G., Kerebel L.M. *Ultrastructural study and comparative analysis of fluoride content of enameloid in sea-water and fresh-water sharks*. Arch. Oral Biol. (1980), 25:145-151.
- [Dac81] Daculsi G., Kerebel L.M., Kerebel B. *Effects of fluoride on human enamel and selachian enameloid in vitro: a high-resolution TEM and electron diffraction study*. Calcif. Tissue Int. (1981), 33:9-13.
- [Dac89] Daculsi G., LeGeros R.Z., Nery E., Lynch K., Kerebel B., J. Biomed. Mater. Res. (1989), 23:883-894.
- [Dac92] Daculsi G., D'Arc Bagot M., Corlieu P., Gersdorff M., Ann. Otol. Rhinol. Laryngol. (1992), 101:669-674.
- [Dac97] Daculsi G., Bouler J.M., Legeros R.Z. *Adaptive crystal formation in normal and pathological calcifications in synthetic calcium phosphate and related biomaterials*. Int. Rev. Cytology (1997), 172:129-191.
- [Dac98] Daculsi G. *Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute*. Biomaterials (1998), 19(16):1473-1478.
- [Dac99] Daculsi G., Weiss P., Bouler J.M., Gauthier O., Millot F., Aguado E., Bone (1999), 25(Suppl. 2):59S-61S.
- [Dah99] Dahm S., Risnes S. *A comparative infrared spectroscopic study of hydroxide and carbonate absorption bands in spectra of shark enameloid, shark dentin, and a geological apatite*. Calcif. Tissue Int. (1999), 65:459-465.
- [Dan05] Danil'chenko S.N., Kulik A.N., Bugai A.N., Pavlenko P.A., Kalinichenko T.G., Ul'yanchich N.V., Sukhodub L.F., J. Appl. Spectroscopy (2005), 72:899.
- [Dre08] Drenckhahn D., Kugler P. (2008): *Knochengewebe*. In: Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie Band 1, Hrsg.: Drenckhahn D. München, Urban & Fischer 2008; 17. Auflage, 133-149.
- [Dri73] Driessens F.C.M. *Relation between apatite solubility and anti-cariogenic effect of fluoride*. Nature (1973), 243:420-421.
- [Dri94] Driessens F.C.M., Boltong M.G., Bermúdez O., Planell J. A., Ginebra M. P., Fernández E., J. Mater. Sci. Mater. Med. (1994), 5:164-170.
- [Dri98] Driessens F.C.M., Planell J.A., Boltong M.G., Khairoun I., Ginebra M.P., Proc. Inst. Mech. Eng. Part H (1998), 212:427-435.

- [Dor02] Dorozhkin S.V. and Epple M. *Die biologische und medizinische Bedeutung von Calciumphosphaten*. *Angewandte Chemie* (2002), 114: 3260-3277.
- [Dor09] Dorozhkin S.V. *Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine*. *Materials* (2009), 2:1975-2045.
- [Ean73] Eanes E. D., Termine J. D., Nylen M. U., *Calcif. Tissue Res.* (1973), 12:143-158.
- [Ean01] Eanes E.D. *Amorphous calcium phosphate*. In: Chow L.C., Eanes E.D., editors. *Octacalcium Phosphate Monographs Oral Sci.*, vol. 18. Basel: Karger; 2001. pp. 130-147.
- [Ell73] Elliott J.C., Mackie P.E., Young R.A., *Monoclinic hydroxyapatite*. *Science* (1973), 180:1055-1057.
- [Ell94] Elliot J.C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*. Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [Ell98] Elliot J.C. in *Les matériaux en phosphate de calcium. Aspects fondamentaux*. (Hrsg.: Brès E., Hardouin P.), Sauramps Medical, Montpellier, 1998.
- [Ell02] Elliott J.C., Wilson R.M. and Dowker S.E.P. *APATITE STRUCTURES*. Huang T.C. (Ed.), *Advances in X-ray analysis*, International Centre for Diffraction Data, Newtown Square, PA (2002), 45:172-181.
- [Fer99a] Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. *Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part I: Solution chemistry*. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* (1999), 10:169-176.
- [Fer99b] Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M. *Calcium phosphate bone cements for clinical applications Part II: Precipitate formation during setting reactions*. *J. Mat. Sci. Mat. Med.* (1999), 10:177-183.
- [Fig12] Figueiredo M.M., Gamelas J.A.F., Martins A.G. *Characterization of bone and bonebased graft materials using FTIR spectroscopy*. In: Theophanides T., editor. *Infrared spectroscopy - life and biomedical sciences*. Rijeka, Croatia: InTech; 2012. p. 315-338.
- [Fon05] Fonteles C.S.R., Zero D.T., Moss M.E., Fu J. *Fluoride concentrations in enamel and dentin of primary teeth after pre- and postnatal fluoride exposure*. *Caries Res.* (2005), 39:505-508.
- [Fou99] Fountoulakis M., Takacs M.F., Berndt P., Langen H., Takacs B., *Electrophoresis* (1999), 20:2181-2195.
- [Fra07] Frauendorf T., Sümnick W. *Knochenersatz in der zahnärztlichen Chirurgie – Standortbestimmung*. *Implantologie Journal* (2007), 4:6-12.

