

Aus dem Max-Planck-Institut für Kolloid- und
Grenzflächenforschung

Kolloidales Calciumphosphat mit polymeren Additiven: Struktur und Dynamik

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
in der Wissenschaftsdisziplin Physikalische Chemie

eingereicht an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Potsdam

von
Anna Peytcheva
geboren am 20.01.71 in Sofia, Bulgarien

Golm, im Mai 2000

Inhaltsverzeichnis

□		
1	Einleitung	4
□		
2	Biomineralisation und Biomimetik	6
□		
3	Das kristalline Calciumphosphat	14
□		
4	Polyaspartat und Rinderserum-Albumin	17
□		
5	Analytische Methoden	18
□		
5.1	Streumethoden	18
□		
5.1.1	Streuung elektromagnetischer Wellen	18
5.1.2	Elastische Lichtstreuung an verdünnten Systemen	23
5.1.3	Auswertung der SLS	24
5.1.4	Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)	30
5.1.5	Weitwinkel-Röntgenstreuung (WAXS)	30
5.1.6	Quasielastische Lichtstreuung	33
5.2	Abbildende Methoden	36
5.2.1	Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie	36
5.2.2	Polarisationsmikroskopie	38
5.2.3	Atomkraftmikroskopie (AFM)	39
6	Fällungsversuche am makrokristallinen System Brushit	42
6.1	Homogene Nukleierung von Calciumphosphat aus übersättigter wäßriger Lösung	42
6.1.1	Fällung im Doppel- <i>Jet</i> -Reaktor	43

6.2	AFM an Brushit in Lösung unter Zugabe von Polymeren	47
6.2.1	Auflösung von Brushit in Wasser	47
6.2.2	Auflösung von Brushit in Polyaspartatlösungen	49
6.2.3	Auflösung von Brushit durch andere Zusätze	51
7	Kolloidale Calciumphosphat-Dispersionen	56
□		
7.1	Herstellung der Calciumphosphat-Dispersionen	58
□		
7.2	Ergebnisse für Pasp18	59
7.2.1	Streuung an den Pasp18-Dispersionen	61
7.2.1.1	DLS-Ergebnisse	62
7.2.1.2	SLS- und SAXS-Messungen	64
7.3	Ergebnisse für Pasp10 aus Streuexperimenten	70
7.4	Abbildungen von Polyaspartat-Calciumphosphat-Dispersionen	72
7.5	Zusammenfassung der bisherigen Experimente an Dispersionen und Deduktionen	76
□		
7.6	Das Triple-Jet-Experiment	78
□		
8	Die Polyaspartat-Calcium-Systeme	81
□		
9	Modell für die Polyaspartat-Systeme	82
□		
10	Vergleich mit BSA-Calciumphosphat-Systemen	86
11	Zusammenfassung und Ausblick	89
	Danksagung	92
	Literatur	93

1 Einleitung

Die Untersuchungen von Mineralisationsprozessen in lebenden Organismen haben ihren Ursprung in der zweiten Hälfte des neunzehnten und im Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts. Forscher wie Häckel, Grobben oder Huxley schufen durch die Erfassung und systematische Beschreibung von Organismen ein festes Fundament, auf dem sich unter anderem der Zweig der Biomineralisation und in neuester Zeit auch der Biomimetik entwickeln konnten. Eine große Herausforderung bestand darin, mit den zur Verfügung stehenden Mitteln, hauptsächlich dem Lichtmikroskop, mineralische Bestandteile im Organismus zu erkennen und sie kristallographisch einzuordnen.

Mit der Einführung der Röntgenstreuung als Instrument zur Strukturanalyse begann in den 30er Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts eine neue Ära für die Biomineralisation. Unterstützt wurde der Fortschritt durch die Entwicklung leistungsfähiger Lichtmikroskope sowie innovativer Präparationstechniken in der Hystologie. Geleitet von der Notwendigkeit zur Aufklärung von Krankheiten konzentrierte sich die Aufmerksamkeit zunächst auf Wirbeltiere, bis sich in den 60er Jahren herauskristallisierte, daß sie nicht wesentlich komplexer als Säugetiere sind. Die darauffolgende Einschränkung des Untersuchungsfeldes fiel zusammen mit dem Aufkommen der Biochemie, die die Möglichkeit zur Analyse der an der Biomineralisation beteiligten Makromoleküle gab. Hinzu kam die Entdeckung wichtiger Hormone, die an Regulationsprozessen in der Biomineralisation beteiligt sind. Heute ist eine Entkopplung der in der Zelle ablaufenden Biochemie von der Beschreibung der kristallinen Komponenten in ihr undenkbar. In der Komplexität der Systeme liegt ihre Faszination. Sie äußert sich in einer Organisation auf verschiedenen Stufen und einer Flexibilität gegenüber der sich ständig verändernden Umgebung.

Ein tiefes Verständnis der Abläufe in mineralisierenden biologischen Systemen ist nur durch das Zusammenwirken von mehreren Forschungsfeldern wie der Kristallographie, Stereochemie, Mineralogie und Geochemie einerseits und der Biochemie, Molekular- und Zellbiologie andererseits zu erreichen. Demgegenüber steht ein breites Spektrum an Wissenschaften, für die Erkenntnisse aus der Biomineralisation von großem Interesse und Nutzen sind. Dazu gehören die Orthopädie und Zahnmedizin, aber auch Archäologie und Oceanographie. Natürlich

nimmt die Materialforschung einen ganz wichtigen Platz in dieser Reihe ein. Die Aufklärung des Aufbaus hochoptimierter Materialien aus der Natur ist der Grundstein für den weiteren Fortschritt vieler Technologien. Verfahren zur Untersuchung der Struktur von natürlichen Kompositmaterialien auf allen Längenskalen kommt deshalb eine besondere Bedeutung zu.

In der vorliegenden Arbeit kommen einige dieser Verfahren zur Anwendung. Ziel ist es, eine Beschreibung der Struktur und Dynamik des gewählten Systems auf verschiedenen Skalen zu liefern. Der Gegenstand der Untersuchung ist ein zweikomponentiges System aus einem organischen und einem anorganischen Anteil. Das anorganische Calciumphosphat, das hier untersucht wird, ist ein in Lebewesen weit verbreitetes. Weiterhin ist der Einfluß, den ein biogenes Makromolekül wie das Rinderserum-Albumin auf das Mineral nimmt, von Interesse für die Biomineralisation. Als Modell für carboxylhaltige Proteine, die an der Mineralisierung *in vivo* beteiligt sind, dienen Polyaspartate mit verschiedenen Molekulargewichten.

Im zweiten Kapitel der Arbeit wird zunächst auf Grundkonzepte aus der Biomineralisation und Biomimetik eingegangen. Derzeitige aktuelle Modelle für Mineralisationsmechanismen werden vorgestellt. Neue Ergebnisse in der Herstellung außergewöhnlicher Materialien nach bekannten Gesetzen biologisch kontrollierter Fällung sind zu nennen. Gleichzeitig zeigen sich die Grenzen der Möglichkeiten, diese hochkomplizierten Systeme genügend zu erfassen und zu verstehen.

In Kapitel 3 wird die für die Experimente gewählte anorganische Komponente Calciumphosphat hinsichtlich kristallographischer Merkmale besprochen. Es schließt sich ein kurzes Kapitel mit Angaben über die verwendeten Polymere an, in dem besonders deren Struktur von Interesse ist.

Das fünfte Kapitel enthält eine Darstellung der angewandten analytischen Methoden im Rahmen dieser Arbeit. Ein Schwerpunkt liegt auf Streumethoden, die anschließend durch abbildende ergänzt werden. Vor- und Nachteile der einzelnen Verfahren werden herausgestrichen.

Kapitel 6 stellt Ergebnisse aus Experimenten mit makrokristallinem Calciumphosphat. Dessen Veränderung unter Zugabe von wäßrigen Lösungen der verschiedenen Polymere wird mittels Atomkraftmikroskopie untersucht.

Kapitel 7, 8 und 11 beschäftigen sich mit in Polymerlösungen dispergierten Calciumphosphat-Kolloiden. Eine umfassende Charakterisierung der Dispersionen

bezüglich ihrer Struktur wurde angestrebt. Andererseits besitzen diese Systeme eine charakteristische Dynamik auf verschiedenen Zeitskalen, die mit der Entstehung von deren Struktur korreliert werden kann.

Den Schluß bilden eine Zusammenfassung und der Ausblick.

2 Biomineralisation und Biomimetik

Als Biomineralisation bezeichnet man die Entstehung von strukturierter anorganischer Materie in biologischer Umgebung. Kompositmaterialien, die organische mit anorganischer Phase vereinen, werden auf diese Weise in lebenden Organismen hergestellt. Ihre außerordentlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften verdanken sie sowohl dem Verbund aus Organikum und Mineral als auch seiner hierarchischen Strukturierung auf unterschiedlichen Größenskalen. Daraus resultiert eine enorme Anpassungsfähigkeit und die Möglichkeit zur Materialoptimierung unter Druck und Scherkräften. Ebenso bestechen Biomineralien durch ihre außergewöhnlichen Formen, die nichts mit der strengen Geometrie einer Einheitszelle im kristallinen Festkörper gemein haben.

In lebenden Organismen vorkommende Mineralien sind nur wenige anorganische Systeme wie Calciumcarbonat, Calciumphosphat oder hydratisiertes Siliciumdioxid, die zum Aufbau von Schuppen, Stacheln, Muscheln, Schneckengehäusen oder Endoskeletten eingesetzt werden¹. Die mineralischen Anteile werden oft innerhalb einer organischen Proteinmatrix abgeschieden, die ihrerseits eine ganze Reihe von Funktionen erfüllt. Beide Komponenten agieren nicht unabhängig voneinander. Ziel der Forschung ist es, die Gesetze dieser Wechselwirkungen offenzulegen.

Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist das Anorganikum Calciumphosphat in seinen Modifikationen Brushit (DCPD) und Hydroxyapatit (HAP) und die Gesetze, denen die Kontrolle über seine Nukleierung und sein Wachstum durch organische Zusätze folgt.

Die *in vitro*-Calcifizierung beginnt mit der Formung einer Precursorphase, die bei genügend hoher Übersättigung amorph ist. 1nm-Cluster der Zusammensetzung $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ aggregieren zu größeren sphärischen Packungen mit Durchmessern von 30-100nm, die viel Wasser enthalten. Unter Normalbedingungen transformiert diese Phase zu HAP. Die erste kristalline Phase, die *in vitro* bei $\text{pH} < 4,2$ und hoher

Übersättigung entsteht, ist Brushit². Für die *in vivo*-Calcifizierung ist dagegen die Existenz einer amorphen Precursorphase in der Literatur nicht überzeugend nachgewiesen. Einige Erkenntnisse über Calcifizierung in lebenden Organismen sind jedoch bereits gesichert.

In vivo fällt oft zuerst Octacalciumphosphat (OCP) aus und wird dann in HAP umgewandelt³, das als plättchenförmiges Teilchen vorliegt. Diese Form von HAP-Kristalliten in biomineralisierten Systemen hat sehr viel weniger mit der hexagonal gepackten Einheitszelle von kristallinem HAP und vielmehr mit der Schichtstruktur von OCP gemein.

Es ist seit langem bekannt, daß Blutultrafiltrat eine genügend hohe Übersättigung für die Entstehung von HAP aufweist⁴. Diese reicht jedoch nicht aus, um löslichere Calciumphosphatphasen zu nukleieren, die als Precursor für eine Neuentstehung von HAP notwendig sind. Grund dafür ist der energetische Unterschied zwischen der stabilsten HAP-Phase und der löslichsten Precursorphase, dem amorphen Calciumphosphat, auf den im folgenden Kapitel eingegangen wird. Verschiedene Theorien versuchen, auf die Frage zu antworten, wie eine Kristallisation trotzdem initiiert werden kann.

Die Booster-Theorie fordert eine lokale Erhöhung des Ionenproduktes, damit die erste feste Phase nukleiert werden kann. Ein möglicher Weg dazu ist die Hydrolyse von Phosphatestern durch alkalische Phosphatase-Enzyme, welche immer bei der Analyse von Produkten biologischer Calcifizierung nachgewiesen wurden⁵. Andererseits kann ein zellulärer Prozess dafür verantwortlich sein, der den Transfer von Ca^{2+} -Ionen durch eine Membran bewerkstelligt, wie das der Fall bei Mitochondrien ist.

Die Nukleierungstheorie andererseits postuliert, daß eine heterogene Nukleierung an der organischen Matrix von biogenen Kompositmaterialien stattfindet. Diese kann durch die präferentielle Bindung von Ca^{2+} -Ionen erreicht werden⁶. Zusätzlich kann eine Sekundärphase auf einer primären anorganischen nukleiert werden, wie das z.B. bei Urinsteinen der Fall ist⁷.

Nach der Inhibierungstheorie kann die Neuentstehung einer mineralischen Phase auch verhindert werden, indem entweder der Zugang von Ionen aus der Lösung zu Orten der möglichen Nukleierung versperrt wird oder Inhibitoren eingesetzt werden, die ebenfalls oft in biologischen Systemen nachzuweisen sind. Das können Pyrophosphate, Citrate und Magnesium, Albumin oder Statherin sein^{8,9}.

Aus dieser Überlegung heraus muß der Aspekt der Kinetik solcher Prozesse eingeführt werden, welche beispielsweise von der Mobilität der in Lösung befindlichen Ionen mitbestimmt sein kann. Zunächst richtet sich jedoch die Aufmerksamkeit auf die Rolle der organischen Matrix für die Biomineralisation.

Eine komplexe Analyse der unlöslichen organischen Matrix biomineralischer Kompositmaterialien zeigt, daß Glycin und Alanin meist 30-60% der Aminosäurereste der Proteine darstellen. WAXS-Messungen geben den Hinweis, daß in diesem Fall die Matrix nach der Trocknung in einer β -Faltblatt-Konformation vorliegt¹⁰. Durch ihre hydrophobe Oberfläche kann sie keine Nukleierung einer mineralischen Phase in Gang setzen, jedoch bilden die hydrophoben Taschen auf ihrer Oberfläche 3-dimensional begrenzte konkave Räume¹¹ für ein Kristallwachstum. Die Nukleierung erfolgt eher an Proteinen aus der sogenannten löslichen Matrix, die an die unlösliche Matrix stellenweise gebunden sind. In ihnen machen Asparagin, Serin und Glycin 60-70% der Aminosäuren-Bausteine aus. All die hier vertretenen Proteine zeichnen sich durch einen hohen Gehalt an Bindungsstellen für Calcium aus, deren Bindungskonstanten in einem weiten pH-Bereich unverändert bleiben. Untersuchungen lassen schließen, daß diese lösliche Matrix der Ort der Nukleierung für die mineralische Phase ist¹². In wäßriger Lösung inhibieren diese Proteine die Ausbildung der kristallinen Phase, obwohl eine ausreichende Übersättigung für diese vorhanden ist. Dagegen können sie, immobilisiert auf einer Oberfläche, eine Nukleierung induzieren¹³. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in vivo gleichzeitig beide Funktionen vom Protein ausgeführt werden. Glykoproteine andererseits können auf wachsende Kristalloberflächen adsorbieren, da diese eine sehr hohe lokale Konzentration an Calciumionen aufweisen, und somit das weitere Wachstum dieser Flächen inhibieren. Die Aminosäure-Reste, die nicht adsorbiert, sondern der freien Lösung zugewandt sind, können ihrerseits sekundär eine lokale Übersättigung von Ca^{2+} -Ionen erzeugen, an die beispielsweise Carbonationen kondensieren und somit ein neuer Kristallit nukleiert.

Addadi et al.¹⁴ heben zwei Betrachtungsweisen der Kontrollmechanismen in der Biomineralisation hervor, die komplementär und einander ergänzend herangezogen werden können.

- 1) Das kinetische Bild folgt der Adsorption von Polymeren an unterschiedliche Kristalloberflächen. Es stellt sich die Frage, wie selektiv dieser Vorgang ist. Allein die Adsorption blockt den Zugang von Ionen zu der Oberfläche und damit ihr

Wachstum ab – das ist ein nichtselektiver Prozeß. Die Selektivität kann durch spezifische Wechselwirkungen eingeführt werden – stark carboxylhaltige Polymere blocken erwiesenermaßen das Kristallwachstum besonders effektiv. Die Adsorptionsdynamik kann untersucht werden.

- 2) Das stereochemische Bild berücksichtigt ein strukturelles „*matching*“ zwischen Kristalloberfläche und Polymer in seiner spezifischen Sekundärstruktur. So wurde nachgewiesen, daß auf ein Substrat adsorbiertes Polyaspartat, welches größtenteils als β -Faltblatt vorliegt, einheitlich ausgerichtete Calcitkristallite nukleiert, was für Polyglutamat, das in diesem Fall eine *coil*-Konformation beibehält, nicht der Fall ist.
- 3) Als Drittes muß natürlich im Kontext der Biomineralisation die Frage nach kooperativen Effekten gestellt werden, da ja die untersuchten Systeme nicht nur eine Polypeptidsorte einschließen, sondern sich gerade durch die Zusammenwirkung mehrerer Proteine auszeichnen. Arbeiten hierzu zeigen, daß die Wirkung zweier Polypeptide nicht zwingend der Summe der Effekte jedes einzelnen Peptides entspricht¹⁵.

Mann¹⁶ geht präzise auf die Frage ein, welche Rolle der Kinetik der Mineralisationsprozesse zukommt und wie dies mit dem molekularen Bild des Proteins vereinbar ist.

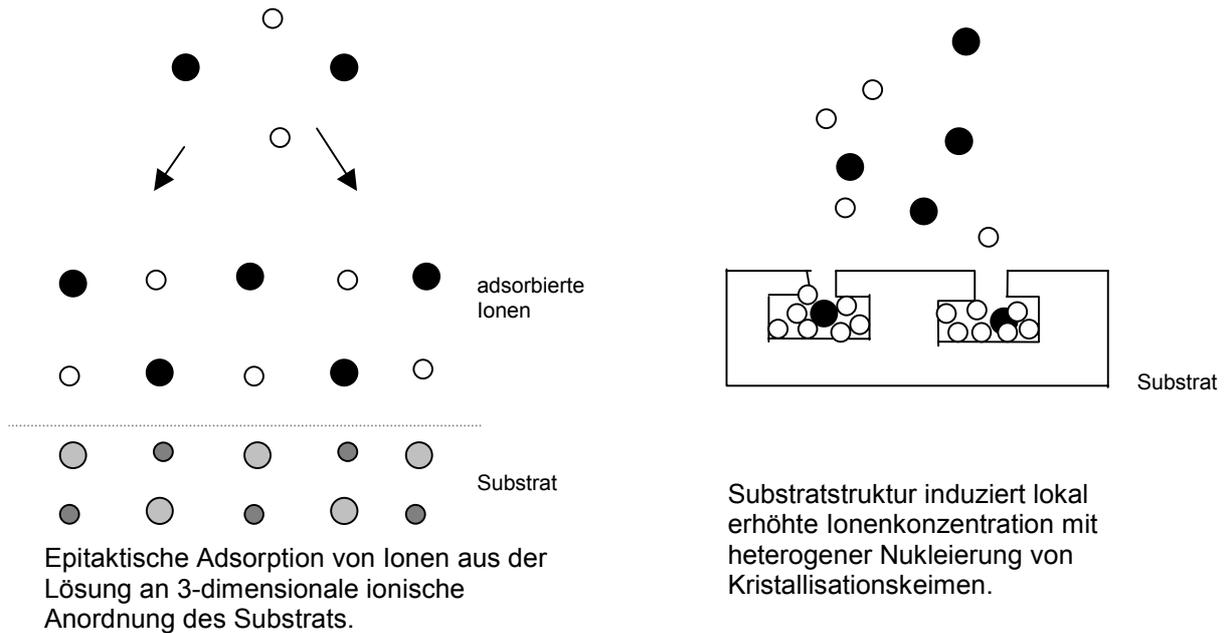
Nach der klassischen Nukleationstheorie führt die homogene Nukleierung in übersättigter Lösung spontan zur Entstehung von Kristallisationskeimen der mineralischen Phase¹⁷. Das Wachstum des einzelnen kristallinen Partikels geschieht durch Sekundärnukleierung an Stufen und Spalten auf seiner Oberfläche. Demgegenüber steht die Kristallisation aus einer Precursorphase, die durch Transport der Ionen von einer Phase zur anderen oder durch Umordnung innerhalb der Precursorphase stattfinden kann. Ein besonders gutes Beispiel ist hier das System Calciumphosphat.

Das makroskopische Erscheinungsbild des Kristalls ist bestimmt durch die Wachstumsraten seiner Flächen in den unterschiedlichen kristallographischen Richtungen. Die am langsamsten wachsenden Flächen dominieren seine Form. Hydroxyapatit wächst *in vitro* am schnellsten entlang seiner kristallographischen c-Achse, weshalb diese Modifikation makroskopisch als feine lange Nadeln erscheint. Bei Brushit dagegen ist das Wachstum entlang dieser Achse gerade am langsamsten, so daß es makroskopisch in Form dünner Blättchen vorliegt. Flächen,

die am langsamsten wachsen, haben die niedrigste freie Energie. Die Gleichgewichtsform bildet somit direkt die Stabilitätsverhältnisse der kristallinen Phase in drei Dimensionen ab.

An dieser Stelle wird unterschieden zwischen Kontrolle des Kristallwachstums durch Adsorption von Additiven an wachsende Kristalloberflächen und templatierem Wachstum, wobei zu betonen ist, daß die Templatierung nicht unbedingt epitaktisch zu sein braucht. Die spezifische oder die unspezifische Adsorption von Additiven an Kristalloberflächen greift in den natürlichen Kristallwachstumsprozeß derart ein, daß der Zugang von Ionen aus der Lösung zu diesen Kristalloberflächen versperrt wird. Das hat zur Folge, daß kein Zuwachs an der Oberfläche des Kristalls mehr stattfinden kann und er seinen Gleichgewichtszustand durch Diffusion von Ionen innerhalb der kristallinen Phase und somit einer inneren Umstrukturierung erreicht. Auf diese Weise ist die höchste Ordnung bei minimaler freier Energie der festen Phase gegeben.

Ein templatenspezifischer Nukleations- und Wachstumsmechanismus für die kristalline Phase äußert sich in einer Diversifizierung der Erscheinungsform des Kristalls. Abhängig davon, wie stark die Wechselwirkungen zwischen der templatierenden Matrix und den Ionen aus der Lösung sind, wird auch die Aktivierungsenergie für die Nukleierung herabgesetzt¹⁸. Sie wird es natürlich um so mehr, je besser die Struktur der organischen Oberfläche der des Kristalls ähnelt, d.h. Nukleierung einer bestimmten Modifikation ist begünstigt durch entsprechende Anordnung der Ionen am organischen Substrat. Ein gutes Beispiel dafür ist das Wachstum von Aragonit auf der Proteinmatrix einer Muschelschale¹⁹. Ein solches epitaktisches Wachstum einer Kristallmodifikation auf einem Substrat wird eingeleitet durch selektive Adsorption von Ionen an die geordnete Substratoberfläche. Untersuchungen haben aber gezeigt, daß eine Epitaxie nicht unbedingt erforderlich ist, um eine substratgesteuerte vektorielle Kristallisation zu induzieren. Zwei weitere Mechanismen können in Gang gesetzt werden. Die Substratoberfläche kann so gestaltet sein, daß sie lokal eine Erhöhung der Ionenkonzentration hervorruft und somit die Bildung von Kristallisationskeimen begünstigt, die nicht unbedingt mehr epitaktisch auf der Oberfläche wachsen. In analoger Weise können statt der einzelnen Ionen vorher schon ausgebildete Kristallite geordnet und ausgerichtet an die Matrix adsorbieren. Die ersten zwei Mechanismen sollen in der folgenden Abbildung veranschaulicht werden.



Als Substrat kann die Matrix vektorielle Eigenschaften der auf ihrer Oberfläche nukleierenden Kristallite beeinflussen, d.h. deren Größe und Ausrichtung. Beispielhaft für diesen Vorgang ist die Mineralisation von Apatiten im Knochen, bei der ca. 100nm große Apatitkristallite entlang einer Kollagenmatrix geordnet und mit ihrer kristallographischen c-Achse parallel zu den Kollagenfasern ausgerichtet sind.



Andererseits kann eine geordnete Aggregation von gleichgearteten mineralischen Bausteinen stattfinden, wenn jeder einzelne Baustein von der organischen Phase stabilisiert und diese ihrerseits wie eine Art Klebstoff wirkt, um die Bausteine zusammenzufügen²⁰. Ein Beispiel aus der Natur ist die Ausbildung langer Ketten von Magnetitkristallen in magnetotaktischen Bakterien. Das Magnetit fällt in Membranvesikeln aus, die begrenzte Reaktionsräume darstellen und perlenkettenartig zueinander angeordnet sind²¹.

In biologischen Systemen lassen Kristalle in ihrer makroskopischen Erscheinungsform wenig Gemeinsamkeiten mit der zugrundeliegenden atomaren Anordnung erkennen. Die Regulationsmechanismen solch komplexer Formgebung

dürfen nicht nur vom Standpunkt des thermodynamischen Gleichgewichtes betrachtet werden, sondern ebenso als eine Abfolge kinetisch gesteuerter Prozesse. Ein Wechselspiel beider Faktoren führt dazu, daß thermodynamisch instabile Zustände plötzlich stabilisiert werden und damit neue Randbedingungen für ein Gleichgewicht schaffen. Das Ergebnis sind Morphologien, die erheblich von der bekannten eines im Gleichgewicht aus einer gesättigten Lösung gefällten Festkörpers abweichen. Die Generierung dieser Morphologien muß als ein raumzeitliches Phänomen eingestuft werden. Daher kann das Reaktionsvolumen, in dem biologisch gesteuerte Mineralisation stattfindet, als eine mehrdimensionale Karte umschrieben werden. Jeder ihrer Punkte ist bezüglich seiner chemischen Reaktivität einer zeitlichen Entwicklung unterworfen. Dies ist unmittelbar mit der Funktionsweise lebender Organismen vereinbar, die über bestimmte Zeitspannen oder über ihr ganzes Leben kontinuierlich Metamorphosen durchlaufen.

So ist es unerläßlich, über Ordnung und Periodizität der kristallinen Phase in biologischen Systemen explizit bezüglich bestimmter Raum- und Zeitskalen zu diskutieren. Die hierarchische Organisation von Kristalliten vom Nanometer- bis in den Millimeterbereich spiegelt die Hierarchie in der zeitlichen Abfolge verschiedener Prozesse, die an der Biomineralisation beteiligt sind. Nur durch diese Hierarchie ist zu erklären, daß biologisch mineralisierte Gebilde eine Krümmung aufweisen können.

Es muß also in diesem Zusammenhang die Frage nach vektorielltem Wachstum von Kristalliten gestellt werden. Offenbar repräsentiert deren Erscheinungsform die Organisation der organischen Komponente, die an der Mineralisation im definierten Reaktionsraum beteiligt ist. Das Mineral kann ein Abguß eines geschlossenen, von einer organischen Matrix begrenzten Volumens sein, wie das Beispiel von Diatomeen zeigt¹. Die Nukleierung und das Wachstum des Anorganikums können aber auch ein Wechselspiel mit dem organischen Anteil eingehen, in dem jeweils ein Schritt in der zeitlichen Entwicklung einer der Komponenten eine Antwort in der anderen hervorruft, die ihrerseits den nächsten Entwicklungsschritt für die erste Komponente nach sich zieht. Die treibende Kraft für die Strukturbildung der organischen Matrix und die für die Fällung der kristallinen Phase aus gesättigter Lösung lassen so ein Spannungsfeld entstehen, in dem das vektorielle Wachstum von Biomineralien seinen Lauf nimmt²².

Das Verständnis vom Einfluß, den organische und anorganische Komponente aufeinander nehmen, und die Vorhersehbarkeit seiner zeitlichen Entwicklung bilden die Grundlage für ein komplexes Bild von den Biomineralisationsprozessen und deren Übertragung *in vitro*.

Eine biomimetische Vorgehensweise ist die, die Bedingungen der Biomineralisation nachzuahmen und biomimetische Formen auf direktem chemischen Wege zu realisieren. Das ist z.B. der Fall beim Einsatz von Mizellen als Mikroreaktionsräume oder lyotropen Phasen als Template für Kristallisation²³. Als solche Nanoraktionsräume kommen auch Proteine wie das Ferritin zum Einsatz²⁴.

Beispielsweise ist es möglich, eine geordnete Aggregation von Nanokolloiden, z.B. metallischen, zu erreichen, indem ihre Oberfläche mit einem Antigen belegt wird. Dieses bindet wiederum Antikörper, die sich frei in Lösung befinden. Auf diese Weise lassen sich 2- und 3-dimensionale Matrizen von Kolloiden herstellen, die untereinander mit einem Vermittler nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip verbunden sind. Die Erkennung beider organischen Partner ist hochspezifisch, so daß die Andockungsstelle für Vermittler und von ihm stabilisierte Nanopartikel eindeutig im dreidimensionalen Raum festgelegt und damit die dreidimensionale Anordnung der Kolloide eindeutig und hochsymmetrisch²⁵ ist.

Durch die Nukleierung von Vaterit an den anionischen Kopfgruppen von SDS-Molekülen, die sich an den Grenzflächen einer Wasser-in-Öl-Mikroemulsion befinden, entstehen kugelförmige, kristalline Calciumcarbonatpartikel in der Größe des Wassertröpfchens. Die anorganische Phase ist kein Einkristall, sondern polykristallin²⁶.

Durch die Einwirkung verschieden modifizierter Blockcopolymere werden interessante und ungewöhnliche Morphologien für kristallines Bariumsulfat mit einer Größe im Mikrometerbereich erzielt²⁷. TEM-Untersuchungen zeigen, daß die einzelnen Partikel Überstrukturen aus kleinen Bausteinen darstellen. Eine hochspezifische Kontrolle über die Ausbildung der kristallinen Phase wird auf diese Weise erreicht.

Dies sind nur wenige Beispiele für hochinteressante Ergebnisse aus Experimenten mit einem biomimetischen Ansatz. Jedoch sind die zugrundeliegenden Mechnismen für die Ausbildung solcher Morphologien noch weitgehend unverstanden. Diese Arbeit soll einen Beitrag zu ihrer Aufklärung leisten.

Zunächst wird das System Calciumphosphat, das hier vor einem biomimetischen Hintergrund untersucht wurde, kurz geschildert.

3 Das kristalline Calciumphosphat

In diesem Kapitel soll in Kürze das kristalline Calciumphosphat und sein Verhalten in wäßriger Lösung geschildert werden. Im Anschluß wird das Vorkommen von Calciumphosphat in biologisch mineralisierten Systemen anhand von zwei Beispielen dargelegt.

Calciumphosphat kann in Lösung in vielen Modifikationen vorliegen. Sie können unter anderem durch ihr Löslichkeitsprodukt charakterisiert werden. In der nachfolgenden Tabelle sind einige Modifikationen mit ihren Löslichkeitsprodukten aufgeführt.

Mineral	chemische Zusammensetzung	log K (25°C)
amorph	CaPO_4^-	6
DCPD (Bruschat)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	-6.4
OCP (Octacalciumphosphat)	$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$	-46.9
HAP (Hydroxyapatit)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-59.0

Tab. 1: Kristallmodifikationen von Calciumphosphat und ihre Löslichkeitsprodukte K^{28}

Calciumphosphat bildet Phasen aus, deren Löslichkeiten sich um viele Größenordnungen voneinander unterscheiden. Welche Phase als erste aus einer gesättigten Lösung ausfällt, hängt von der gegebenen lokalen Übersättigung ab. Je höher sie ist, desto schneller entsteht eine feste Phase, und desto mehr Lösungsmittelmoleküle enthält sie. Im Grenzfall sehr hoher Übersättigung wird zuerst amorphes Calciumphosphat gebildet. In wäßriger Lösung versucht das System allerdings stets, einen Zustand minimaler freier Energie zu erreichen. Es wird also sukzessive eine Umwandlung in die stabilste Calciumphosphat-Modifikation, d.h. Hydroxyapatit durchlaufen. Nur durch Änderung der Lösungsmiteigenschaften, z.B. dem pH-Wert, kann eine der intermediären Phasen stabilisiert werden².

Unter Normalbedingungen, wie sie bei allen hier vorgestellten Experimenten gegeben sind, entsteht bei einer Fällung von Calciumphosphat in der Konzentration 0,5 Mol/l in reinem Wasser immer zuerst eine amorphe Phase, die sich auflöst, um dünne Bruschitplättchen zu bilden. Dieser Prozeß ist nach ca. 3 Stunden abgeschlossen. Im Laufe der folgenden 24 Stunden wandelt sich Bruschit wiederum durch Auflösung in feine, dünne Hydroxyapatitnadeln um, die die Gleichgewichtsmodifikation darstellen. Der letzte Schritt ist in Bildern festgehalten, die im Lichtmikroskop unter gekreuzten Polarisatoren aufgenommen wurden.

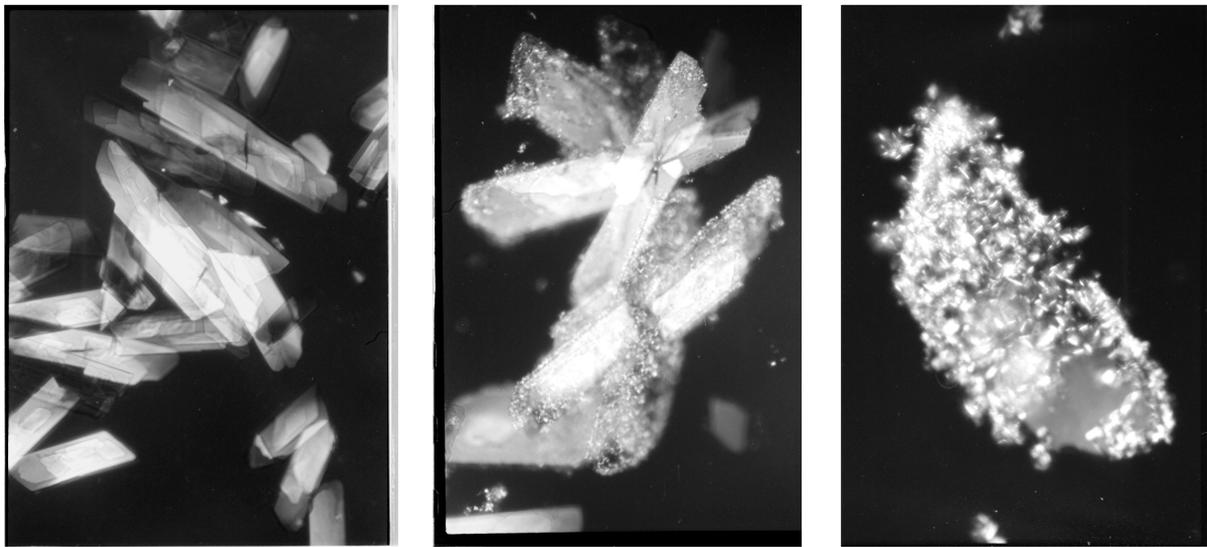
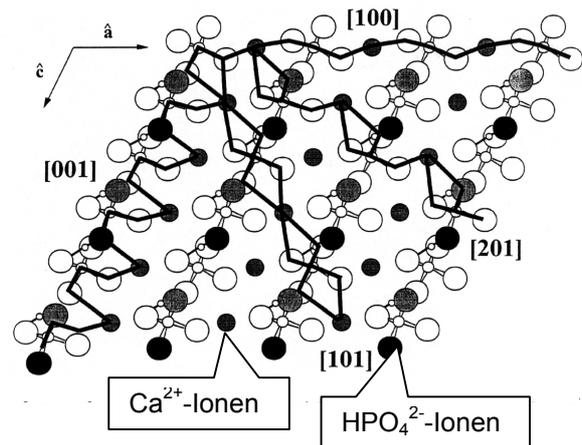


Abb.1: Im polarisationsmikroskopischen Bild links sieht man die Bruschitplättchen mit einer Länge von ca.1mm. Nach einigen Stunden sind diese mit schwächerem Kontrast zu sehen. Auf ihrer Oberfläche bilden sich Nadeln aus, die aus der Beobachtungsebene heraus zeigen (Bild Mitte). Im letzten Bild (ganz rechts) sind fast keine Bruschitanteile mehr zu erkennen, sondern nur noch Nadeln, die aggregiert vorliegen. Die verschiedenen Modifikationen lassen sich anhand von WAXS-Daten identifizieren.