- [Fre99] Freitag R., Vogt S., Modler M., *Biotechnol. Prog.* (1999), 15:573-576.
- [Fur01] Furuzono T., Walsh D., Sato K., Sonoda K. and Tanaka J. *Effect of reaction temperature on the morphology and size of hydroxyapatite nanoparticles in an emulsion system.* *Journal of Materials Science Letters* (2001), 20:111-114.
- [Gaf93] Gaffar A., Blake-Haskins J., Mellberg J., *Int. Dent. J.* (1993), 43(Suppl.1):81-88.
- [Gar10] Garip S., Severcan F. *Determination of simvastatin-induced changes in bone composition and structure by Fourier transform infrared spectroscopy in rat animal model.* *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2010), 52(4):580-588.
- [Gaz08] Gzásó A., Fiedeler U., Nentwich M., Raab C., Simko M. *Herstellungsverfahren von Nanopartikeln und Nanomaterialien.* NanoTrust-Dossier (2008) Nr. 6, Institut für Technikfolgen-Abschätzung (ITA): Wien.
- [Gbu04] Gbureck U. *Injizierbare Calciumphosphat-Zemente als Knochenersatzwerkstoff in niedrig belasteten Bereichen des Skelettsystems.* Habilitationsschrift, Universität Würzburg, 2004.
- [Ger06] Gerber T., Holzhüter G., Götz W., Bienengräber V., Henkel K.O., Rumpel E. *Nanostructuring of Biomaterials – A Pathway to Bone Grafting Substitute.* *Eur. J. Trauma* (2006), 32:132-140.
- [Göt08] Götz W., Gerber T., Michel B., Lossdörfer S., Henkel K.O., Heinemann F. *Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone®) osteogenesis: A study on biopsies from human jaws.* *Clin. Oral Impl. Res.* (2008), 19:1016-1026.
- [Gom08] Gomes J.F., Granadeiro C.C., Silva M.A., Hoyos M., Silva R., Vieira T. *An Investigation of the Synthesis Parameters of the Reaction of Hydroxyapatite Precipitation in Aqueous Media.* *International Journal of Chemical Reactor Engineering* (2008), Vol. 6, A103.
- [Gou09] Guobin M., Xiang Y.L. *Hydroxyapatite: Hexagonal or Monoclinic?* *Crystal Growth & Design* (2009), 9(7):2991-2994.
- [Gün83] Günzler H., Böck H. *IR-Spektroskopie.* Verlag Chemie, 1983.
- [Gün02] Günzler H., Gremlich H.U. *Ir Spektroskopie.* WILEY-VCH, 2002.
- [Ham96] Hamanishi C., Kitamoto K., Ohura K., Tanaka S., Doi Y., *J. Biomed. Mater. Res.* (1996), 32:383-389.
- [Har01] Hartgerink J.D., Beniash E., Stupp S.I. *Self-assembly and mineralization of peptide-amphiphile nanofibers.* *Science* (2001), 294:1684-1688.

- [Har08] Harms C., Helms K., Taschner T., Stratos I., Gerber T., Lenz S., Vollmar B., Mittlmeier T. *Histomorphometric and micro-CT analysis of the osteoneogenic capacity in the metaphysis of the sheep after implantation of nanocrystalline bone grafting substitute NanoBone™*. Chirurgisches Forum(2008), 37:253-255.
- [Har86] Harries J. E., Hukins D. W., Hasnain S. S., J. Phys. C (1986), 19:6859-6872.
- [Har87] Harries J. E., Hukins D. W., Holt C., Hasnain S. S., J. Cryst. Growth (1987), 84:563-570.
- [Hen98] Hench L. L., J. Am. Ceram. Soc. (1998), 81:1705-1728.
- [Hes99] Hesse A., Heimbach D., World J. Urol. (1999), 17:308-315.
- [Heu77] Heughebaert J. C., Thesis, Institut National Polytechnique, Toulouse, France, 1977.
- [Hil97] Hildebrand M., Volcani B. E., Gassmann W., Schroeder J. I. *A gene family of silicon transporters*. Nature (1997), 385:688-689.
- [Hoh02] Du Fresne von Hohenesche C. *Maßgeschneiderte Kieselgelträger für die metallocen-katalysierte Polyolefinsynthese*. Diss., Universität Mainz, 2002.
- [Hop88] Hoppenbrouwers P. M., Groenendijk E., Tewarie N. R., Driessens F. C. M., J. Dent. Res. (1988), 67:1254-1256.
- [Hub06] Huber F. X., Belyaev O., Hillmeier J., Kock H. J., Huber C., Meeder P. J., Berger I. *First histological observations on the incorporation of a novel nanocrystalline hydroxyapatite paste OSTIM in human cancellous bone*. BMC Musculoskelet Disord. (2006), 7:50.
- [Iij96] Iijima M., Nelson D. G. A., Pan Y., Kreinbrink A. T., Adachi M., Goto T., Moriwaki Y., Calcif. Tissue Int. (1996), 59:377-384.
- [Iko99a] Ikoma T., Yamazaki A., Nakamura S., Akao M. *Preparation and structure refinement of monoclinic hydroxyapatite*. J. Solid State Chem. (1999), 144:272-276.
- [Iko99b] Ikoma T., Yamazaki A., Nakamura S., Akao M. *Preparation and dielectric property of sintered monoclinic hydroxyapatite*. J. Mater. Sci. Letters (1999), 18:1225-1228.
- [Ile79] Iler R. K. *The Chemistry of Silica*. Wiley Interscience, New York, 1979.
- [Jea94] Jeanjean J., Vincent U., Fedoroff M., J. Solid State Chem. (1994), 103:68-72.

- [Jor71] Joris S. J., Amberg C. H. *Nature of deficiency in nonstoichiometric hydroxyapatites. II. Spectroscopic studies of calcium and strontium hydroxyapatites.* J. Phys. Chem. (1971), 75:3172-3178.
- [Jug02] Jugdaohsingh R., Anderson S. H., Tucker K. L., Elliott H., Kiel D. P., Thompson R. P., Powell J. J. *Dietary silicon intake and absorption.* Am. J. Clin. Nutr. (2002), 75:887-893.
- [Kai91] Kaim W., Schwederski B. *Bioanorganische Chemie.* B. G. Teubner, Stuttgart, 1991.
- [Kan05] Kannan S., Lemos I. A. F., Rocha J. H. G. and Ferreira J. M. F. *Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios.* Journal of Solid State Chemistry (2005), 178:3190-3196.
- [Kay64] Kay M. I., Young R. A., Posner A. S. *Crystal Structure of Hydroxyapatite.* Nature (1964), 204:1050-1052.
- [Kee92] Keeting P. E., Oursler M. J., Wiegand K. E., Bonde S. K., Spelsberg T. C., Riggs B. L. *Zeolite an increases proliferation, differentiation, and transforming growth factor β production in normal adult human osteoblast-like cells in vitro.* J. Bone Miner. Res. (1992), 7(11):1281-1289.
- [Kod88] Kodaka T., Debari K., Higashi S., J. Electron Microsc. (Tokyo 1988), 37:73-80.
- [Kri90] Krischner H. *Einführung in die Röntgenfeinstrukturanalyse.* Vieweg, Braunschweig, 1990.
- [Kru11] Kruse A., Jung R. E., Nicholls F., Zwahlen R. A., Hammerle C. H., Weber F. E. *Bone regeneration in the presence of a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute material.* Clin. Oral Implants Res. (2011), 22:506-511.
- [Kur97] Kurashina K., Kurita H., Hirano M., Kotani A., Klein C. P., de Groot K., Biomaterials (1997), 18:539-543.
- [Laf08] Lafon J. P., Champion E., Bernache-Assollant D. *Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite $Ca_{10-x}(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x(OH)_{2-x-2y}(CO_3)_y$ ceramics with controlled composition.* Journal of the European Ceramic Society (2008), 28:139-147.
- [Lee99] Lee S. H., Mirkin N. G., Krimm S. *A quantitative anharmonic analysis of the amide A band in α -helical poly(L-alanine).* Biopolymers (1999), 49:195-207.
- [LeG74] LeGeros R. Z., J. Dent. Res. (1974), 53:45-50.
- [LeG91] LeGeros R. Z. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine.* Karger, Basel, 1991.

- [LeG94] LeGeros R. Z. in *Hydroxyapatite and Related Materials*. (Hrsg.: Brown P.W., Constantz B.), CRC, Boca Raton, FL, 1994, S. 3-28.
- [LeG01] LeGeros R. Z. Z. *Kardiol.* (2001), 90(Suppl. 3):III/116-III/125.
- [Lem92] Lemaitre J., Munting E., Mirtchi A. A., *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* (1992), 93:163-165.
- [Les09] Leskiv M., Lagoa A. L. C., Urch H., Schwiertz J., da Piedade M. E. M., Epple M. *Energetics of calcium phosphate nanoparticle formation by the reaction of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ with $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$* . *J. Phys. Chem. C* (2009), 113:5478-5484.
- [Lev04] Leveque I., Cusack M., Davis S. A., Mann S. *Promotion of fluorapatite crystallization by soluble-matrix proteins from Lingula Anatina shells*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2004), 43:885-888.
- [Li05] Li Z., Wang P., Wu Z. *Preparation of nanosized hydroxyapatite particles at low temperatures*. *Journal of Materials Science* (2005), 40:6589-6591.
- [Lio04] Liou S. C., Chen S. Y., Lee H. Y., Bow J. S. *Structural characterization of nanosized calcium deficient apatite powders*. *Biomaterials* (2004), 25:189-196.
- [Low89] Lowenstam H. A., Weiner S. *On biomineralization*. Oxford University Press: Oxford, UK, 1989, p. 324.
- [Lyu00] Lyu K., Nathason D., Chou L. *Induced osteogenesis in vitro upon composition and concentration of silicon, calcium, and phosphorous*. *Sixth World Biomaterials Congress Transactions* (2000), 1387.
- [Mar04] Markovic M., Fowler B. O., Tung M. S. *Preparation and Comprehensive Characterization of a Calcium Hydroxyapatite Reference Material*. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* (2004), 109(6):553-568.
- [McC73] McConnell D. *Apatite: its crystal chemistry, mineralogy, utilization, and geologic and biologic occurrences*. Springer-Verlag: Vienna and New York, USA, 1973, p.111.
- [McD77] McDowell H., Gregory T. M., Brown W. E. *Solubility of $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ in the system $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-H}_2\text{O}$ at 5, 15, 25, and 37 degree C*. *J. Res. Natl. Bur. Stand. Sect. A Phys. Chem.* (1977), 81A:273-281.
- [Mei08] Meier J., Wolf E., Bienengraber V. *Einsatz des synthetischen nanostrukturierten Knochenaufbaumaterials NanoBone® bei Sinusbodenelevation*. *Implantologie* (2008), 16(3):301-314.
- [Men03] Meneghini C., Dalconi M. C., Nuzzo S., Mobilio S., Wenk R. H., *Biophys. J.* (2003), 84:2021.

- [Mey78a] Meyer J. L., Eanes E. D., *Calcif. Tissue Res.* (1978), 28:59-68.
- [Mey78b] Meyer J. L., Eanes E. D., *Calcif. Tissue Res.* (1978), 28:209-216.
- [Mir89a] Mirtchi A. A., Lemaitre J., Terao N., *Biomaterials* (1989), 10:475-480.
- [Mir89b] Mirtchi A. A., Lemaitre J., Munting E., *Biomaterials* (1989), 10:634-638.
- [Mir90] Mirtchi A. A., Lemaitre J., Munting E., *Biomaterials* (1990), 11:83-88.
- [Mir91] Mirtchi A. A., Lemaitre J., Munting E., *Biomaterials* (1991), 12:505-510.
- [Mir99] Mirshahi M., Camoin L., Nicolas C., Ghedira I., Cozette J., Faure J.P., *Curr. Eye Res.* (1999), 18:327-334.
- [Mob07] Mobasherpour I., Heshajin M.S., Kazemzadeh A. and Zakeri M. *Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method.* *Journal of Alloys and Compounds* (2007), 430:330-333.
- [Mon09] Montalbert-Smith R., Palma C.A., Arias J.D., Montero M.L. *Formation of hydroxyapatite nanosized and other apatites by electrolysis process.* *Key Eng. Mater.* (2009), 396-398:579-582.
- [Mor74] Moreno E. C., Kresak M., Zahradnik R. T. *Fluoridated hydroxyapatite solubility and caries formation.* *Nature* (1974), 247:64-65.
- [Mor89] Mortier A., Lemaitre J., Rodrique L., Rouxhet P.G., *J. Solid State Chem.* (1989), 78:215-219.
- [Mor01] Moriarty P. *Nanostructured materials.* *Rep. Prog. Phys.* (2001), 64:297–381.
- [Mur05] Murugan R., Ramakrishna S. *Review: Development of nanocomposites for bone grafting.* *Composites Science and Technology* (2005), 65:2385-2406.
- [Nan00] Nancollas G. H., Wu W., *J. Crystal Growth* (2000), 211:137-142.
- [Nar04] Narayan R.J., Kumta P.N., Sfeir C., Lee D.H., Choi D., Olton D. *Nanostructured ceramics in medical devices: applications and prospects.* *JOM* (2004), 56:38-43.
- [Nel86] Nelson D. G. A., Wood G.J., Barry J. C., *Ultramicroscopy* 1986, 19:253-266.
- [Ohu96] Ohura K., Bohner M., Hardouin P., Lemaitre J., Pasquier G., Flautu B., *J. Biomed. Mater. Res.* (1996), 30:193-200.
- [Ots93] Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y., Fox J.L., Higuchi W.I., *Chem. Pharm. Bull., Tokyo*, (1993), 41:2055-2057.