Das makroskopische Erscheinungsbild der einzelnen Phasen läßt sich, wie oben zu sehen, mit der atomistischen Struktur der vorliegenden kristallinen Phase korrelieren. Dieser Zusammenhang ist gegeben, wenn die Flächen höchster Energie am schnellsten wachsen. Ohne Zusätze sollte das in wäßriger Lösung der Fall sein. Die erste kristalline Phase, die aus dem amorphen Vorläufer entsteht, ist Bruschit. Es hat eine $I2/a$ -Symmetrie der Einheitszelle und bildet die sogenannten Wellblattstrukturen aus. Die folgende Abbildung zeigt eine Aufsicht von der (010)-Ebene, die ein solches Wellblatt darstellt.

Abb.2: (010)-Ebene des Brushit. Eine Monolage hat die Dicke von 7Å. Je zwei der vier Sauerstoffatome der Phosphationen, die hier schwarz hervorgehoben sind, sind mit Wasserstoffbrücken stabilisiert, weshalb die S_y gebrochen ist. Die Verbindungslinien verlaufen entlang



Das Octacalciumphosphat weist ebenfalls eine geschichtete Struktur mit einer $P6_3$ -Symmetrie auf, die viel mit der Struktur von Hydroxyapatit gemein hat. Die OCP-Struktur wird auch geschichtete defekte Apatitstruktur genannt, da sie aus abwechselnd einer Apatit- und einer Wasserschicht besteht²⁹. Würde die Wasserschicht mit Ca^{2+} -Ionen aufgefüllt werden, entstünde Hydroxyapatit. Die Abbildung veranschaulicht diese Schichtstruktur in der Draufsicht.

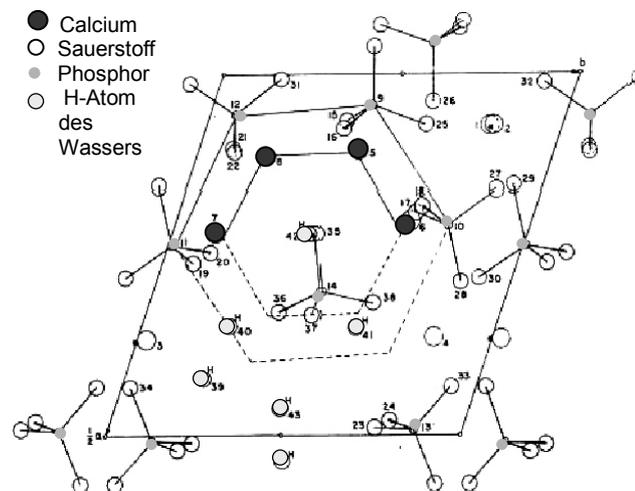


Abb. 3: Projektion der Struktur von OCP entlang der kristallographischen c -Achse. Das größere Hexagon bezeichnet die Positionen von Phosphatatomen im HAP, das kleinere – von Calciumatomen. Nur vier dieser sechs Positionen sind im OCP besetzt. Die fehlenden zwei Calciumionen sind durch Wassermoleküle ersetzt.

Die stabilste Modifikation Hydroxyapatit besitzt eine $P6_3$ -Symmetrie mit einer hexagonal dichtesten Packung. Das schnellste Wachstum erfolgt entlang der kristallographischen c -Achse. Die (001)-Ebene ist die mit niedrigster Stabilität,

weshalb die Gleichgewichtsform der Kristalle von allen anderen Flächen dominiert wird. Makroskopisch sind in der Folge nadelähnliche Gebilde zu sehen.

Zwei Beispiele für biologische Systeme, in denen Calciumphosphat anzutreffen ist, werden nun kurz umrissen.

- In Knochen liegt Calciumphosphat als Hydroxyapatit vor. Das System, das hauptsächlich die Knochensubstanz ausmacht, ist Kollagen-Proteoglycanen-Hydroxyapatit. Es ist hierarchisch organisiert und äußerst flexibel. Es reagiert auf Druckänderungen mit Umwandlung oder Auflösung der Calciumphosphatphase. So können bei Bedarf Ca^{2+} -Ionen abgegeben werden. Die HAP-Plättchen sind bis 100nm groß und entlang der Kollagenfasern ausgerichtet, die eine Matrix bilden. Proteoglycanen sind Glykoproteine mit einem hohen Gehalt an Glutamat- und Aspartatreste. Sie wechselwirken sowohl mit der Kollagenmatrix als auch mit der mineralischen Phase und übernehmen somit die Rolle eines Informationsvermittlers im System.
- Im Zahnschmelz liegt Calciumphosphat als Hydroxyapatit vor, allerdings bildet es dünne Stäbchen aus, die eine Länge von 100µm erreichen können. Die organische Phase besitzt keine Matrixstruktur, obwohl die Nukleierung der HAP-Stäbchen kontrolliert und gitterartig an Zelloberflächen – dem sogenannten Tomes-Prozeß³⁰ - erfolgt. Im Laufe der Mineralisierung wird diese hier im Unterschied zum Knochen abgebaut, um der mineralischen Phase Platz zu machen.

Calciumphosphat wird in den im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Experimenten der Einwirkung von Polyaspartat (Pasp) und Rinderserum-Albumin (BSA) unterzogen und analysiert. Die Polymere sind nachfolgend kurz vorgestellt.

4 Polyaspartat und Rinderserum-Albumin

Thermisch polymerisiertes Polyaspartat wurde von der Firma Rohm & Haas für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Es liegt in den Molekulargewichten 18000g/mol und 10000g/mol vor.

Monomere der Asparaginsäure werden zu Polysuccinimid thermisch polymerisiert, das hydrolysiert wird, um schließlich in das Natriumsalz des Polyaspartats

überzugehen^{31,32}. Dabei entstehen sowohl α - als auch β -Isomere, d.h. das Polymer kann sowohl linear wie auch verzweigt vorliegen³³.

Die Sekundärstruktur dieser Polymere kann eine helikale, aber ebenso eine β -Faltblatt-Struktur oder Knäuel sein³⁴. Helices und β -Faltblätter können durch die Zugabe von Ca^{2+} -Ionen stabilisiert werden. Für modifizierte Polyaspartate mit kurzen Alkyl-Seitengruppen ist die Bildung von Helices bereits bekannt³⁵.

Rinderserum-Albumin (SIGMA-Chemicals) mit einem Molekulargewicht von 66000g/mol wurde in einer Pufferlösung bei pH 5,5 aufbewahrt. Das Monomer liegt unter diesen Bedingungen als prolates Ellipsoid vor³⁶. Die Achsen haben eine Länge von ca. 4nm und ca. 14nm. Es besteht aus drei aneinandergereihten sphärischen Subdomänen. Dieses Molekül zeichnet sich durch eine besonders hohe Flexibilität aus, die es erlaubt, sich äußeren Bedingungen schnell anzupassen. Diese Fähigkeit führt zu einer der wichtigsten Funktionen von Albumin im Blutserum: der reversiblen Bindung und dem Transport von verschiedenartigen Liganden, unter anderem pharmazeutischen Wirkstoffen. Durch seinen hohen Gehalt an Carboxylgruppen ist BSA ebenso wie Polyaspartat besonders gut zur Wechselwirkung mit Ca^{2+} -Ionen geeignet.

5 Analytische Methoden

5.1 Streumethoden

5.1.1 Streuung elektromagnetischer Wellen

Durch die Polarisierbarkeit ihrer Elektronenhüllen können in Molekülen Dipole induziert werden, sobald ein elektrisches Feld angelegt wird. Eine Lichtwelle ist ein solches periodisches Feld mit der elektrischen Feldstärke

$$E = E_0 \cdot \exp(i(kx - \omega t)) . \quad (1)$$

Dabei ist k die Wellenzahl, ω die Kreisfrequenz, x die Ortskoordinate in Ausbreitungsrichtung und t die Zeit. Das Molekül selbst verhält sich dann wie ein gedämpfter harmonischer Oszillator unter dem Einfluß einer periodischen

Antriebskraft. Das System hat eine Resonanzfrequenz ω_R , die gleich der der Elektronen aus den äußeren Schalen ist und im UV-Bereich liegt.

Aus den Maxwell-Gleichungen läßt sich die Frequenzabhängigkeit des Realteils (absorptiv) und des Imaginärteils (dispersiv) der optischen Konstanten (Brechungsindex) n für den gedämpften Oszillator ableiten. n' und n'' sind in der folgenden Abbildung in Abhängigkeit von der Anregungsfrequenz des eingestrahnten Lichtes ω relativ zur Resonanzfrequenz ω_R aufgetragen:

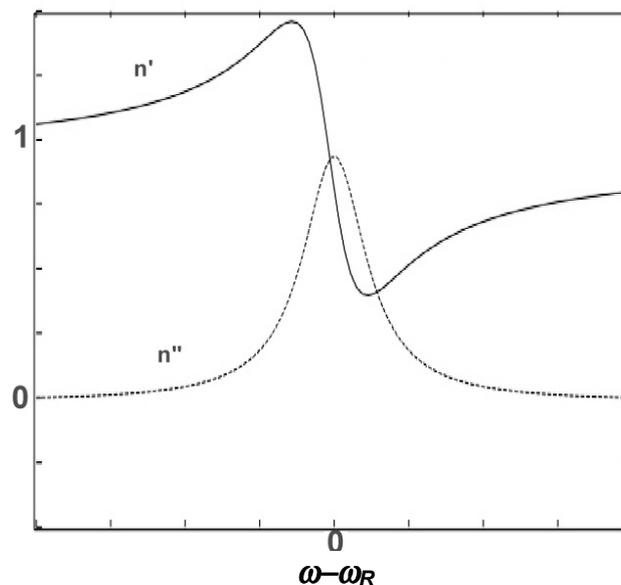


Abb. 4: Frequenzabhängigkeit des Real- und Imaginäranteils der optischen Konstanten n .

In der Lichtstreuung befindet man sich im sogenannten Rayleigh-Limit, d.h. $\omega \ll \omega_R$. Das bedeutet, daß $n' \geq 1$ und $n'' = 0$. Für die Streuintensität I eines Hertz'schen Dipols der makroskopischen Polarisierbarkeit α gilt in diesem Fall:

$$\lim_{\lambda \gg \lambda_R} I = \frac{16\pi^2 \alpha^2}{\lambda^2 (r_{DD})^2} \langle \cos^2 \theta \rangle. \quad (2)$$

λ ist die Wellenlänge im Vakuum, r_{DD} der Abstand Dipol-Detektor, in dem das Feld betrachtet wird. Der Term $\langle \cos^2 \theta \rangle$ ist eine Funktion der Polarisation des einfallenden Lichtes.

Die Wellenzahl k aus der Gleichung (1) für die elektrische Feldstärke E ist eine komplexe Größe, da sie vom komplexwertigen Brechungsindex n abhängt:

$$k = 2\pi (n' - i n'') / \lambda,$$

$$n = n' - i n''.$$
(3)

Eingesetzt in die Gleichung für die elektrische Feldstärke ergibt sich

$$E = E_0 \cdot \exp(i\omega t - i \frac{2\pi}{\lambda} n' x - \frac{2\pi}{\lambda} n'' x) = E_0 \cdot \exp(i(\omega t - k'x)).$$
(4)

Der Term $\exp(2\pi/\lambda \cdot n''x)$ entfällt im Falle der Lichtstreuung, da oben schon gezeigt wurde, daß im Rayleigh-Limit $n'' = 0$ ist. Im folgenden wird n' nur noch mit Brechungsindex n bezeichnet.

Ein streuendes Teilchen des Volumens V kann in infinitesimal kleine Teilvolumina V_i zerlegt werden, die einzelne Streuzentren darstellen. Die einfallende elektromagnetische Welle ist im Falle des hier eingesetzten Signals monochromatisch, kohärent und vertikal polarisiert. Der magnetische Anteil des Feldes wechselwirkt kaum mit Materie, deshalb wird hier nur der elektrische betrachtet. Erfasst das elektrische Feld ein Streuzentrum, wird ein Dipolfeld induziert, das seinerseits ein elektrisches Feld der in (2) angegebenen Intensität abstrahlt. Die von allen Streuzentren ausgehenden Wellen interferieren miteinander am Detektor^a. Befindet sich dieser in ausreichender Entfernung von der Probe, ist für die Überlagerung der Wellen nur ihre Phasendifferenz φ von Bedeutung, die aus ihren unterschiedlichen Ausgangspunkten innerhalb des streuenden Partikels resultiert. Diese Phasendifferenz ist abhängig von dem Winkel θ , unter dem der Detektor bezüglich der Richtung des einfallenden Strahls steht:

$$\varphi = -q \vec{r}_{jk}$$
(6)

mit

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$
(7)

Dabei ist q der Betrag des Streuvektors und \vec{r}_{jk} der Verbindungsvektor zwischen dem j -ten und dem k -ten Streuzentrum.

^a Dabei werden hier nur intrapartikuläre Interferenzen berücksichtigt. Interpartikuläre werden für verdünnte Lösungen vernachlässigt.

Das gestreute Feld E lässt sich beschreiben als Summe der Beiträge aller z Streuzentren:

$$E = \sum_{j=1}^z E_j^0 \cdot \exp(i(\omega t - \vec{q}\vec{r}_j)), \quad (8)$$

wobei \vec{r}_j die Position des j -ten Streuzentrums ist.

Da für die folgenden Überlegungen die Phase des einzelnen Dipols vernachlässigt werden kann, reduziert sich der Ausdruck zu

$$E = \sum_{j=1}^z E_j^0 \cdot \exp(-i\vec{q}\vec{r}_j) \quad (9)$$

Experimentell ist nur die Streuintensität meßbar. Sie ist darstellbar als

$$I(q) = E \cdot E^* = \sum_{j=1}^z \sum_{k=1}^z E_j^0 E_k^0 \cdot \exp(-i\vec{q}\vec{r}_j) \cdot \exp(i\vec{q}\vec{r}_k) = \sum_{j=1}^z \sum_{k=1}^z E_j^0 E_k^0 \cdot \exp(-i\vec{q}\vec{r}_{jk}). \quad (10)$$

Bis auf einen Normierungsfaktor ist dies der sog. Formfaktor $P(q)$, der im Kapitel über die Auswertung von Streufunktionen noch ausführlicher behandelt wird.

Da immer ein makroskopisches Ensemble von Partikeln beobachtet wird, welche bezüglich des eingestrahlten elektrischen Feldes alle möglichen Orientierungen einnehmen, wird über alle Orientierungen gemittelt. Diese Mittelung lautet in Kugelkoordinaten für eine beliebige Funktion $f(\theta, \varphi)$:

$$\langle f(\theta, \varphi) \rangle = \frac{1}{4\pi} \int_{\varphi=0}^{2\pi} \int_{\theta=0}^{\pi} f(\theta, \varphi) \cdot \sin \theta d\theta d\varphi. \quad (11)$$

Angewandt auf die Exponentialfunktion aus der obigen Gl.(10) führt diese Mittelung nach Rayleigh-Debye zu dem Ausdruck

$$\langle e^{-i\vec{q}\vec{r}_{ij}} \rangle = \frac{\sin qr_{ij}}{qr_{ij}}. \quad (12)$$

Der Übergang vom Bild der diskreten Streuzentren E_j^0 zum Bild kontinuierlicher Streuzentren dichte $\rho(r)$ führt zur Darstellung der Intensität $I(q)$ in der Integralform:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \tilde{\rho}^2(r) \cdot r^2 \frac{\sin qr}{qr} dr. \quad (13)$$

Das Faltungsquadrat $\tilde{\rho}^2(r)$ der Elektronendichteverteilung $\rho(r)$ des streuenden Körpers ist definiert als

$$\tilde{\rho}^2(r) = \int \rho(r_1)\rho(r_1 - r)dr_1 . \quad (14)$$

Der Ausdruck

$$\tilde{\rho}^2(r) \cdot r^2 = p(r) \quad (15)$$

wird Paarkorrelationsfunktion genannt.

Die Elektronendichteverteilung wird also durch Faltung in die Paarkorrelationsfunktion und diese ihrerseits über eine Fourier-Bessel-Transformation in die Streukurve überführt. Aus einer bekannten $\rho(r)$ die Streukurve $I(q)$ zu berechnen, stellt das direkte Streuproblem dar.

Das inverse oder indirekte Streuproblem sucht, Informationen über Struktur und Form des Partikels aus dem Streuintensitätsverlauf herauszuziehen.

5.1.2 Elastische Lichtstreuung an verdünnten Systemen

Eines der möglichen Streuverfahren zur Beschreibung der Struktur und Dynamik von Kolloiden ist die *elastische* oder *statische Lichtstreuung (SLS)*. Hier wurde sie eingesetzt, um Informationen über die Ausbildung und zeitliche Änderung von Strukturen in den untersuchten Lösungen zu liefern.

Der Aufbau, der benutzt wurde, besteht aus einem Goniometer, Modell ALV/SP-86 der Firma ALV-Langen. Die Meßküvette wird im Drehzentrum positioniert, und der Goniometerarm fährt in der x-y-Ebene um die Probe. Das Streulicht fällt auf den Photomultiplier, der auf dem Dreharm montiert ist, und dieses Signal wird dann zum PC weitergeleitet.