- [Pad08] Padilla S., Izquierdo-Barba I., Vallet-Regí M. *High specific surface area in nanometric carbonated hydroxyapatite*. Chem. Mater. (2008), 20:5942-5944.
- [Pal08] Palard M., Champion E., Foucaud S. *Synthesis of silicated hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_{6-x}(SiO_4)_x(OH)_{2-x}$* . Journal of Solid State Chemistry (2008), 181:1950-1960.
- [Pas05] Passey B. H., Robinson T. F., Ayliffe L. K., Cerling T. E., Sponheimer M., Dearing M. D., Roeder B. L., Ehleringer J. R., J. Archaeological Sci. (2005), 32:1459.
- [Pas08] Pasteris J. D., Wopenka B., Valsami-Jones E. *Bone and tooth mineralization: why apatite?* Elements (2008), 4:97-104.
- [Pet00] Peters F., Schwarz K., Epple M., Thermochim. Acta (2000), 361:131-138.
- [Pet01] Peters F. *Biologische Kristallisation von Calciumphosphaten - Untersuchung und Simulation*. Diss., Universität Hamburg, 2001.
- [Pos75] Posner A. S., Betts F. *Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure*. Acc. Chem. Res. (1975), 8(8):273-281.
- [Pra06] Prakash K. H., Ooi C. P., Kumar R., Khor K. A. and Cheang P. *Effect of super saturation level on the size and morphology of hydroxyapatite precipitate*. Emerging Technologies - Nanoelectronics, IEEE Conference (2006), 345-349.
- [Pue82] Puech J., Heughebaert J. C., Montel G. *A new mode of growing apatite crystallites*. J. Cryst. Growth. (1982), 56:20-24.
- [Rad10] Radefeldt S. *Entwicklung und Charakterisierung eines hochporösen Formkörpers zum Einsatz als Knochenaufbaumaterial*. Diss., Universität Rostock, 2010.
- [Ray02] Raynaud S., Champion E., Bernache-Assollant D., Thomas P. *Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterisation and thermal stability of powders*. Biomaterials (2002), 23:1065-1072.
- [Ref03] Reffitt D. M., Ogston N., Jugdaohsingh R., Cheung H. F. J., et al. *Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro*. Bone (2003), 32(2):127-135.
- [Rho98] Rho J. Y., Kuhn-Spearing L., Zioupos P., *Mechanical properties and the hierarchical structure of bone*. Med. Eng. Phys., (1998), 20(2):92-102.
- [Ric00] Rico H., Gallego-Lago J. L., Hernandez E. R., Villa L. F., Sanchez-Atrio A., Seco C. et al. *Effect of silicon supplement on osteopenia induced by ovariectomy in rats*. Calcif. Tissue Int. (2000), 66(1):53-55.
- [Rob55] Robinson R. A., Watson M. L. *Crystal-collagen relationships in bone as observed in the electron microscope III crystal and collagen morphology as a function of age*. Ann. NY Acad. Sci. (1955), 60:596-660.

- [Rod00] Rodriguez-Lorenzo L. M., Vallet-Regi M. *Controlled crystallization of calcium phosphate apatites*. Chem. Mater. (2000), 12:2460-2465.
- [Roe94] Roeges N.P.G. *A guide to the complete interpretation of infrared spectra of organic structures*. Chichester, England: Wiley & Sons, 1994.
- [Rue98] Rueger J.M. *Knochenersatzmittel - heutiger Stand und Ausblick*. Orthopäde (1998), 27:72-79.
- [Sam07] Sammons R.L., Thackray A.C., Ledo H.M., Marquis P.M., Jones I.P., Yong P., Macaskie L.E. *Characterisation and sintering of nanophase hydroxyapatite synthesised by a species of Serratia*. Journal of Physics: Conference Series (2007), 93:1-7.
- [Sar02] Sarig S., Kahana F. *Rapid formation of nanocrystalline apatite*. J. Cryst. Growth (2002), 237-239:55-59.
- [Sch69] Schroeder H. *Formation and Inhibition of Dental Calculus*. Hubert, Vienna, 1969.
- [Sch73] Schwarz K. *A Bound Form of Silicon in Glycosaminoglycans and Polyuronides*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1973), 70(5):1608-1612.
- [She00] Shepard S.R., Brickman-Stone C., Schrimsher J.L., Koch G., J. Chromatogr. A (2000), 891:93-98.
- [Sid05] Siddharthan A., Seshadri S.K., Sampath Kumar T.S. *Rapid synthesis of calcium deficient hydroxyapatite nanoparticles by microwave irradiation*. Trends in Biomaterials and Artificial Organs (2005), 18:110-113.
- [Sin85] Sing K.S.W. *Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity*. Pure and Applied Chemistry. (1985), 57(4):603-619.
- [Smi94] Smith D.K., Calcium phosphate apatites in nature. In *Hydroxyapatite and related materials*. Brown P.W., Constantz B. Eds., CRC Press Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1994, pp.29-44.
- [Som04] Somasundaran P. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2004, pp 567.
- [Spi09] Spieß L., Teichert G., Schwarzer R., Behnken H., Genzel C. *Moderne Röntgenbeugung. Röntgendiffraktometrie für Materialwissenschaftler, Physiker und Chemiker*. Verlag Vieweg + Teubner in GWV Fachverlage GmbH 2. Auflage, 2009.
- [Ste04] Stefan E., *Chemische Technik. Prozesse und Produkte*, 5. Aufl. Herausgegeben von Dittmeyer R., Keim W., Kreysa G., Oberholz A. Angewandte Chemie (2004), 116(42), 5687-5788.

- [Suc98] Suchanek W., Yoshimura M., *J. Mater. Res.* (1998), 13:94-117.
- [Suc04] Suchanek W.L., Byrappa K., Shuk P., Riman R. E., Janas V. F., TenHuisen K. S. *Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical-hydrothermal method.* *Biomaterials* (2004), 25:4647-4657.
- [Sun97] Sun J.S., Tsuang Y.H., Chang W.H.S., Li J., Liu H.C., Ling F.H. *Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts.* *Biomaterials* (1997), 18:683-690.
- [Tan03] Tanaka Y., Hirata Y., Yoshinaka R. *Synthesis and characteristics of ultra-fine hydroxyapatite particles.* *J. Ceram. Proc. Res.* (2003), 4:197-201.
- [Tak98] Takagi S., Chow L.C., Ishikawa K., *Biomaterials* (1998), 19:1593-1599.
- [Tay98] Taylor M.G., Simkiss K., Simmons J., Wu L.N.Y., Wuthier R.E., *Cell. Mol. Life Sci.* (1998), 54:192-202.
- [Ter72] Termine J.D., Eanes E.D. *Calcif. Tissue Res.* (1972), 10:171-197.
- [Tör95] Törmälä P., Rokkanen P., *Biodegradable polymers in orthopaedics: experimental and clinical.* *Materials in Clinical Applications* (1995), 639-651.
- [Tom94] Tomazic B.B., Brown W.E., Shoen F.J., *J. Biomed. Mater. Res.* (1994), 28:35-47.
- [Usk11] Uskoković V., Uskoković D.P. *Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents.* *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2011), 96B:152-191.
- [Val01] Vallet-Regí M. *Ceramics for medical applications.* *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2001), 97-108.
- [Vie05] Vieira A.P.G.F., Hancock R., Dumitriu M., Schwartz M., Limeback H., Grynpas M.D. *How does fluoride affect dentin microhardness and mineralization?* *J. Dental Res.* (2005), 84:951-957.
- [Vis08] Viswanath B., Ravishankar N. *Controlled synthesis of plate-shaped hydroxyapatite and implications for the morphology of the apatite phase in bone.* *Biomaterials* (2008), 29(36):4855.
- [Vor75] Voronkov M.G., Zelchan G.I., Lukevitz E. *Silizium und Leben.* Akademie Verlag, 1975.
- [Wan98] Wang J., Chen W., Li Y., Fan S., Wenig J., Zhang X., *Biomaterials* (1998), 19:1387-1392.