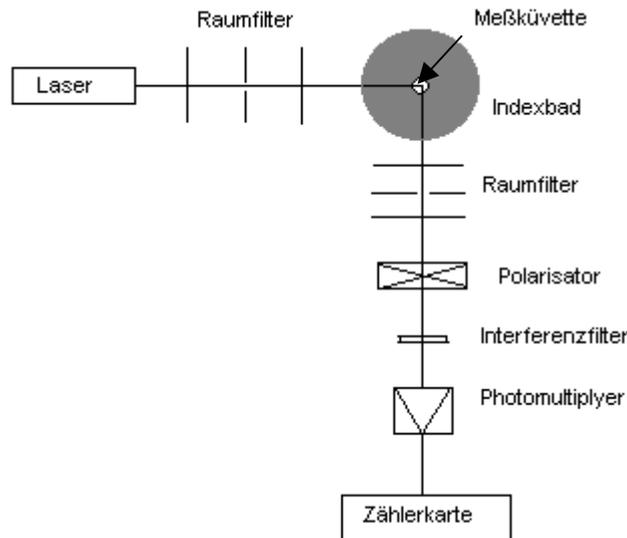


Abb. 5: Schematische Darstellung des SLS-Aufbaus in der Aufsicht. Das Raumfilter dient zur Kollimation des Strahls, der Interferenzfilter fängt unerwünschte Fluoreszenz auf. Das sog. Index-Matching-Bad aus Toluol hat näherungsweise den Brechungsindex der benutzten Meßküvette. Damit wird erreicht, daß die Streustrahlung, die an der Grenzfläche Luft-Küvette entstehen würde, den Detektor nicht erreicht, und dieser somit nur die Streustrahlung aus dem interessierenden Streuvolumen in der Meßküvette detektiert.

Als Lichtquelle dient hier ein frequenzverdoppelter Nd/YAG-Laser von Adlas-COHERENT mit einer Wellenlänge von 532nm (grün) betrieben bei 400mW.

Während der Messung wird zu jedem Meßwinkel die Streuintensität aufgenommen und gemittelt. Es ist sinnvoll, das Streuvolumen möglichst groß zu halten, um evtl. auftretende Kohärenzen herauszumitteln.

Die Information, die man somit bei der Messung von $I(q)$ erhält, ist neben dem Molekulargewicht der Partikel auch der Formfaktor $P(q)$. Das anschließende Kapitel geht auf diese Größen ein.

5.1.3 Auswertung der SLS

Die folgenden Ausführungen gelten für unendlich stark verdünnte Systeme, in denen die einzelnen Streuer keine Wechselwirkungen miteinander aufweisen und somit im Streuvolumen statistisch verteilt sind und keinerlei Nah- oder Fernordnung besitzen.

Im Streuexperiment ist die Wellenlänge der benutzten Strahlung der bestimmende Faktor in der Abbildung von strukturellen Einzelheiten in der untersuchten Probe. Die gemessene Streukurve kann nur so viel Information enthalten wie die Auflösung mit der gegebenen Wellenlänge erlaubt. Deshalb sind in der statischen Lichtstreuung in Abhängigkeit vom Verhältnis der Lichtwellenlänge zur Ausdehnung der streuenden Partikel mehrere Fälle zu unterscheiden.

Der Radius R der Streuer sei viel kleiner als λ , also $q \cdot R \ll 1$. Dann sind die intrapartikulären Interferenzen vernachlässigbar, und für den Formfaktor gilt $P(q) = 1$. Im Medium findet Streuung der eingestrahnten elektromagnetischen Welle an Fluktuationen der makroskopischen Polarisierbarkeit $\delta\alpha$ statt.

Die Streuintensität des Hertz'schen Dipols ist

$$I = \frac{16\pi^2 \alpha^2}{\lambda^2 r^2} \langle \cos^2 \theta \rangle. \quad (16)$$

Es muß also ein Ausdruck für das mittlere Quadrat der Fluktuationen $\delta\alpha$ gefunden werden. α resultiert aus Fluktuationen der Dichte ρ und der Konzentration c der Lösung. Da diese auf unterschiedlichen Zeitskalen ablaufen, können sie hier als unabhängig betrachtet werden:

$$\delta\alpha = \frac{\partial\alpha}{\partial\rho} \delta\rho + \frac{\partial\alpha}{\partial c} \delta c. \quad (17)$$

Nach Einstein-Smoluchowski ist in der Fluktuationstheorie die mittlere quadratische Änderung der Variablen x

$$\langle (\delta x)^2 \rangle = kT \left(\frac{\partial^2 F}{\partial x^2} \right)^{-1}. \quad (18)$$

F ist die freie Energie des Systems. Ersetzt man x einmal durch ρ und einmal durch c , kommt man zu den Ausdrücken

$$\left(\frac{\partial^2 F}{\partial \rho^2} \right)_T = \frac{1}{\beta \rho} \quad \text{und} \quad \left(\frac{\partial^2 F}{\partial c^2} \right)_T = -\frac{1}{\bar{V}_1 c} \frac{\partial \Delta \mu_1}{\partial c}. \quad (19)$$

β ist die isotherme und $\partial c / \partial \Delta \mu_1$ die osmotische Kompressibilität. $\Delta \mu_1$ kann in eine Reihe entwickelt werden

$$\Delta \mu_1 = -RT \bar{V}_1 c \left(\frac{1}{M} + A_2 c + \dots \right) \quad (20)$$

so daß man für die Schwankungen der Polarisierbarkeit erhält

$$\langle (\delta \alpha)^2 \rangle = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial \rho} \right)_{p,T}^2 kT \beta \rho + \left(\frac{\partial \alpha}{\partial c} \right)_{p,T}^2 \frac{c}{N_A \left(\frac{1}{M} + 2A_2 c + \dots \right)}. \quad (21)$$

M ist dabei das Molekulargewicht und A_2 der zweite osmotische Virialkoeffizient. Die Lorentz-Lorenz-Gleichung verknüpft α mit dem Brechungsindex n :

$$\left(\frac{\partial \alpha}{\partial c} \right)^2 = \left(\frac{\partial \alpha}{\partial n} \right)^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 = \frac{n_0^2}{4\pi^2} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2. \quad (22)$$

Setzt man alles in die bereits aufgeführte Gl.(16) ein, findet man schließlich für die Streuintensität (bezogen auf die Streuintensität des Lösungsmittels)

$$I = \frac{I_0}{r^2} \left(\frac{Kc}{\left(\frac{1}{M} + 2A_2 c + \dots \right)} \right) \quad \text{mit} \quad K = \frac{4\pi^2 n_0^2}{\lambda^4 N_A} \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2 \langle \cos^2 \theta \rangle, \quad (23)$$

$\langle \cos^2 \theta \rangle = 1$ für vertikal polarisiertes Licht und die für uns gewählte Beobachtungsebene. Wie man sieht, hängt I hier nicht von q bzw. θ ab.

Aus einem einfachen Plot von Kc/I gegen c ist also das Inverse des Molekulargewichtes M als Achsenabschnitt und der zweite osmotische Virialkoeffizient $2A_2$ als Steigung der Geraden abzulesen. A_2 beschreibt den Grad der Wechselwirkungen zwischen den Molekülen des Gelösten und dem Lösungsmittel. Einzelheiten über den Aufbau des streuenden Partikels sind hier aber nicht zu gewinnen.

Werden die Dimensionen der Partikel vergleichbar mit der Wellenlänge des Lichtes, stellt sich ein charakteristischer Abfall im Formfaktor mit q ein, also $P(q) \neq 1$. $P(q)$ kann für kleine q -Werte in eine Potenzreihe entwickelt werden³⁷ :

$$P(q) = 1 - \frac{q^2}{6z^2} \sum_{i=1}^z \sum_{j=1}^z \langle r_{ij}^2 \rangle + \dots \quad (24)$$

wobei z die Anzahl der Streuzentren ist, die das Partikel aufbauen. Der Gyrationradius R_G für Teilchen jeglicher Geometrie erfüllt für kleine q -Werte die Gleichung

$$\bar{R}_G^2 = \frac{1}{2z^2} \sum_{i=1}^z \sum_{j=1}^z \langle r_{ij}^2 \rangle. \quad (25)$$

Unter Vernachlässigung aller höheren Potenzen in der Gl.(24) lässt sich $P(q)$ interpretieren als

$$P(q) = 1 - q^2 R_G^2 / 3 \approx \exp(-q^2 R_G^2 / 3). \quad (26)$$

Aus dem inneren Teil der Streukurve kann also nach Guinier der Gyrationradius der Partikel bestimmt werden.

Kleine Moleküle streuen nur schwach. Um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis im Experiment zu erreichen, sind dann hohe Konzentrationen erforderlich. Die Näherung von unabhängigen Streuern kann in diesem Fall nicht mehr angewandt werden. Gemessen wird dann eine Schar von Streukurven zu verschiedenen Konzentrationen, um den sog. Zimm-Plot erstellen zu können³⁸. Es gilt immer noch

$$\frac{Kc}{I} = \frac{1}{P(q)} \left(\frac{1}{M} + 2A_2c + \dots \right) \quad \text{mit} \quad P(q) = 1 - \left(\frac{16\pi^2 n^2 R_G^2}{3\lambda_0^2} \right) \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) \quad (27)$$

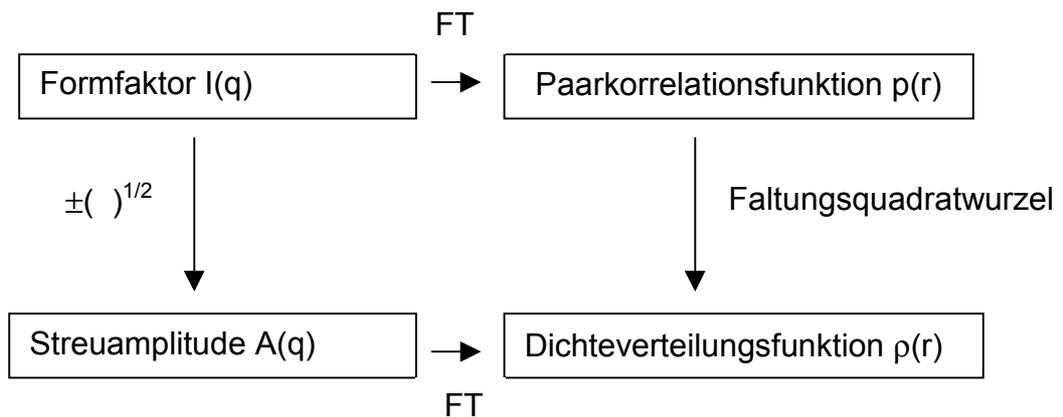
Werden also für alle gemessenen Kurven Kc/I gegen $\sin^2(\theta/2) + kc$ aufgetragen, wobei k ein beliebiger Spreizungsfaktor ist, kann man für alle $\theta = \text{const.}$ zu $c \rightarrow 0$ extrapolieren. Diese so entstandene Kurve für $c = 0$ kann dann zu $\theta \rightarrow 0$ extrapoliert werden. Der Achsenabschnitt beider ist das Inverse des Molekulargewichtes M . Die Reihenfolge der Extrapolationen ist umkehrbar.

Für Streuer mit $q \cdot R \geq 1$ enthält die Streukurve ausgeprägte lokale Minima und Maxima, die die intrapartikulären Interferenzen veranschaulichen. Es kann eine sog. Formfaktoranalyse durchgeführt werden, die Informationen über Symmetrien und Geometrie des streuenden Partikels liefern kann. Der Formfaktor ist allgemein

$$P(q) = 4\pi \int_0^{\infty} p(r) \frac{\sin qr}{qr} dr, \quad (28)$$

wobei $p(r)$ die Paarkorrelationsfunktion des Partikels ist, die für einfache Geometrien einen charakteristischen Kurvenverlauf annimmt.

Man kann nun entweder aus der Streukurve $I(q)$ die $p(r)$ -Funktion bestimmen oder bekannte Modelle an die experimentelle $I(q)$ anpassen. Die konkrete Problemstellung gibt jeweils einer der beiden Methoden den Vorzug. Generell ist der Zusammenhang folgender:



In der vorliegenden Arbeit erscheint es sinnvoll, den Weg über die Paarkorrelationsfunktion zu gehen, da er zu nur zwei möglichen Lösungen für $\rho(r)$ führt. Für die Streuamplitude ergäben sich viel mehr Lösungen, je nach Anzahl ihrer Nullstellen, da zu jedem Meßpunkt in der Streukurve die Wurzel zwei Werte liefert. Die Berechnung der $\rho(r)$ -Funktion aus der Streukurve geschieht durch eine indirekte Fourier-Transformation³⁹. Die anschließende Berechnung der Dichteverteilung wurde mit dem Programm DECON bewerkstelligt⁴⁰.

Erstreckt sich der ausgemessene q -Bereich über mehrere Dekaden, kann nun der Ausläufer der Streukurve für $q \rightarrow \infty$ betrachtet werden. Auf diesen bezieht sich das Porod-Gesetz⁴¹ für ein System, das aus 2 Phasen unterschiedlicher optischer Dichte

besteht. Dabei gilt das Gesetz nur im Falle scharfer Grenzen zwischen beiden Phasen. Es lautet für $q \rightarrow \infty$

$$I(q) = \frac{128\pi^5 \kappa}{l_p q^4} \quad (29)$$

mit der Invarianten

$$\kappa = \int_0^\infty I(\bar{q}) d^3 q = 4\pi \int_0^\infty q^2 I(q) dq. \quad (30)$$

Die Porod-Länge l_p ist ein Maß für die spezifische Oberfläche der Probe. Aus einer Abweichung vom q^{-4} -Verhalten von $I(q)$ lassen sich also Schlüsse auf die Beschaffenheit der Grenzflächen in der Probe ziehen.

Die bisherigen Ausführungen gelten im Rahmen der sogenannten Rayleigh-Debye-Gans-Theorie für Partikel mit vernachlässigbarem Kontrast $m = n_{part} / n_{lös}$. Starke Streuer, sei es aufgrund ihrer großen Ausdehnung oder ihres hohen Brechungsindexunterschiedes, verursachen charakteristische Effekte im Verlauf der Streukurve. Für kugelsymmetrische Partikel ist das der sogenannte Lorenz-Mie-Effekt⁴². Um diesen zu quantifizieren, ist es notwendig, eine exakte Lösung der Maxwell-Gleichungen an der Grenzfläche Partikel/Lösungsmittel zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit wird vom Lorenz-Mie-Effekt abgesehen, da die untersuchten Partikel alle einen sehr geringen Kontrast aufweisen.

Wie bereits erwähnt, betreffen die vorangegangenen Überlegungen stark verdünnte Systeme. Das bedeutet, daß keinerlei Wechselwirkungen zwischen den gelösten Teilchen angenommen werden. Treten solche auf, machen sie sich in der Streukurve im sogenannten Strukturfaktor $S(q)$ bemerkbar, der sich dem Formfaktor $P(q)$ überlagert. Darüber hinaus befindet sich in konzentrierten Lösungen das einzelne Teilchen in einer Umgebung erhöhter Konzentration, was zur Abnahme des Kontrastes führt. Der niedrigere Kontrast hat zur Folge, daß die Streukurve für $q \rightarrow 0$ absinkt.

Die Ausbildung eines Strukturfaktors rührt von stärkeren Wechselwirkungen zwischen den Teilchen her, die durch längerreichweitige Potentiale beschreibbar sind. Es stellt sich eine fluktuierende Nahordnung der Teilchen ein, die im zeitlichen Mittel vom Strukturfaktor beschrieben wird. Diese Nahordnung kann sowohl für eine Positions- als auch für eine Orientierungsordnung oder beides stehen. Dies sind wichtige Kriterien zur Beschreibung von Eigenschaften vieler Polyelektrolytlösungen.

Im einfachsten Fall können die einzelnen Partikel als kugelförmig und monodispers angenommen werden. Nur dann gilt für die Streuintensität der einfache Ausdruck

$$I(q) = I_0 \cdot S(q) \cdot P(q). \quad (31)$$

Ist nun der Radius der Kugeln bekannt, kann $P(q)$ berechnet und dann $S(q)$ bestimmt werden.

5.1.4 Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS)

Röntgenstrahlung wird an Elektronen gestreut. Die hier analog zur Lichtstreuung aufgenommene $I(q)$ -Kurve bildet demnach die Elektronendichteverteilung in der Probe ab. Die Wellenlänge der Cu- K_α -Linie von 1.54Å und der Winkelbereich von herkömmlichen Kameras erlauben die Bestimmung von Strukturen mit Ausdehnung zwischen 0.5 und 40nm.

Die Vorgehensweise bei der Interpretation der Streukurve wurde oben im Falle der elastischen Lichtstreuung behandelt. Das spezielle Primärstrahlprofil der Röntgenkamera erfordert zusätzliche Entschmierungsroutinen, die aber im verwendeten Programmpaket ITP⁴³ bereits enthalten sind. Das Programm ITP erstellt die $p(r)$ aus der experimentellen $I(q)$ und dem experimentell zugänglichen Primärstrahlprofil.

5.1.5 Weitwinkel-Röntgenstreuung (WAXS)

Im folgenden ist der schematische Aufbau des Experimentes gezeigt, in dem Röntgenstrahlung an einer Probe P gestreut wird. Der einfallende Strahl trifft auf die Probe und die Streuintensität wird unter dem Winkel 2θ aufgezeichnet.

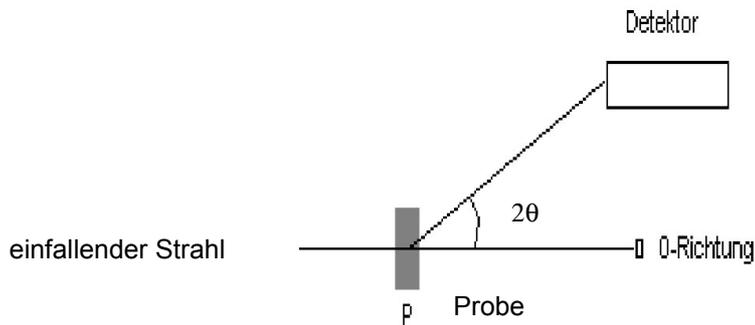


Abb. 6: Strahlengang im WAXS-Experiment in Transmission.

Die in dieser Arbeit verwendeten Ergebnisse wurden in WAXS-Experimenten an Pulvern sowohl in Transmission wie auch in der Reflexion erzielt. Es wurde gemessen an einer PDS 120 –Anlage (Nonius GmbH, Solingen).

Zunächst folgen Betrachtungen für ein Einkristall-System als Probe.

Anhand der Bragg'schen Formel für konstruktive Interferenz

$$\frac{1}{d} = \frac{2 \sin \theta}{\lambda} \quad \Rightarrow \quad s = \frac{q}{2\pi} \quad (32)$$

s: Streuvektor

d: Netzebenenabstand

ist unmittelbar zu sehen, daß große charakteristische Abstände in der Probe bei kleinen Winkeln abgebildet werden und umgekehrt. Dies ist die unmittelbare Anwendung des Reziprozitätsprinzips der Fourier-Transformation, die ja die Abbildung in den reziproken Raum beschreibt. Es wird näherungsweise angenommen, daß die Streuung elastisch sei. Die kleine Wellenlänge von 1.54Å und der große Winkelbereich von 5-120° gestatten die Charakterisierung sehr kleiner Strukturen.

Im Streuexperiment wird die Information aus dem gesamten Streuvolumen in den reziproken Raum abgebildet, also sowohl die über die Gestalt der Einheitszelle als auch die über deren Wiederholungsmuster, d.h. über die Gitterfunktion der Probe. Im unendlich ausgedehnten Festkörper gibt es eine Fernordnung, die durch diese Gitterfunktion beschrieben wird. Ihre Entsprechung ist im Falle von flüssigen Proben der Strukturfaktor, der die gegebenenfalls auftretende Nahordnung beschreibt. Die

Streuintensität ist im einfachsten Fall ein Produkt aus dem Formfaktor und dem Gitterfaktor^b. Der letztere läßt sich im Fourier-Raum idealerweise durch eine unendliche Folge von δ -Funktionen darstellen. In der Praxis ist aber der zu untersuchende Festkörper nie unendlich ausgedehnt. Daraus folgt, daß die δ -Peaks im Fourier-Raum verbreitert werden. Aus deren Halbwertsbreite kann nach Scherrers Gleichung⁴⁴ die Größe des kristallinen Körpers für eine Ausdehnung $< 60\text{nm}$ bestimmt werden.

Der Formfaktor ist eine Superposition der sogenannten Atomformfaktoren der einzelnen, in der Einheitszelle vertretenen Atome, an denen Röntgenstrahlung gestreut wird. Er läßt sich völlig analog dem Formfaktor in der Lichtstreuung ableiten, wobei hier die Amplituden des elektrischen Feldes E_{0i} durch die Atomformfaktoren f_i ersetzt werden. Räumlich gemittelt ist

$$I(s) = \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^N f_i(s) f_j(s) \frac{\sin 2\pi sr}{2\pi sr}. \quad (32)$$

Beim Übergang zum Kontinuum wird die Streuintensität zur Fouriertransformierten $F(s)$ der Elektronendichteverteilung, diesmal multipliziert mit der δ -Folge $Z(s)$ als Fouriertransformierten der Gitterfunktion

$$I(s) = |F(s)|^2 + |Z(s)|^2. \quad (33)$$

So ergibt sich also für eine fehlerfreie Fernordnung unendlicher Reichweite im Einkristall eine Abfolge von δ -Peaks in der Streukurve, aus deren Position und Höhe sich die Parameter der Einheitszelle und der Gitterfunktion bestimmen lassen.

Tatsächlich kann es vielerlei Abweichungen von einem solchen idealen Verhalten geben, die sich entsprechend in der Streukurve niederschlagen. Bereits erwähnt wurde z.B. die Verbreiterung der Reflexe, die aufgrund der endlichen Ausdehnung der einzelnen Kristallite auftritt. Diesen Effekt haben auch die thermischen Schwingungen der Atome um ihre Ruhelage. Zu berücksichtigen ist weiter inkohärente Streuung, Absorption in der Probe, Kollimationskorrekturen usw.

^b Nur im Falle eines unendlich ausgedehnten Einkristalls, der vollständig durch seine Einheitszelle und die Gitterfunktion beschrieben ist.

5.1.6 Quasielastische Lichtstreuung

Diese wird auch *dynamische Lichtstreuung* (DLS) oder *Photonen-Korrelationsspektroskopie* genannt. Die quasielastische Lichtstreuung detektiert Fluktuationen der Streuintensität bei einem festen Streuvektor q . Die Analyse des fluktuierenden Signals liefert Informationen über das Diffusionsverhalten der Kolloide. Im hier vorliegenden Aufbau, der unten schematisch dargestellt ist, wurde ein Ar-Ionenlaser mit einer Wellenlänge von 488nm und einer maximalen Leistung von 1W eingesetzt. Die Linse fokussiert den Laserstrahl in der Meßzelle, um ein kleines Streuvolumen zu erhalten.

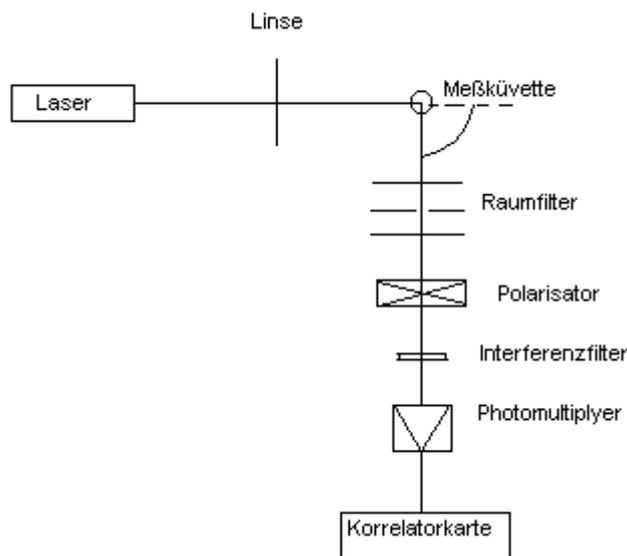


Abb. 7: Schematische Darstellung des DLS-Aufbaus.

Das auf den Photomultiplier treffende gestreute elektrische Feld löst einen Strom i aus, der proportional zur Intensität bzw. zum Betragsquadrat der elektrischen Feldstärke ist. Dieses Signal wird wiederum zu einem Korrelator geleitet, der das Produkt $\langle i(0) \cdot i(t) \rangle$ bildet. Es gibt zwei Möglichkeiten, eintreffende Lichtwellen zu mischen – im *homodyne*- und im *heterodyne*-Experiment. Im Korrelator können dementsprechend zwei unterschiedliche Autokorrelationsfunktionen erzeugt werden. Im hier eingesetzten *homodyne*-Verfahren wird das Streulicht mit sich selbst gemischt, und die entstehende Autokorrelationsfunktion ist die Intensitäts-AKF $g_2(t)$

$$g_2(t) = \frac{1}{T} \int_{t'=0}^T |E(t')|^2 |E(t'+t)|^2 dt' = \langle |E(0)|^2 |E(t)|^2 \rangle. \quad (34)$$

$E(t)$ steht für das gestreute elektrische Feld zu Zeit t .

Es läßt sich zeigen, daß für Gauß-stochastische Systeme^c $g_2(t)$ identisch ist mit

$$g_2(t) = |g_1(0)|^2 + |g_1(t)|^2. \quad (35)$$

g_1 sei die Amplituden-Korrelationsfunktion, die definiert ist als

$$g_1(t) = \langle E^*(0)E(t) \rangle. \quad (36)$$

Diese kann auch aus dem *heterodyne*-Experiment gewonnen werden, in dem das Streulicht mit Referenzlicht (*local oscillator*) gemischt wird.

Entsprechend unserem experimentellen Aufbau ist hier g_2 von Bedeutung. An der Gestalt von Gleichung (35) sieht man, daß der erste Summand eine zeitunabhängige Basislinie darstellt, die in diesem Fall gleich dem Quadrat der mittleren Partikelzahl $\langle N \rangle^2$ im Streuvolumen ist. Im Laufe des Meßvorganges wird diese Basislinie automatisch auf 1 normiert, so daß keine Absolutmessung der Intensität mehr stattfindet.

Nun muß g_1 bestimmt werden.

Unter der Bedingung, hier handele es sich um ein Gauß-stochastisches System, kann man die Wahrscheinlichkeit dafür angeben, das ein Partikel von r durch Brownsche Bewegung in seine Nachbarschaft d^3r gerät. Diese Wahrscheinlichkeit sei $\mathfrak{R}(r,t)$. Sie folgt einer Gauß-Verteilung. Für Brown'sche Bewegung erfüllt $\mathfrak{R}(r,t)$ die Fick'sche Diffusionsgleichung:

$$\frac{\partial}{\partial t} \mathfrak{R}(r,t) = D \nabla^2 \mathfrak{R}(r,t). \quad (37)$$

Der translatorische Selbst-Diffusionskoeffizient D für unendlich verdünnte Lösungen ist ein Maß dafür, in welcher charakteristischen Zeit τ die Fläche L^2 vom Partikel im „random walk“ durchquert wird.

$$D := L^2/\tau \quad (38)$$

^c Ein System ist dann Gauß-stochastisch, wenn z.B. das hier interessierende Streuvolumen V in viele kleine Teilvolumina zerlegt werden kann, für die gilt, daß ihre Dimensionen kleiner als die Lichtwellenlänge sind, und die Diffusion der Partikel in den jeweiligen Teilvolumina unabhängig voneinander geschieht. Dann kann auf die von allen Teilvolumina ausgehenden Streuwellen das Superpositionsprinzip sowie das Central-Limit-Theorem angewandt werden. Die Zahl der Teilvolumina (und somit die Zahl der gelösten Partikel) muß groß genug sein, um eine Grenzwertbildung zu gestatten. Ausnahmen hiervon bilden z.B. Systeme mit kritischem Verhalten der Konzentrationsfluktuationen, da in der Nähe des kritischen Punktes die Korrelationslänge für die Fluktuationen ins Unendliche wächst.

Sei $F\{\mathfrak{R}(r,t)\} = g_1(q,t)$, dann ist die Fourier-Transformierte der gesamten Diffusionsgleichung

$$\frac{\partial}{\partial t} g_1(q,t) = -q^2 D g_1(q,t). \quad (39)$$

Die Lösung der Differentialgleichung mit der Randbedingung $g_1(q,0) = 1$ ergibt

$$g_1(t) = \exp(-q^2 D t) = \exp(-t/\tau). \quad (40)$$

$\mathfrak{R}(r,t)$ und $g_1(q,t)$ sind durch die Fourier-Transformation miteinander verknüpft. $\mathfrak{R}(r,t)$ wird auch die Van-Hove-Raum-Zeit-Autokorrelationsfunktion genannt.

Aus dem Diffusionskoeffizienten D kann der entsprechende hydrodynamische Radius R_H des Partikels für eine volumensäquivalente harte Kugel nach der Stokes-Einstein-Beziehung bestimmt werden.

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_H} \quad (41)$$

Im allgemeinen liegt eine Verteilung von Partikel hinsichtlich ihrer Größe vor, d.h. daß das Ziel einer Datenanalyse in der QELS ist, aus der $g_2(t)$ - bzw. $g_1(t)$ -Funktion eine Verteilung $D(R_H)$ zu erhalten. Es gilt also, die Integralgleichung

$$g_1(t) = \int_{\tau_{\min}}^{\tau_{\max}} D(R_H) W(R_H) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (42)$$

mit

$$R_H = \frac{\tau}{C_\theta} = \frac{6\pi\eta}{kTq^2} \quad (43)$$

zu invertieren. $W(R_H)$ ist eine Gewichtungsfunktion, die im Falle von Kugeln im Rahmen der RGD-Theorie folgende Werte annimmt:

$$\begin{aligned} W(R_H) &= R_H^6 && \text{in einer intensitätsgewichteten Darstellung,} \\ W(R_H) &= R_H^3 && \text{in einer volumengewichteten Darstellung,} \\ W(R_H) &= 1 && \text{in einer anzahlgewichteten Darstellung.} \end{aligned}$$

In der Praxis wird (abgeleitet von einem Sampling-Theorem) auf einer logarithmischen Skala integriert, so daß

$$g_1(t) = \int_{\ln \tau_{\min}}^{\ln \tau_{\max}} D(R_H)W(R_H) \exp(-t/\tau) d(\ln \tau) = C_\theta \int_{\tau_{\min}}^{\tau_{\max}} R_H \cdot D(R_H)W(R_H) \exp(-t/\tau) d\tau. \quad (44)$$

Die Inversionsanalyse ist hier mit dem Programmpaket ORT⁴⁵ durchgeführt worden, welches eine Auftragung von $R \cdot D(R_H)$ gegen $\ln(R_H)$ erlaubt. Die Kurve wird dargestellt als Überlagerung einer frei wählbaren Anzahl von kubischen B-Splines. Ein Beispiel einer intensitätsgewichteten bimodalen Verteilung gemessen in einer BSA-Lösung bei pH 9 folgt.

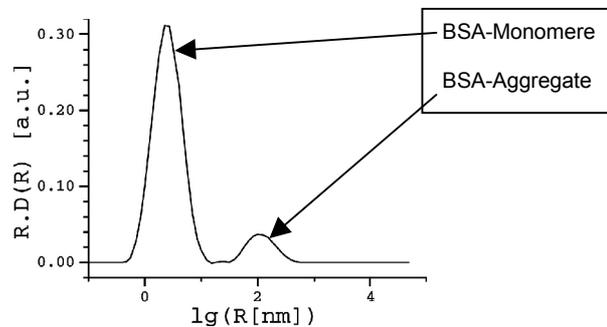


Abb. 8: Aus dem DLS-Experiment nach Auswertung mit ORT gewonnene Größenverteilung für BSA.

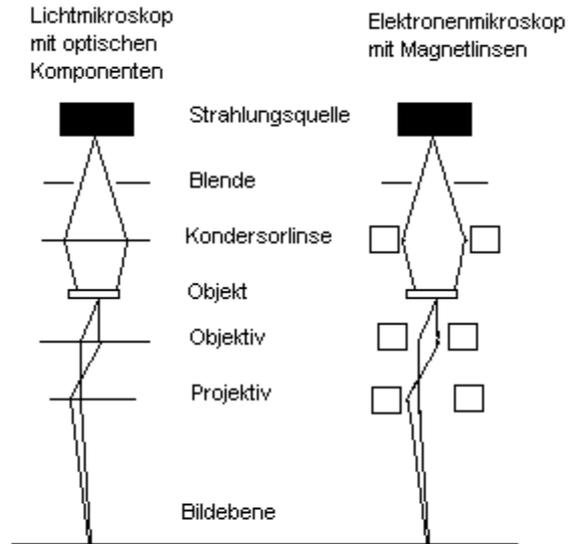
5.2 Abbildende Methoden

5.2.1 Transmissions- und Rasterelektronenmikroskopie

Das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) erzeugt ein Durchlichtbild der Probe, indem Elektronen, die mit der Probe wechselwirken, gebeugt und dieses Beugungsmuster Fourier-transformiert und abgebildet wird.

Das Mikroskop ist aufgebaut wie ein Lichtmikroskop, in dem die optischen Komponenten durch magnetische ersetzt sind. Thermische Elektronen werden an einer Wolframkathode erzeugt und von einer Anode in der Wehnelt-Anordnung beschleunigt.

Abb. 9: Schematischer Aufbau des Transmissionselektronenmikroskopes rechts, verglichen mit dem eines Lichtmikroskopes links.



Das Experiment findet im Vakuum statt, um zu verhindern, daß Stöße mit Gasmolekülen stattfinden. Nach De Broglie haben die Elektronen eine Wellenlänge λ , die entsprechend ihrer Masse m und Geschwindigkeit v gegeben ist durch

$$\lambda = \frac{h}{mv}. \quad (45)$$

mv und damit λ kann durch die angelegte Spannung variiert werden. Diese Wellenlänge ergibt bei einer gegebenen Apertur A und Brechungsindex n im Vakuum die Auflösung g nach Abbe

$$g = 0.61 \frac{\lambda}{n \cdot \sin \alpha}. \quad (46)$$

Sie beträgt für die Betriebsspannung von 120kV theoretisch 0,4nm. Die Linsen aus Magnetspulen haben den Vorteil, daß ihre Brennweite durch einfache Variation der an ihnen anliegenden Spannung verändert werden kann, weisen aber eine Reihe von Abbildungsfehlern wie Astigmatismus, sphärische und Farbabweichung auf. Das führt zur tatsächlichen Auflösung von ca. 2nm.

Ein hoher Kontrast der Abbildung im TEM ist nur bei sehr dünnen Proben zu erreichen, weshalb entweder stark verdünnte Lösungen kleiner Partikel eingetrocknet

oder aber größere Strukturen in Epoxyharz gegossen und mikrotomiert werden. In dieser Arbeit wurden alle Proben auf ein mit Kohle- bzw. Zaponlackfilm beschichtetes Cu-Grid aufgetropft und an Luft eingetrocknet. Im Bild erscheinen sie 2-dimensional.

Der prinzipielle Aufbau eines Rasterelektronenmikroskopes (REM) ist derselbe wie beim TEM, es wird bloß ein anderes Signal, das bei der Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit der Probe entsteht, verarbeitet. REM tastet die Probenoberfläche punktuell ab. Der Elektronenstrahl löst Sekundärelektronen aus der leitfähigen Probenoberfläche heraus, die zur Signalverarbeitung verwendet werden. Das Auflösungsvermögen liegt bei ca. 5nm, die große Tiefenschärfe aber erlaubt eine scharfe Abbildung in drei Dimensionen. Dazu ist der Strahl möglichst gut kollimiert, wozu die letzte Aperturblende sehr klein gewählt wird. Erhebungen auf der Probe bieten eine größere Fläche, aus der Sekundärelektronen in Richtung Detektor austreten können, so daß das Signal an dieser Stelle stärker ist. Hier reichen lediglich Betriebsspannungen von 15-20kV aus. Die Probe im REM ist deshalb wesentlich weniger durch den Elektronenstrahl gefährdet als im TEM.