- [Was04] Waszkiel D., Opalko K., Lagocka R., Chlubek D. *Fluoride and magnesium content in superficial enamel layers of teeth with erosions*. *Fluoride* (2004), 37:271-277.
- [Wat53] Watson M.L., Robinson R.A. *Collagen–crystal relationships in bone. II. Electron microscope study of basic calcium phosphate crystals*. *Am. J. Anat.* (1953), 93:25-59.
- [Web99] Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R. *Osteoblast adhesion on nanophase ceramics*. *Biomaterials* (1999), 20:1221-1227.
- [Web00] Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R. *Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics*. *Biomaterials* (2000), 21:1803-1810.
- [Wef87] Wefel J.S., Harless J.D., *J. Dent. Res.* (1987), 66:1640-1643.
- [Wei86] Weiner S., Price P.A. *Disaggregation of bone into crystals*. *Calcif. Tissue Int.* (1986), 39:365-375.
- [Wei98] Weiner S., Wagner H.D. *The material bone: structure-mechanical function relations*. *Annu. Rev. Mater. Sci.* (1998), 28:271-298.
- [Wei03] Weiner S., Dove P.M. *An overview of biomineralization processes and the problem of the vital effect*. In *Biomineralization, Series: Reviews in Mineralogy and Geochemistry*. Vol. 54; Dove P.M., de Yoreo J.J., Weiner S., Eds.; Mineralogical Society of America: Washington, D.C., USA, 2003, pp. 1-29.
- [Wie05] Wiegand A., Krieger C., Attin R., Hellwig E., Attin T. *Fluoride uptake and resistance to further demineralisation of demineralised enamel after application of differently concentrated acidulated sodium fluoride gels*. *Clin. Oral. Investig.* (2005), 9:52-57.
- [Win83] Windholz M. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 10. Aufl., Merck, Rahway, NJ, 1983.
- [Wis00] Wissing J., Heim S., Flohe L., Bilitewski U., Frank R., *Electrophoresis* (2000), 21:2589-2593.
- [Wut85] Wuthier R.E., Rice G.S., Wallace J.E., Weaver R.L., LeGeros R.Z., Eanes E.D. *Calcif. Tissue Int.* (1985), 37:401-410.
- [Xu11] Xu W., Ganz C., Weber U., Adam M., Holzhüter G., Wolter D., Frerich B., Vollmar B., Gerber T. *Evaluation of injectable silica-embedded nanohydroxyapatite bone substitute in a rat tibia defect model*. *International Journal of Nanomedicine* (2011), 6:1543-1552.
- [Yan08] Yanbao L., Dongxu L., Wenjian W. *Preparation of nano carbonate-substituted hydroxyapatite from an amorphous precursor*. *International Journal of Applied Ceramic Technology* (2008), 5:442-448.

- [Yin01] Yin G., Liu Z., Zhou R., Zhan J., Wang J., Yuan N., J. Chromatogr. A (2001), 918:393-399.
- [Yam98] Yamamoto H., Niwa S., Hori M., Hattori T., Sawai K., Aoki S., Hirano M., Takeuchi H., Biomaterials (1998), 19:1587-1591.
- [You67] Young R.A. Trans. New York Acad. Sci., Ser. II, (1967), 29(7):949-959.

Anhang

A.1 Experimentelle Methoden

ATR

ATR (Attenuated Total Reflection, dt. abgeschwächte Totalreflexion) ist eine Form der Infrarotspektroskopie. Bei der IR-Spektroskopie werden die Schwingungsenergien von Atomen innerhalb von Molekülen untersucht. Sie liegen im Bereich der Infrarotstrahlung (etwa zwischen $1\mu\text{m}$ und $50\mu\text{m}$, also zwischen 10000cm^{-1} und 200cm^{-1}). Bei weniger Energiezufuhr werden Molekülrotationen angeregt, diese Energien liegen im fernen Infrarotbereich. Bei der IR-Spektroskopie wird nun monochromatische, infrarote Strahlung auf die Probe gelenkt und gemessen wie die Probe eine bestimmte Energie absorbiert oder reflektiert. Durch diese Informationen kann man auf die Schwingungszustände der Atome bzw. Moleküle der Probe schließen. Dies kann Aufschluss über die chemische Zusammensetzung der Probe liefern. Eine andere Methode so ein Spektrum aufzunehmen, ist die Fourier-Transform-IR-Spektroskopie. Dabei wird kein monochromatisches IR-Licht auf die Probe gelenkt. Durch ein Michelson-Interferometer wird die IR-Strahlung zum interferieren gebracht und dann auf die Probe gelenkt. Das Intensitätssignal am Detektor als Funktion der Veränderung der optischen Weglänge, korrigiert durch eine Konstante, wird Interferogramm genannt. Dieses Interferogramm kann durch eine Fouriertransformation (vgl. Gl. A.1.1) in ein Spektrogramm umgerechnet werden.

$$S(q) = \int_{-\infty}^{\infty} I(x) \cos(2\pi qx) dx \quad (\text{A.1.1})$$

x = optischer Wegunterschied

q = Wellenzahl

Diese Methode ist wesentlich schneller als die dispersive Methode, aber auch wesentlich rechenintensiver. Wie schon angesprochen, kann die Absorption oder die Reflexion der IR-Strahlung einer Probe gemessen werden. Bei der Reflexion wird ausgenutzt, dass der Reflexionsgrad einer Probe abhängig vom komplexen Brechungsindex ist. Im Bereich der Schwingungszentren steigt die Absorption, was im komplexen Brechungsindex durch einen Extinktionskoeffizienten dargestellt wird. Dies erhöht die Reflexion der Probe für diesen Frequenzbereich. Bei der abgeschwächten Totalreflexion (ATR) wird die IR-Strahlung in ein

Medium hohen Brechungsindex (ATR-Kristall) gelenkt, dort zu mehreren Totalreflexionen gebracht (vgl. Abbildung A.1.1) und erreicht dann den Detektor.