Die Probe wird in einem Standardexperiment auf einen Aluminiumhalter aufgetropft und eingetrocknet, der mit einer Graphitfolie beklebt ist. Das Präparat wird dann mit Metall, z.B. Au, bedampft und untersucht.

5.2.2 Polarisationsmikroskopie

Das Polarisationsmikroskop ist ein Lichtmikroskop, in dem der Lichtstrahl einen Polarisator vor dem Auftreffen auf die Probe und einen nach dem Austritt aus der Probe durchläuft. Beide Polarisatoren stehen im Winkel $\theta = 90^\circ$ zueinander. Für die Intensität I des Lichtes nach dem Durchgang durch beide Polarisatoren gilt allgemein

$$I(\theta) = I_0 \cos^2 \theta. \quad (47)$$

Durchsetzt das anfangs linear polarisierte Licht das abzubildende Objekt, ändert sich die Polarisationsrichtung nicht in einer ungeordneten, isotropen Probe, sehr wohl aber in einer anisotropen, in der der Brechungsindex n in mindestens zwei Raumrichtungen unterschiedliche Werte besitzt. Beim Auftreffen der Lichtwelle auf

den zweiten Polarisator tritt im isotropen Fall eine Totalauslöschung ein und das Abbild im Sichtfenster bleibt dunkel. Die in ihrer Polarisationsrichtung beim Durchgang durch eine anisotrope Probe gedrehte Lichtwelle passiert teilweise den zweiten Polarisator und erzeugt ein helles Abbild des Objektes. Auf diese Weise können kristalline und flüssigkristalline Phasen sowie eine Vielzahl von geordneten polymeren Phasen unter starker Vergrößerung abgebildet werden.

5.2.3 Atomkraftmikroskopie (AFM)

Atomic Force Microscopy (AFM) oder Rasterkraftmikroskopie dient zur hochaufgelösten Abbildung von Oberflächen⁴⁶. Dabei wird mit einer feinen Nadelspitze die Oberfläche der Probe abgetastet. Die Auflösung liegt im Mikro- bis Nanometerbereich. In einer Weiterentwicklung können aus AFM nicht nur die Topographie, sondern auch viskoelastische, adhäsive oder elektrostatische Eigenschaften der Probe gewonnen werden.

Das Prinzip der Messung mit AFM beruht darauf, daß auf sehr kurzen Abständen charakteristische Wechselwirkungen zwischen der Probenoberfläche und einer Metallspitze auftreten⁴⁷. Die Spitze befindet sich auf einem schwingungsfähigen Arm, dem Cantilever. Die Kräfte, die zwischen Probe und Spitze wirken, lenken den Cantilever aus seiner Ruhelage aus. Ein Regelkreis kompensiert diese Auslenkung, so daß der Abstand Probe-Spitze immer konstant bleibt und die Nachregelung liefert das Signal, was zur Bildgebung verarbeitet wird. Das linienartige Abscannen der Oberfläche wird vom PC gesteuert und mittels eines piezoelektrischen Kristalls ausgeführt.

Oberflächen können sowohl an Luft wie auch in Flüssigkeit abgebildet werden⁴⁸, wobei an Luft immer noch eine dünne Flüssigkeitsschicht wegen der Physisorption von Gasmolekülen die Probe bedeckt⁴⁹. Bei Kontakt der Spitze mit der Oberfläche bildet sich deshalb ein Flüssigkeitsmeniskus aus, der zusätzliche Adhäsionkräfte auf die Spitze ausübt.

Die Kräfte zwischen Probe und Spitze, die allgemein bei der Betrachtung eines Systems zu berücksichtigen sind, schließen ein: (1) langreichweitige elektrostatische Wechselwirkungen, (2) die Oberflächenspannung, die sich auf Abständen 10-200nm bemerkbar macht, (3) und van-der-Waals-Kräfte, wirksam im Angströmbereich. Unter

diesen Einwirkungen können Spitze und Probe beschrieben werden als zwei elastische Kugeln mit unterschiedlichen Radien⁵⁰.

Je nach Beschaffenheit der Probe und nach Art der interessierenden Information kann ein AFM-Experiment unterschiedlich ausgeführt werden. Diskutiert werden im folgenden nur die für diese Arbeit wichtigen Kontakt- und Tapping-Modus. Nicht mehr eingegangen wird auf Pulsed-Force-Modus, Kraft-Abstandskurven-Messung usw.

Der Kontakt-Modus

In diesem Betriebsmodus befindet sich die Spitze in permanentem Kontakt mit der Probenoberfläche. Die Nachregelung auf einen konstanten Abstand zwischen Probe und Spitze geschieht unter Anwendung einer Kraft von ca. 10^{-9} N. Die topographische Abbildung entsteht unter Kräften, die senkrecht zur Oberfläche wirken, die Reibungskräfte wirken in lateraler Richtung. Eine Abbildung in Flüssigkeit umgeht die oben erwähnten Adhäsionskräfte, die durch den Meniskus an der dünnen flüssigen Schicht an Luft entstehen. Viele Proben quellen und werden weicher, wodurch sie leicht von der Spitze deformiert oder sogar zerstört werden können. Üblicherweise benutzt man Spitzen aus Silicium mit einem Krümmungsradius von ca. 10nm, und aus Si_4N_3 mit einem Krümmungsradius von ca. 20nm.

Der Tapping-Modus

In diesem Fall wird der Federbalken, auf dessen Ende die Spitze angebracht ist, zur Schwingung angeregt⁵¹. Durch die Probenoberfläche wird diese moduliert. Der Regelkreis kompensiert auf konstante Amplitude und Phase. Nachfolgend ist die Experimentanordnung gezeigt.

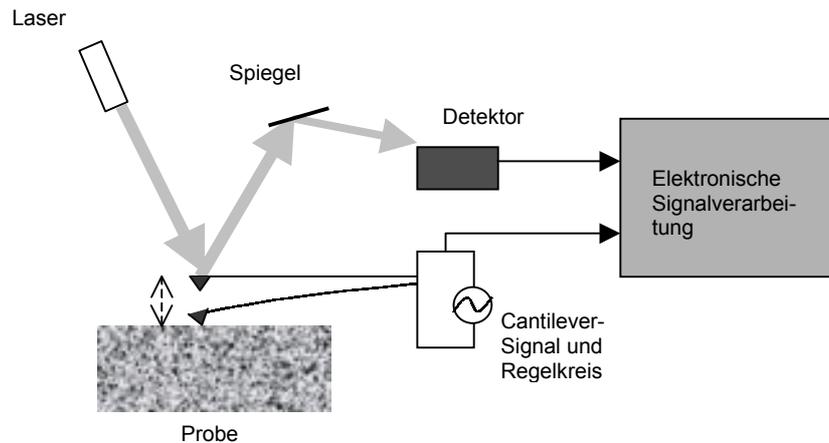


Abb. 10: Schematische Darstellung zur Bildentstehung im AFM im Tapping-Modus. Der Cantilever mit Spitze wird durch ein Sinussignal in Schwingung versetzt. Das optische Signal bildet die Modulation der vorgegebenen Cantileverschwingung durch die Probenoberfläche ab. Aus der Modulation der Amplitude entsteht das sog. Amplitudenbild, die Phasenverschiebung liefert das Phasenbild. Letzteres gibt Aufschlüsse über viskoelastische und adhäsive Eigenschaften der Probe.

Der Cantilever kann im Prinzip mathematisch beschrieben werden als ein angetriebener gedämpfter harmonischer Oszillator mit effektiver Masse m_{eff} , der Steifigkeit k , der Dämpfungskonstanten α , getrieben durch die von außen angelegte Kraft $F_{ext}(\omega, t)$ ⁵². Durch den Kontakt mit der Probe entstehen kleine Oberflächenschwingungen $F(z)$ an der Spitze, die für kleine Amplituden linearisiert werden. Die Differentialgleichung lautet

$$m_{eff} \ddot{z} + \alpha \dot{z} + kz + F(z) = F_{ext}(\omega, t). \quad (48)$$

Aus diesem Ansatz können Ausdrücke für die Amplitude und die Phase in Abhängigkeit von der Auslenkung z errechnet werden.

An Luft besitzen die hier verwendeten Spitzen Resonanzfrequenzen im Bereich 5-500kHz, wobei die Dämpfung durch die unter der Spitze befindliche Luftsäule entsteht. Die Amplitude liegt bei 5-50nm. In Flüssigkeit wird die Resonanzfrequenz zu 5-40kHz verschoben, stark verbreitert und mehrmodal: der Cantilever verhält sich wie ein elastisches System mit mehreren Schwingungsmoden. Um die enorme Dämpfung, die die Flüssigkeitssäule unter der Spitze hervorruft, zu umgehen,

schwingt nun nicht der Cantilever selbst, sondern die ganze Meßzelle^d, in der in Lösung gemessen wird. Dabei erreicht das Auflösungsvermögen im Tapping-Modus nicht das vom Kontakt-Modus, da die Schwingung des Cantilevers nie genau senkrecht zur Probenoberfläche verläuft.

In dieser Arbeit wurden ausschliesslich gespaltene Glimmer-Substrate für die Proben benutzt. Der J-Scanner, bestehend aus einer Piezokeramik, tastet eine Fläche von $100\mu\text{m} \times 100\mu\text{m}$ und $5\mu\text{m}$ in z-Richtung ab. Er wird kalibriert von einem Nanoscope IIIa-Controller mit 16-bit-Auflösung in allen drei Raumrichtungen. Das Signal wird in ein Extender Electronic Module gespeist, welches Phasen und Frequenzen mit einer Genauigkeit von 0.03Grad bzw. 0.1Hz detektiert. Die gesamte Anlage ist ein Produkt von Digital Instruments, Santa Barbara.

6 Fällungsversuche am makrokristallinen System Brushit

6.1 Homogene Nukleierung von Calciumphosphat aus übersättigter wäßriger Lösung

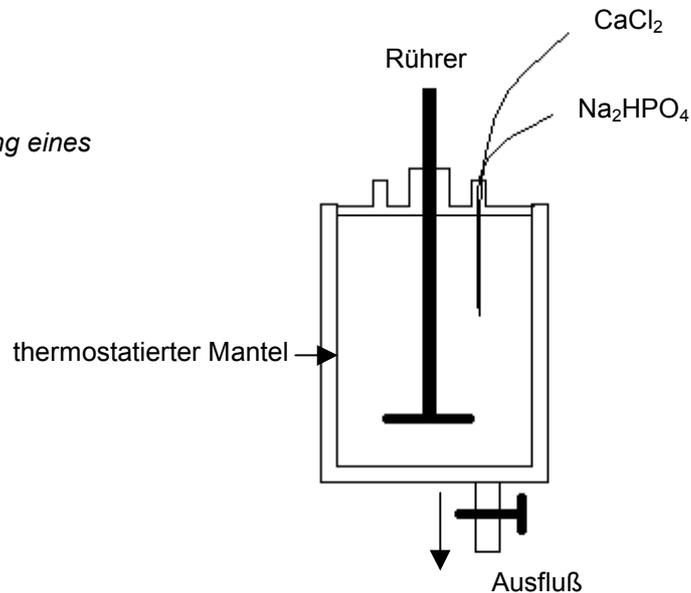
Die Charakterisierung der Calciumphosphatphase stellt den ersten Schritt zum Verständnis des komplexen Verhaltens der Komposite dar, die den Gegenstand dieser Arbeit bilden. In Kapitel 3 wurde bereits die Bildung von amorphem Calciumphosphat in wäßriger Lösung und seine Umwandlung in metastabile Zwischenstufen bis hin zum thermodynamisch stabilen Hydroxyapatit anhand der Literatur umrissen. Diese Prozesse werden hier unter experimentellen Bedingungen verfolgt, die für alle nachfolgenden Fällungsversuche beibehalten werden.

^d Diese ist aus Glas und hat ein Probenvolumen von $50\mu\text{l}$. Die Schwingung wird von einem Piezokristall erzeugt. Abgedichtet wird die Probe durch einen O-Ring aus Silikon, auf dem der Glaskörper aufliegt.

6.1.1 Fällung im Doppel-Jet-Reaktor

Calciumphosphatkolloide werden im sogenannten Doppel-Jet-Reaktor⁵³ erzeugt, der in der folgenden Abb. 11 dargestellt ist.

Abb. 11: Schematische Darstellung eines Doppel-Jet-Reaktors



Durch die *Jets* werden eine CaCl₂- und eine Na₂HPO₄-Lösung mit einer bestimmten Geschwindigkeit der im Reaktor befindlichen Lösung zugeführt. Das Konzentrationsverhältnis Ca/P beträgt dabei immer 1,67 und entspricht damit dem stöchiometrischen Verhältnis zur Bildung von HAP. Während der Zugabe wird die Lösung im Reaktor gleichmäßig stark gerührt. Der verschwindende Abstand der beiden *Jets* voneinander sorgt für eine sehr hohe lokale Übersättigung mit Ca²⁺- und HPO₄²⁻-Ionen. Diese hat zur Folge, daß Nukleationskeime spontan am Auslauf der *Jets* gebildet werden. Durch das starke Rühren werden sie allerdings am weiteren Wachstum zunächst gehindert, indem sie vom Ort ihrer Entstehung fortgerissen werden. Auf diese Weise wird eine schnelle und gleichmäßige Verteilung der Nukleationskeime in der Lösung gewährleistet. Sobald ihre Konzentration einen Schwellenwert überschreitet, setzt das Wachstum der Keime ein. Kolloidale Dispersionen, die auf diese Weise homogen nukleiert werden, bestehen aus Partikeln mit relativ enger Größenverteilung^{54,55}.

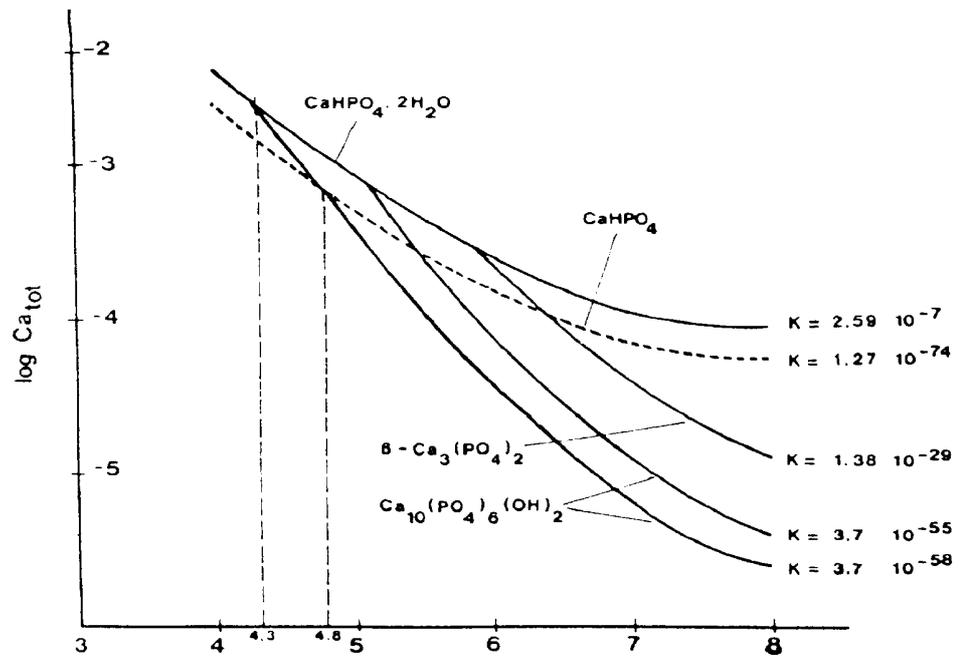
Experiment

Nach Filtration durch einen Filter mit Porengröße 450nm werden jeweils 10ml einer 5mM-CaCl₂- und einer 3mM-Na₂HPO₄-Lösung durch den Doppel-Jet 100ml bidestilliertem, entionisiertem und filtriertem Wasser innerhalb einer Stunde zugegeben. Noch im Laufe des Fällungsexperimentes erscheint die entstandene Dispersion milchig trüb. Ein weißer Niederschlag bildet sich aus. REM und WAXS zeigen, daß das Material amorph ist. In Wasser durchläuft diese amorphe Phase in den folgenden Stunden eine Umwandlung in flache, sehr dünne Kristalle charakteristischer Geometrie, die die Modifikation Bruschit darstellen. Befinden sich diese plättchenförmigen Bruschitkristalle weitere 24 Stunden in Wasser, lösen sie sich auf, um Hydroxyapatit zu bilden, welches in Form von nadelförmigen Kristallen erscheint. Diese Umwandlungen werden mit WAXS und unter dem Polarisationsmikroskop verfolgt, wie schon in Kapitel 3 ausgeführt wurde.

Offenbar gilt für jeden einzelnen Schritt der Umwandlung von amorphem Calciumphosphat in Hydroxyapatit, daß die Nukleierung der neuen Phase auf der Oberfläche der vorläufigen energetisch günstiger ist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit bereits beschriebenen Ergebnissen⁵⁶. Das anschließende Wachstum der neuen Phase vollzieht sich durch Diffusion von Ionen aus der sich auflösenden alten. Analog zur bekannten Ostwald-Reifung wachsen hier also die stabileren Nuklei auf Kosten der instabileren, wobei die Stabilität offenbar nur von der Kristallmodifikation abhängt und nicht etwa z.B. von der Kristallgröße.

Aus dem Phasenverhalten von Calciumphosphat ist bekannt, daß Zwischenstufen wie z.B. Bruschit bei bestimmten Bedingungen stabilisiert werden können. Die folgende Abb. 12 zeigt, daß Bruschit bei einem pH-Wert unter 4,2 die energetisch günstige Modifikation ist. Polymere stellen andere, sehr effektive Stabilisatoren für bestimmte Mineralphasen dar.