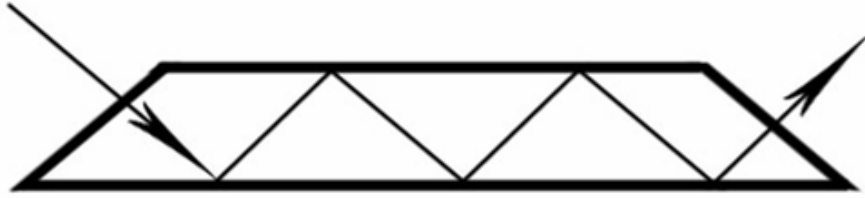


Abbildung A.1.1: Schematische Darstellung des Lichtweges durch einen ATR-Kristall.

Bei der Totalreflexion bilden sich hinter der reflektierenden Grenzfläche evaneszente Wellen aus. Diese reichen etwa so weit wie die Wellenlänge des Lichtes lang ist. Wird nun eine Probe nahe an die Oberfläche des ATR-Kristalls gebracht, kann diese mit der evaneszenten Welle wechselwirken und im reflektierten Strahl fehlen entsprechende Wellenlängen. Vorteil dieser Methode ist, dass auch dicke, IR-undurchlässige Proben vermessen werden können [Gün83, Gün02].

A.2 Anforderungen an Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien sind Biomaterialien. Biomaterialien werden definiert als nichtkörpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze Gewebe und deren Funktionen ersetzen.

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

Ein Knochenersatzmaterial (KEM) 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 osteoinduktiv wirken, also die Knochenneubildung anregen. Osteokonduktivität ist die Eigenschaft, dass im Sinne eines Leitschieneffekts 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 KEM mechanisch gut belastbar sein [Rue98]. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, müssen die Materialien diverse Eigenschaften erfüllen. Dazu gehören für KEMs im Allgemeinen:

- (1) Die Porosität des KEMs. Interkonnektierende Porensysteme in der Größe von ca. 200 μm bis 400 μm ermöglichen die Migration von Osteoblasten und Osteoklasten in das KEM hinein.
- (2) Die Löslichkeit des Materials. Eine höhere Löslichkeit fördert auch das Remodeling, senkt aber gleichzeitig die mechanische Stabilität [Tör95].
- (3) 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 [Web99]. Allerdings zeigten Versuche mit HA-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 [Sun97].
- (4) Der entstehende pH-Wert nach der Implantation in das biologische Milieu. Zellen, insbesondere Osteoblasten und Osteoklasten, reagieren sehr empfindlich auf Abweichungen vom physiologischen pH-Wert-Milieu (pH-Wert 7.4).

Für Materialien mit oder aus Calciumphosphaten gilt im Besonderen:

- (1) Die chemische Zusammensetzung des Materials: Welche Calciumphosphatphase ist vorhanden (HA, β -TCP), Einphasigkeit, Mehrphasigkeit, das Ca/P-Verhältnis, vorhandene Restmengen der Ausgangsmaterialien.
- (2) Die Größe der kleinsten kristallinen Strukturelemente des Materials. Einer abnehmenden Größe der kleinsten kristallinen Strukturelemente folgt eine abnehmende thermodynamische Stabilität. Daraus folgt eine höhere Löslichkeit und damit bessere Resorption durch Osteoklasten und somit ein besseres Remodeling [DeB94].

A.3 Biologische Funktionalität von NanoBone®

Die biologische Funktionalität von NanoBone® (NB) ist dadurch gekennzeichnet, dass die SiO_2 -Gelmatrix *in vivo* innerhalb kurzer Zeit (abhängig von der Defektgröße nach ca. 10 Tagen) durch eine organische Matrix aus nichtkollagenen Matrixproteinen aus der extrazellulären Matrix ersetzt wird. Hierbei verliert das Knochenaufbaumaterial seine Form nicht. Gerber et al. berichteten erstmals von der Entdeckung des Matrixwechsels in einer Publikation von 2006 [Ger06]. Im Tierversuch mit Göttinger Minipigs wurde NB-Granulat in Knochendefekte mit einer kritischen Größe von $>5\text{ cm}^3$ in den vorderen Unterkiefer implantiert. In einer EDX-Analyse ist 5 Wochen nach der Implantation kein Silicium mehr im entmineralisiertem Granulat nachweisbar. Das entmineralisierte Granulat enthält weiter nichts als organische Bestandteile (Abbildung A.3.1). Dieser schnelle Abbauprozess ist ungewöhnlich, weil die Löslichkeit von amorphem SiO_2 in H_2O bei 25°C und einem pH-Wert von 7 sehr niedrig (100 ppm bis 150 ppm) ist, so dass es sich bei diesem Abbauprozess nicht bloß um einen formal reinen Auflösungsprozess handelt.

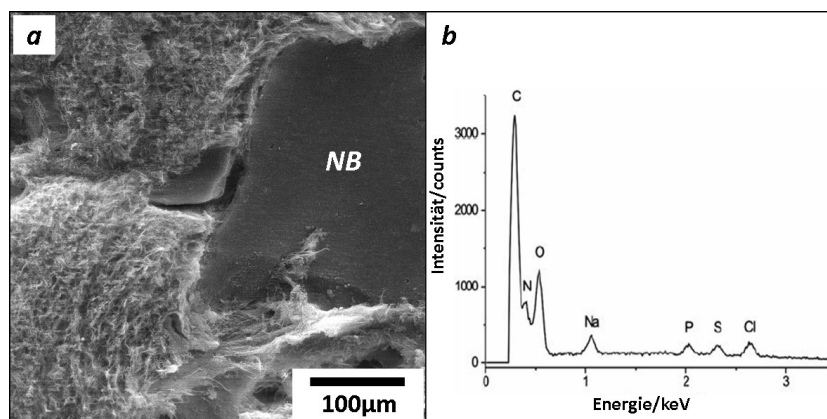
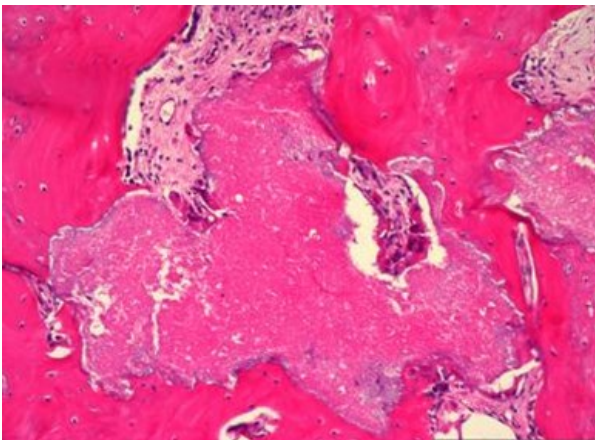