Abb. 12:
Auftragung der
Löslichkeit
verschiedener
Kristallmodi-
fikationen
des Calcium-
phosphates als
Funktion vom pH-
Wert bei
Raumtemperatur



Eine weitere Beobachtung ist im Zusammenhang mit der Kinetik der Calciumphosphat-Fällung von Interesse. Im thermodynamischen Gleichgewicht haben die in Wasser gebildeten Brushitkristalle die makroskopische Form:

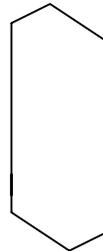
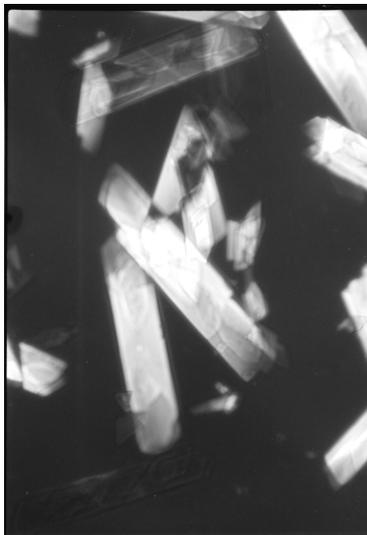


Abb. 13: Typische Erscheinungsform von Brushitplättchen, aufgenommen im Polarisationsmikroskop. Die Kristalle sind ca. 1mm lang.

Dabei liegen diese oft nicht vereinzelt, sondern sternförmig angeordnet vor.

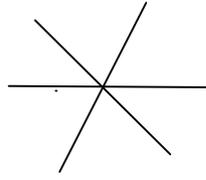
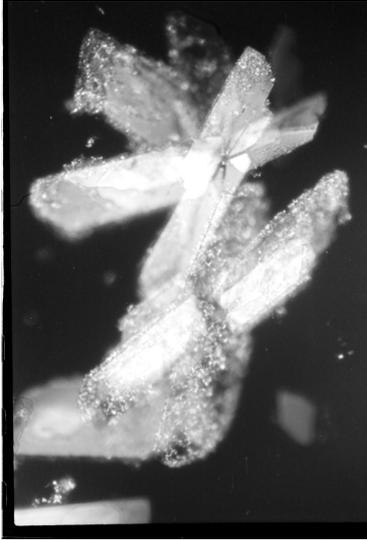


Abb 14: Brushitplättchen, die auf ihren Kanten liegen und sternförmig verbunden sind. Sichtbar im Polarisationsmikroskop ist ebenfalls die Umwandlung zu Hydroxyapatit.

Die Kristalle können mit bekannten starken Calciumliganden wie EDTA wieder aufgelöst werden. Dann beginnt die Auflösung in der Mitte des Plättchens und breitet sich von dort aus in alle Richtungen aus, wie mittels Polarisationsmikroskopie dokumentiert.

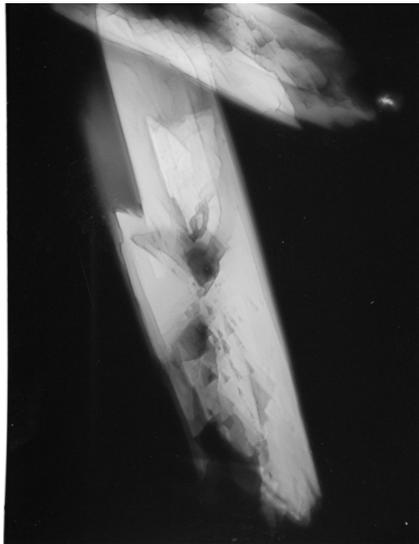


Abb. 15: Brushitplättchen, die mit EDTA aufgelöst werden. Die Auflösung ist am deutlichsten in der dunklen Mitte der einzelnen Teilchen zu sehen.

Diese höchste Löslichkeit des Gebildes im Zentrum läßt, unter der Annahme, daß die Lösung isotrop und keine Richtung für die Diffusion von Ionen bevorzugt sei, vermuten, daß die dort zuerst gebildete feste Phase viele Fehlstellen enthält oder sogar amorph ist. Da in all diesen Versuchen die Kristallisationskeime sehr schnell gebildet wurden, ist es einsichtig, daß diese eine energetisch ungünstige Form annehmen. Darauf kann eine höher geordnete Struktur nun aufwachsen, in diesem Fall die kristalline Form höchster Löslichkeit – die des Brushits. Dies ist in der isotropen Lösung wiederum für alle Richtungen gleich wahrscheinlich, womit die

Entstehung der Sterne zu erklären ist. Es liegt also nah, daß sie keine Aggregate aus einzelnen Plättchen, sondern kompakte Gebilde sind.

6.2 AFM an Bruschit in Lösung unter Zugabe von Polymeren

Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit ist, spezifische Wechselwirkungen zwischen geeigneten Polymeren und einem Anorganikum am Beispiel Calciumphosphat zu bestimmen. Eine mögliche Vorgehensweise besteht darin, eine definierte kristalline Struktur von Calciumphosphat vorzulegen und Adsorption von gelösten Polymeren an die kristalline Oberfläche zu beobachten. Da sich das Interesse nicht nur auf spezifische Adsorption, sondern auch auf deren Dynamik richtet, wird eine analytische Methode benötigt, die in der Lage ist, Strukturen auf der Nanometerskala in Lösung und zeitaufgelöst abzubilden. Diesen Anforderungen entspricht die AFM in Lösung, wie sie in Kapitel 5.2.3 bereits beschrieben wurde.

Calciumphosphat wird mit der Doppel-*Jet*-Technik hergestellt. Der Niederschlag befindet sich in Wasser bis sich die Bruschitphase ausbildet. Diese bietet eine gut definierte glatte (010)-Fläche mit einer Ausdehnung von 1-2mm² an, die sich sehr gut als Substrat eignet. Ein weiterer Vorteil ist die geringe Gesamtdicke der Kristalle, so daß eine hochauflösende Abbildung ihrer Oberfläche in z-Richtung ebenfalls möglich ist. Die Kristalle werden auf einen Träger aus gespaltenem Glimmer aufgetropft und an Luft getrocknet. Darauf wird die Meßzelle platziert, in die verschiedene Polymerlösungen gegeben werden, so daß diese die Bruschitkristalle gut benetzen können. Im zeitlichen Abstand von 512 Sekunden werden Bilder von der Kristalloberfläche unter dem Einfluß der Lösung aufgenommen.

6.2.1 Auflösung von Bruschit in Wasser

Das erste Experiment veranschaulicht die Auflösung der (010)-Fläche des Bruschit in reinem Wasser. Diese geschieht offenbar entlang ausgewählter kristallographischer Richtungen, die mit Kenntnis der Struktur der (010)-Fläche zugeordnet werden

können. Die folgenden zwei AFM-Aufnahmen wurden im Intervall von 2048 sec aufgenommen und zeigen das charakteristische Muster, das die Auflösung prägt.

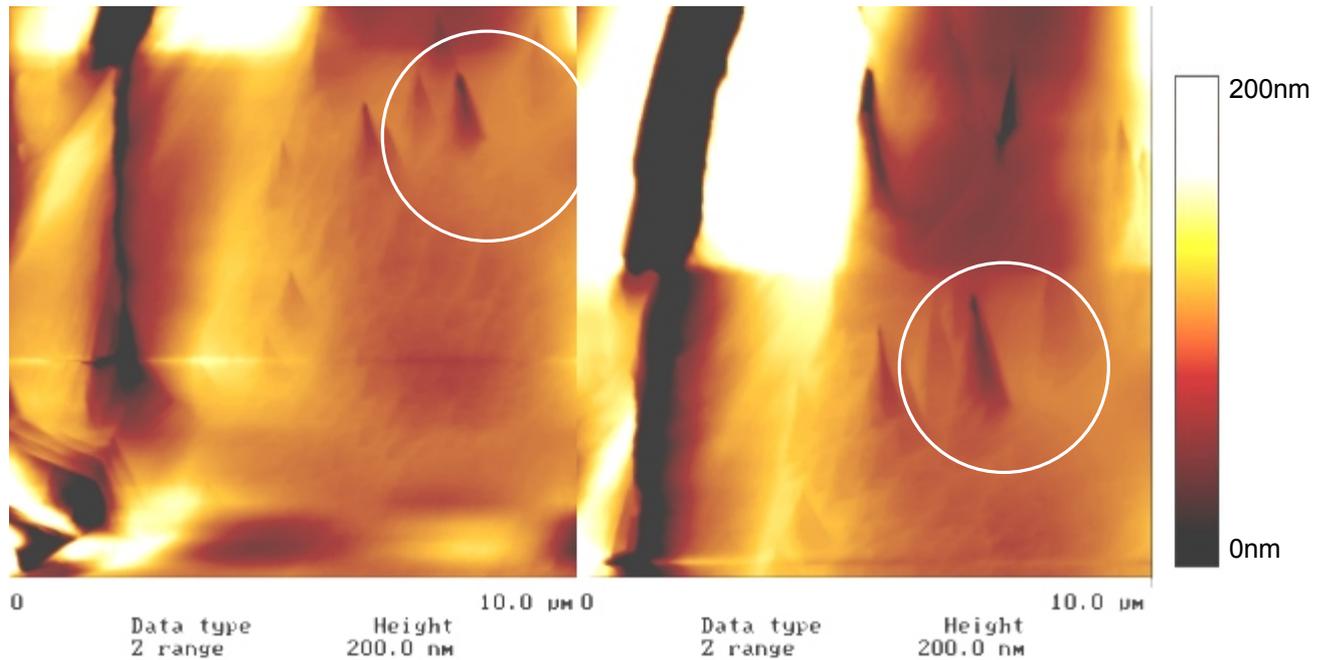
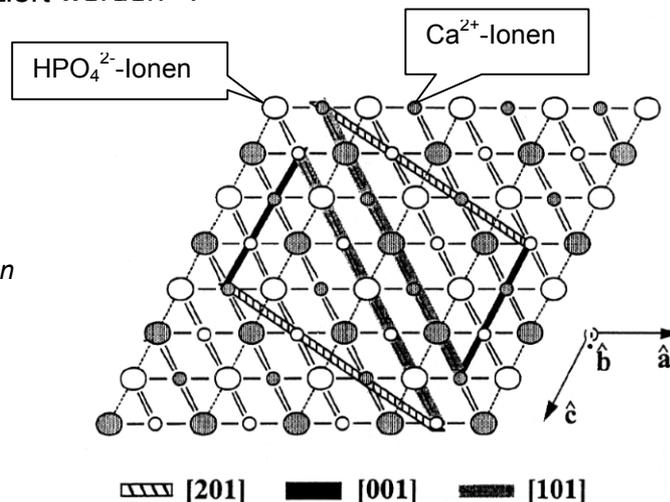


Abb. 16: AFM-Höhenbilder der (010)-Fläche von Brushit in Wasser, aufgenommen im zeitlichen Abstand von 2048 sec.

Die charakteristischen Kanten, die zu sehen sind, können anhand der folgenden schematischen Darstellung identifiziert werden⁵⁷.

Abb. 17: Schematische Darstellung der (010)-Ebene von Brushit in der Aufsicht. Hervorgehoben sind kristallographische Richtungen, denen die Auflösung der Oberfläche folgt.



Aus der zeitlichen Änderung der Kantenlängen kann z.B. für die (201)-Richtung eine Geschwindigkeit der Auflösung von 0,16nm/s berechnet werden.

Weiter zeigt die Auswertung des Höhenbildes aus der AFM, daß die Auflösung der (010)-Fläche eine Tiefe von 7Å erreicht, welche genau einer Monolage des Brushitkristalls entspricht. Dieser Befund ist ebenfalls mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vereinbar⁵⁸.

6.2.2 Auflösung von Bruschit in Polyaspartatlösungen

Das Experiment wird analog mit wässrigen Lösungen von Polyaspartat mit der Konzentration $0,63\mu\text{M}$ durchgeführt. Zur Verfügung stehen Polymere mit den Molekulargewichten 10000g/mol (Pasp10) und 18000g/mol (Pasp18).

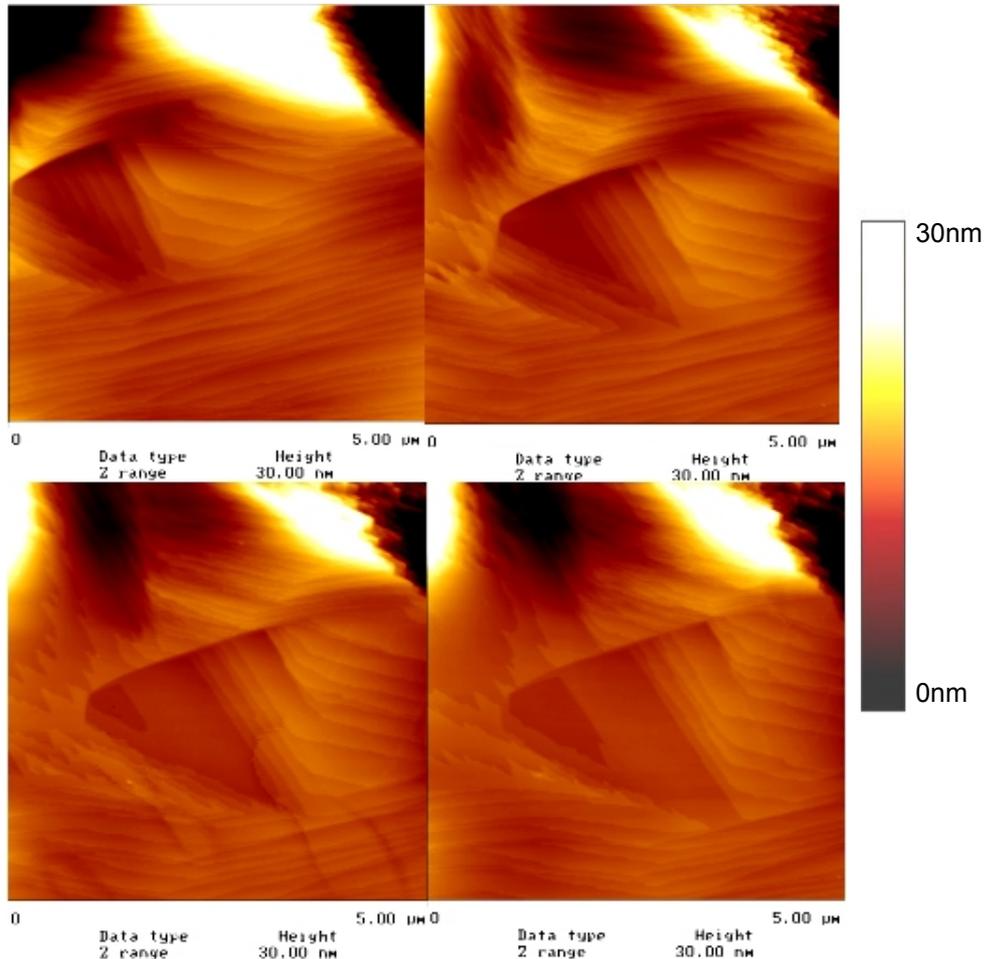


Abb. 18: Ausgewählte AFM-Höhenbilder aus einer Serie, die die Auflösung der (010)-Bruschitfläche in einer $0,63\mu\text{M}$ -Pasp18-Lösung dokumentieren.

Die in Abb. 18 gezeigten AFM-Aufnahmen stammen aus einer Serie von 24 Bildern, die unter Einwirkung der Pasp18-Lösung nacheinander aufgenommen und zur Auswertung der Auflösungsgeschwindigkeit entlang bestimmter Achsen herangezogen werden.

Die erste Beobachtung ist, daß keine Adsorption von Polymeren an die Kristalloberfläche stattfindet. Dagegen sieht man die Bildung des schon vom reinen Wasser bekannten Musters, dem die Auflösung der (010)-Fläche folgt. Offenbar ist die Wechselwirkung zwischen den Carboxylgruppen des Polymers und den

Calciumionen des Kristallgitters stark genug, um den Kristallverband zu überwinden und Ionen herauszulösen. Die Vermutung liegt nah, daß Ca^{2+} -Ionen an die Carboxylgruppen von Polyaspartat ionisch binden, es kommt aber zu keiner Flockung des Polymers. Auch nach Fortsetzen der Auflösung mit Hilfe des Polymers wird die saubere Kristalloberfläche abgebildet, und es erscheint kein Niederschlag. Besonderheiten bei der Auflösung der (010)-Oberfläche des Bruschit durch Pasp18, die neu im Vergleich mit dem Experiment in reinem Wasser, sind

1. die Stabilität der (100)-Kante. Die Auflösungsgeschwindigkeit der (201)-Kante wächst auf den Wert von 0,45nm/sec.
2. die Auflösung in die (010)-Ebene hinein ist sichtbar.

Um die Reproduzierbarkeit dieser Ergebnisse und die Musterbildung als für die ganze Probe repräsentativ zu zeigen, wurde das System unter dem Polarisationsmikroskop untersucht. Die folgenden Aufnahmen zeigen das bekannte Dreiecksmuster.

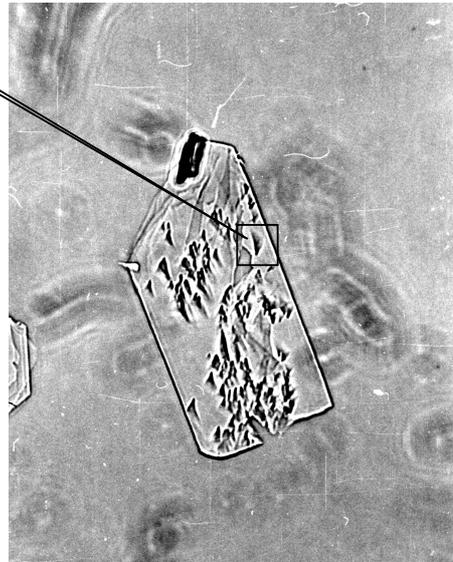


Abb. 19: Lichtmikroskopische Aufnahme an Bruschitplättchen mit Länge ca. 0,5mm, die einer Pasp18-Lösung ausgesetzt wurden.