Abbildung A.3.1: REM-Aufnahme (a) und ein EDX-Spektrum (b) (beide am EMZ Uni Rostock) von entmineralisiertem NB-Granulat im Gewebe 5 Wochen nach der Implantation in den Unterkiefer eines Göttinger Minipigs. Aufgrund der Entmineralisierung durch EDTA wurde kein Calcium gefunden. Silicium, das in der Kieselgelmatrix enthalten ist, wurde nicht gefunden, obwohl SiO_2 von der Entmineralisierung durch EDTA nicht betroffen ist. Das Granulat enthält weiter nichts als organische Bestandteile (Bilder entnommen aus [Ger06]).

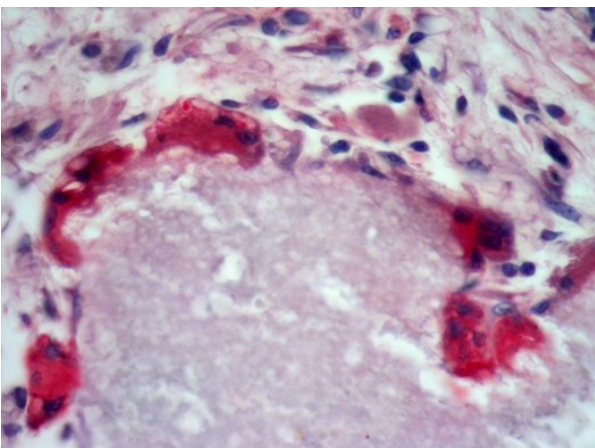
Die biologische Funktion des Biomaterials ist wesentlich durch die neue organische Matrix bestimmt. Der Körper erkennt das Material als körpereigene Struktur und bezieht es in die natürlichen Prozesse des Knochenauf- und Knochenabbaus ein. Diese Integration in körpereigene Vorgänge spricht eindeutig für den biomimetischen Charakter von NB. Bei der Entmineralisierung von NB-Granulat durch Ethylendiamintetraacetat (EDTA) wurde Hydroxylapatit, nicht aber SiO_2 , herausgelöst. EDTA ist ein sechszähliger Komplexbildner und ist in der Lage, besonders stabile 1:1-Chelatkomplexe mit Kationen mit einer Ladungszahl von mind. +2, z. B. Ca^{2+} -Ionen, die in Hydroxylapatit enthalten sind, zu bilden. Harms et al. belegen NB eine hohe osteokonduktive Potenz. Unter Osteokonduktion versteht man die Fähigkeit,

Knochenwachstum entlang der Oberfläche des Biomaterials zu unterstützen [Fra07]. Das Knochenaufbaumaterial NB dient als „Leitschiene“ für die Bildung von neuem Knochengewebe [Har08]. Durch die Bildung einer proteinreichen organischen Matrix wird das Einwachsen von Bindegewebe und Blutgefäßen gefördert. Der nanostrukturierte Aufbau von NB führt zu extrem schneller Knochenbildung (Abbildung A.3.2). Klinische Studien belegen, dass bei Sinusbodenelevation (Anheben der Kieferhöhlenschleimhaut) bereits nach 3 Monaten ein stabiles Knochenlager zur Verfügung steht. Bei anderen Knochenersatzmaterialien (KEM) hat sich eine Inkorporationszeit von 9 Monaten bis 12 Monaten ergeben. Die Verwendung von NB kann somit die Behandlungszeiten erheblich verkürzen. Meier et al. zeigten, dass nach 3 Monaten 37.7% Knochen, 43.0% Markraum und nur noch 19.3% NB nachgewiesen worden sind [Mei08]. Dabei stellt die angiogene Osteogenese im NB einen echten Qualitätsunterschied



dar. Bei den anderen untersuchten KEM konnte dagegen Knochenbildung nur vom Rande her nachgewiesen werden. NB fördert das natürliche *Remodeling*. Die Anlockung und Differenzierung der Osteoblasten und Osteoklasten deutet stark auf einen osteoinduktiven Charakter des Biomaterials hin.

Abbildung A.3.2: Lichtmikroskopische Mikroaufnahme eines HE-gefärbten histologischen Schnittes. Nach 5 Wochen ist die Kieselgelmatrix abgebaut. Die neu entstandene organische Matrix erscheint im entmineralisierten histologischen Präparat (HA ist herausgelöst) amorph strukturiert.



Sofort nach dem Matrixwechsel sind auf der Oberfläche des Biomaterials Osteoklasten mithilfe der TRAP-Färbung (Tatratresistente saure Phosphatase) nachweisbar (Abbildung A.3.3). Die Osteoklasten (dunkelblau gefärbt) beginnen mit dem Abbau von NB.

Abbildung A.3.3: Lichtmikroskopische Mikroaufnahme eines entmineralisierten histologischen TRAP gefärbten Schnittes von NB-Granulat im Gewebe 5 Wochen nach der Implantation in den Unterkiefer eines Göttinger Minipigs. Osteoklasten bedecken die Oberfläche vom Granulat.

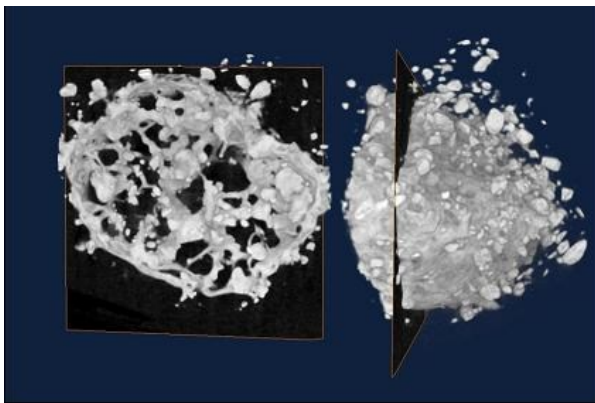
Die Ergebnisse von Götz et al. zeigen den osteoinduktiven Charakter von NB. Innerhalb weniger Tage wird die Kieselgel-Matrix durch eine organische Matrix ersetzt, in der wichtige Proteine für die Osteogenese (u.a. BMP, Osteocalcin, Osteopontin) enthalten sind [Göt08]. Es konnte eine Anlockung und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten nachgewiesen werden.

Osteoklasten resorbieren NB wie Knochen. Parallel bauen Osteoblasten neuen natürlichen Knochen auf. Dieser Abbau des Knochenaufbaumaterials (KAM) und Aufbau neuen, autologen Knochens findet genau wie beim natürlichen *Remodeling* statt.

Zur biologischen Funktionalität der NBS-Materialien wurde folgendes festgestellt:

Matrixwechsel:	10Tage post-operativ ist SiO ₂ -Gelmatrix durch organische Matrix ersetzt worden (SiO ₂ -Massenanteil 39%) [Ger06]
Resorptionsrate:	50% nach 6 Wo. und 83% nach 26 Wo. im Muskelgewebe vom Schaf abgebaut (n.n.v.)
Knochenbildungsrate:	1.7% nach 6 Wo. und 16.4% nach 26 Wo. im Muskelgewebe vom Schaf aufgebaut (n.n.v.)
Defektdurchbauungsrate:	keine Angabe

Die Daten sind aus nachfolgenden Veröffentlichungen entnommen worden. [Ger06], (n.n.v.): Osteoinduktive Wirkung des Biomaterials im Großtierexperiment (Minipigs oder Schafen).



Im Tierversuch mit Göttinger Minipigs wurde eine ektope Knochenbildung im Muskelgewebe beobachtet. Veranschaulicht wird die ektope Knochenbildung mit NBS-Granulat durch ein Mikro-CT in Abbildung A.3.4. Im Muskel entsteht ein Knochenstück mit Kortikales und Markraum mit Trabekeln, also so etwas wie ein Röhrenknochen, hier allerdings als Hohlkugel.

Abbildung A.3.4: Mikro-CT von ektop entstandenem Knochen 26 Wochen nach intramuskulärer Implantation von NBS-Granulat in ein Göttinger Minipig.

Eine neue Studie der Universität Zürich bestätigt einem Material der NBS-Familie bessere Performance. Kruse et. al bestätigen mit der aktuellen Studie "Bone regeneration in the presence of a hydroxyapatite/silica oxide-based bone substitute material" NBS eine bessere Performance als führendem xenogenen Material [Kru11]. Mit NBS wurde sowohl die höchste Knochenbildungsrate nach 4 Wochen als auch die schnellste Defektdurchbauung erreicht.

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Das sind im Einzelnen:

- Prof. Dr. Thomas Gerber für die Überlassung des Themas und die Begleitung auf dem Weg zur Vollendung der Arbeit,
- Dr. Gerd Holzhüter für die Einarbeitung in die Rasterelektronenmikroskopie und Energiedispersive Röntgenspektroskopie, für die Arbeiten am Transmissionselektronenmikroskop und für hilfreiche Diskussionen und Ratschläge, die den Fortgang der Arbeit unterstützten,
- Petra Wilhelm für die guten Ratschläge und die Betreuung bei Bestellungen etc.,
- Dr. Weiguo Xu für die chirurgische Arbeit bei den *in vivo* Untersuchungen,
- Dr. Cornelia Ganz und Anja Clasen für Hilfe bei der Auswertung der *in vivo* Untersuchungen, für Ratschläge und das Lektorat,
- Dr. Uwe Hoppe, Sven Radefeldt, Ewa Zych und Richard Dietrich für viele konstruktive Hinweise und Diskussionen,
- Martin Adam für die Arbeiten am Transmissionselektronenmikroskop, Holger Keuer für die Präparation der Ultradünnschnitte und beiden für viele konstruktive Hinweise und Diskussionen,
- Dorothea Gütschow und Daniel Wolter für die Unterstützung bei der Präparation histologischer Schnitte,
- Prof. Dr. Martin Köckerling für die Möglichkeit der Durchführung von Pulverdiffraktometrie in seiner Arbeitsgruppe und für hilfreiche Diskussionen,
- Dr. Marga-Martina Pohl für die Arbeiten am hochauflösenden JEM-AMR200F Feldemissionstransmissionselektronenmikroskop am LIKAT,
- PD Dr. Ulrich Beck für die Möglichkeit der Aufnahme von rasterelektronenmikroskopischen Bildern am hochauflösenden Feldemissionsrasterelektronenmikroskop SUPRA 25 in seiner Arbeitsgruppe Grenzflächenanalytik am Institut für Gerätesysteme und Schaltungstechnik,
- Angela Weihs für die Durchführung der IR-Messungen,
- Roland Weihs und Patrick Quade für die zuverlässige Umsetzung von Aufträgen,
- den Mitarbeitern der mechanischen Werkstatt für die zuverlässige Umsetzung von Aufträgen,
- Georg Rogasch für die Programmierung der MATLAB-Software zur Differenzdruckmessung und Stefan Flor für die zuverlässige Rechnerbetreuung,
- die Firma ARTOSS GmbH für eine komplikationsfreie Kooperation und Bereitstellung der Technologie,
- Kerstin Sperber und Produktionsmitarbeitern für die Unterstützung bei Temperaturbehandlungen von Proben und der Herstellung der Sole,
- Jacqueline Holm, Sabine Hintze und Birgit Lechelt für den Einsatz bei der Durchführung von Fällungsexperimenten,
- und Sonja Brüsch für die Vorarbeiten bei Sprühtrocknungsversuchen.

Besonderer Dank gilt aber meinen Eltern und meiner Oma, die durch die finanzielle Unterstützung wie auch die Freiheit der Studienwahl und des Studienfaches, mir den Abschluss erst ermöglichten.

PUBLIKATIONEN

1. Xu W., Ganz C., Weber U., Adam M., Holzhüter G., Wolter D., Frerich B., Vollmar B., Gerber T. *Evaluation of injectable silica-embedded nano-hydroxyapatite bone substitute in a rat tibia defect model*. International Journal of Nanomedicine (2011), 6:1543-1552.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation

**Calciumorthophosphate mit
kontrollierter Kristallmorphologie
und ein injizierbares, poröses Biomaterial:
Materialentwicklung und Charakterisierung**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe und die den benutzten Werken inhaltlich und wörtlich entnommen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.