Schließlich lösen sich die Bruschitplättchen auf.

Die folgenden Abbildungen verdeutlichen den Effekt des niedermolekularen Polyaspartats von 10000g/mol auf die Kinetik der Auflösung von Bruschit durch das Polymer. Die Aufnahmen sind im zeitlichen Abstand von 512 sec entstanden.

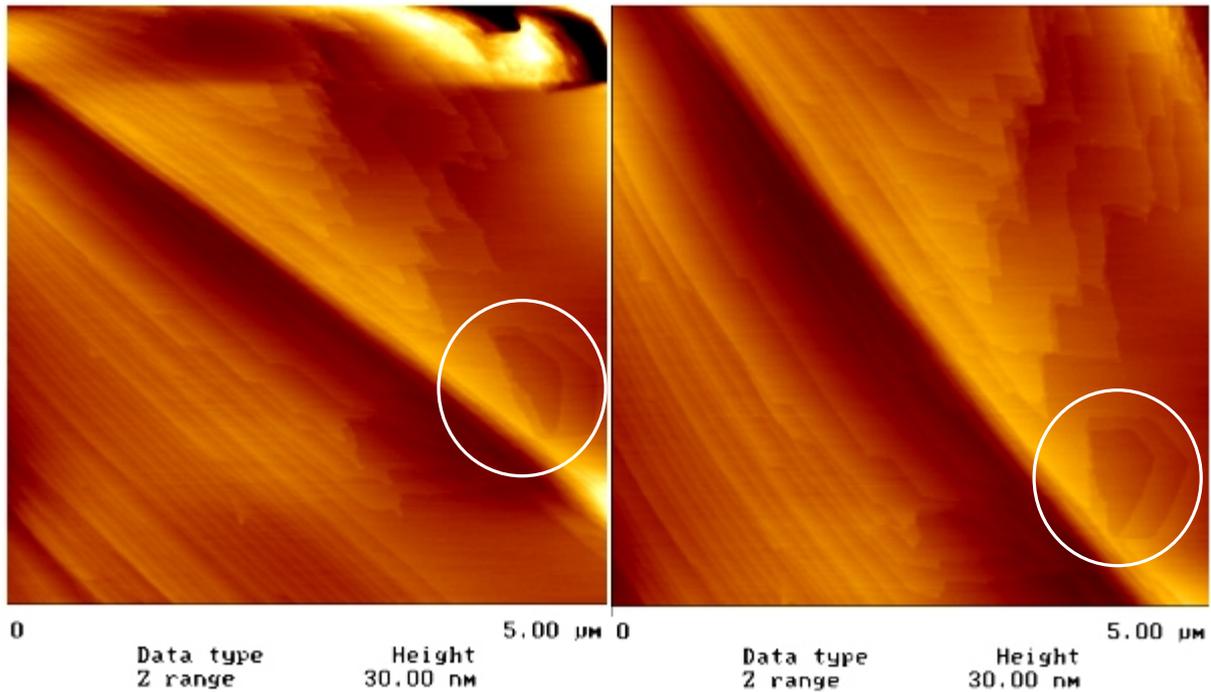


Abb. 20: AFM-Höhenbilder zur Auflösung der (010)-Bruschtfläche durch die 0,63 μ M-Pasp10-Lösung. Die zeitliche Entwicklung der Dreiecksmuster rechts unten wird zum Vergleich herangezogen.

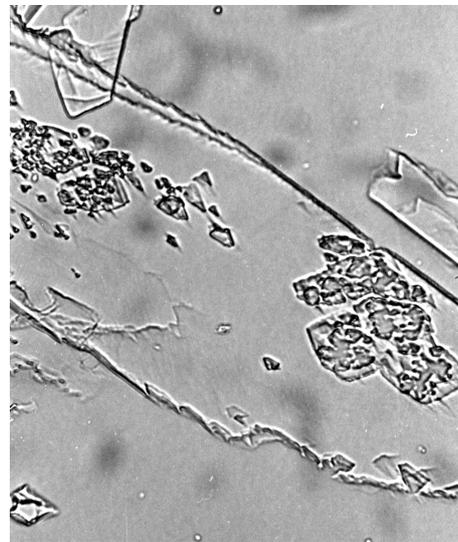
Es ist eine erheblich langsamere Auflösung zu beobachten. Sie zeichnet sich dadurch aus, daß die von Pasp18 bekannten Muster als weniger regelmäßig erscheinen. Darüber hinaus ist nur eine vernachlässigbare Auflösung in (010)-Richtung zu beobachten. Man kann sagen, daß die Kinetik gegenüber der der Pasp18-Lösung verlangsamt ist, was in der geringeren Anzahl von COOH-Gruppen begründet sein kann.

6.2.3 Auflösung von Bruschat durch andere Zusätze

Nachdem im vorangegangenen Kapitel gezeigt werden konnte, daß Polyaspartat mit Calciumionen wechselwirkt, die sich in einer bestimmten Anordnung innerhalb des Bruschat-Kristallgitters befinden, erhebt sich die Frage, wie Moleküle mit anderen Funktionalitäten die Kristalloberfläche modifizieren. In dem einführenden Kapitel 2 über Biomineralisation wurde die Rolle von Proteinen als Regulatoren des Mineralisierungsprozesses in lebenden Organismen besprochen. Ein Protein, das immer wieder als wesentlicher Bestandteil bei der Analyse biomineralisierter

Systeme in der Natur nachgewiesen wurde, ist Albumin⁵⁹. Andererseits ist Rinderserum-Albumin (BSA) inzwischen sehr gut bekannt und mit unterschiedlichsten Methoden charakterisiert worden⁶⁰. Aus der Kenntnis, daß in BSA von 582 Aminosäureresten pro Molekül 41 Aspartat-, 59 Glutamat- und 59 Lysin-Gruppen als mögliche Partner für eine Wechselwirkung mit den Ionen des Calciumphosphats besitzt, resultiert der Einsatz dieses Moleküls in einem analogen Experiment zu dem, das im vorangegangenen Kapitel 6.2 beschrieben wurde. Brushitkristalle, die in Abb. 1, links schon zu sehen waren, werden einer BSA-Lösung mit pH 5.5 ausgesetzt. Nach zwei Tagen werden sie im Lichtmikroskop photographiert. Nachfolgend ist zunächst eine solche Aufnahme im Durchlicht zu sehen.

Abb. 21: Lichtmikroskopische Aufnahme eines Brushitplättchens mit der Länge von ca. 0,5mm unter der Einwirkung einer BSA-Lösung.



Es ist eine Musterbildung auf der Kristalloberfläche zu erkennen, die erheblich von der bisher von Polyaspartat-Lösungen bekannten abweicht. Offenbar sind zusätzliche stabile Kanten entlang neuer kristallographischer Richtungen entstanden. Die Ausbildung dieser wird wieder hochaufgelöst und zeitabhängig mit der Methode der AFM verfolgt, wobei wieder die Konzentration $0,63\mu\text{M}$ für BSA gewählt wird. Im folgenden sind drei im zeitlichen Abstand von 512 sec aufgenommene Höhenbilder zu sehen.

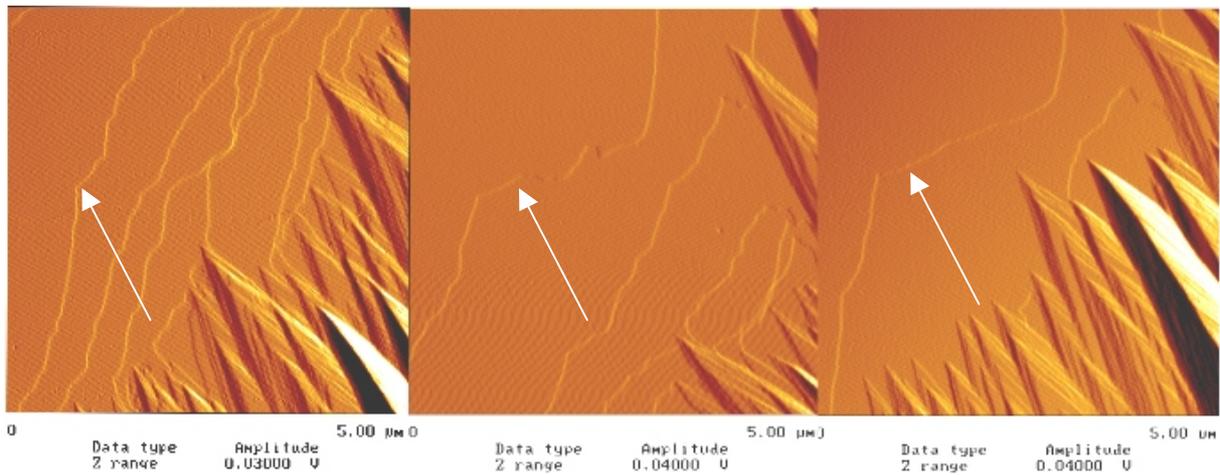


Abb. 22: Drei AFM-Amplitudenbilder, die die Ausbildung spezifischer stabiler Kanten auf der (010)-Bruschitfläche unter der Einwirkung einer 0,63 μ M-BSA-Lösung veranschaulichen. Als Referenzrichtungen dienen die Dreiecksmuster, die bereits von AFM-Experimenten mit Polyaspartat-Lösungen bekannt sind.

Wieder ist keine Adsorption des Proteins an die Kristalloberfläche zu beobachten. Man erkennt das von den Polyaspartat-Lösungen bekannte Dreiecksmuster wieder. Ein Ausmessen der Winkeln bestätigt, daß es sich um dieselben Kanten entlang der ionisch gebundenen Atomstränge aus Abbildung 2 handelt. Darüber hinaus bilden sich im Laufe der Zeit andere charakteristische Richtungen aus, die links im Bild 22 zu sehen sind und deren Winkeln mit denen im polarisationsmikroskopischen Bild 21 identisch sind. Anhand der Kristallstruktur des Bruschitwellblatts können diese identifiziert werden. Dies ist in der folgenden schematischen Darstellung gezeigt.

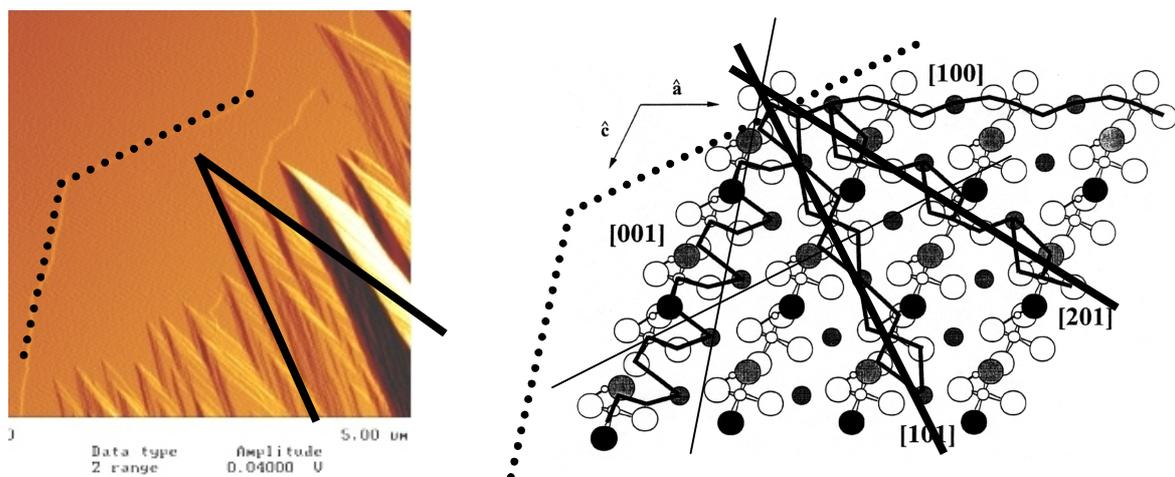


Abb. 23: Zuordnung der kristallographischen Richtungen, entlang derer Auflösung der (010)-Bruschitebene durch BSA-Zugabe stattfindet. •••• bezeichnet nichtionisch gebundene Ketten. — ist bekannt aus Pasp18-Lösungen.

Die neu hinzugekommenen ausgezeichneten Richtungen für stabile Kanten weichen von den ionisch gebundenen Ketten des Kristallgefüges ab. Um einen Hinweis darauf zu bekommen, welche aktiven Seitengruppen der Proteinkette an der Ausbildung der neuen Vorzugsrichtungen beteiligt sein können, ist es notwendig, Homopolymere mit bestimmten Funktionalitäten in Vergleichsexperimenten einzusetzen. Kationisch funktionalisierte Polymere versprechen, selektive Wechselwirkungen mit den Phosphationen im Kristallgitter einzugehen. Aus diesen Überlegungen heraus wurde Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht von 27000g/mol gewählt. Da vorläufig AFM-Aufnahmen in Lösungen, die Kationen enthalten, nicht möglich sind^e, findet die Auswertung auf der Grundlage von Aufnahmen aus dem Lichtmikroskop statt. Eine solche ist nachfolgend gezeigt. Sie stellt einen Bruschitkristall dar, der für zwei Tage einer Poly-L-Lysin-Lösung ausgesetzt war.

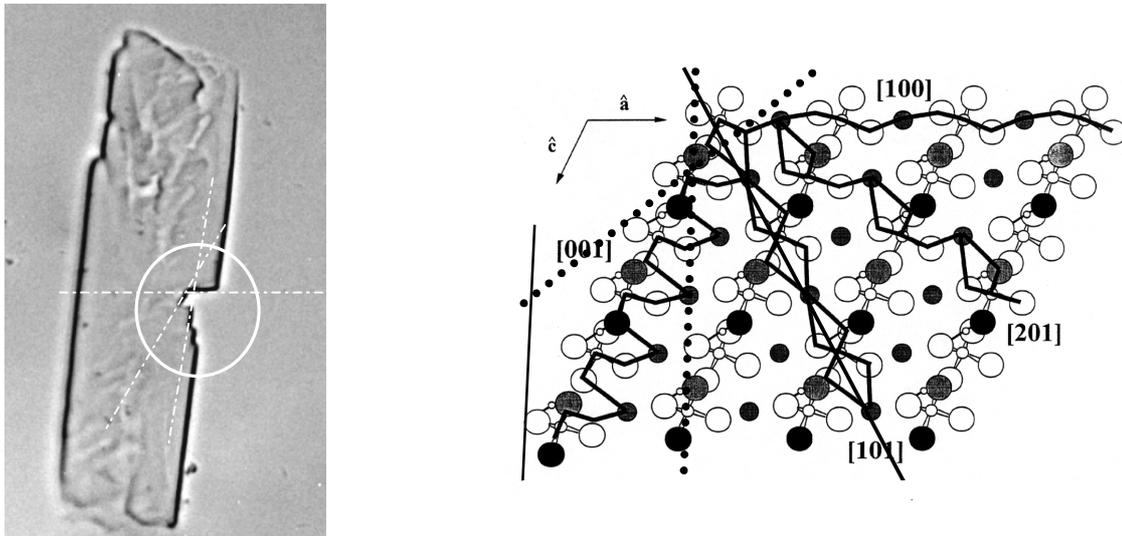


Abb. 24: Ausgezeichnete kristallographische Richtungen der (010) -Bruschitfläche in einer Poly-L-Lysin-Lösung. ••••• wurde schon in Abb. 23 beschrieben.

Es fällt auf, daß nur der Rand des Kristalls durch das Polymer angegriffen wird, jedoch nicht die (010) -Ebene. Die von den Polyaspartat-Lösungen bekannten Vorzugskanten sind nicht zu entdecken. Dagegen ergibt das Ausmessen der hier zu sehenden Winkel an den ausgebildeten Stufen eine Übereinstimmung mit denen, die in der BSA-Lösung neu entstanden und aufgrund der AFM-Aufnahmen bestimmt wurden.

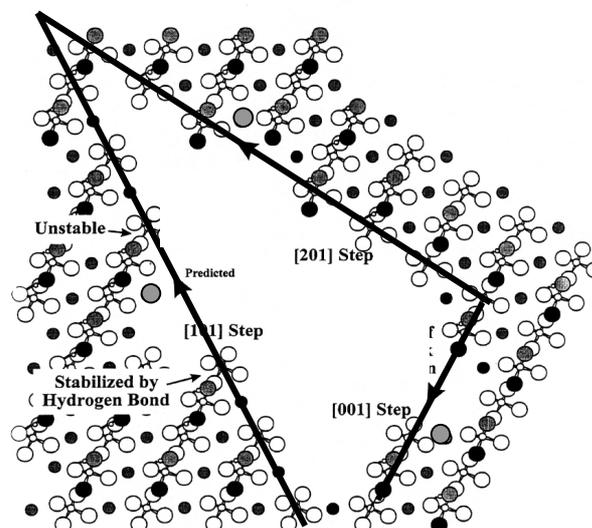
Alle Beobachtungen über die Auflösung von Bruschit in Lösungen verschiedener Polymere können mit den Punkten zusammengefaßt werden:

^e Kationen adsorbieren an die Si-Spitze und machen somit eine Abbildung der Oberfläche unmöglich.

- Die Umwandlung von Brushit in Hydroxyapatit wird in allen untersuchten wäßrigen Polymerlösungen im Zeitraum von Wochen unterdrückt.
- Es wurde keine Adsorption von Polymeren an die Kristalloberfläche mittels AFM beobachtet.
- Unter der Einwirkung von anionischen Polymeren lösen sich Brushitkristalle vollkommen auf.
- Kristallographische Achsen, entlang derer bevorzugt Auflösung der Kristalloberfläche stattfindet, sind sehr wohl für anionische und kationische Polymere unterscheidbar.
- Die stärksten Wechselwirkungen treten zwischen den stark carboxylhaltigen Polyaspartaten und den Ca^{2+} -Ionen des Kristallgitters auf, wie aus der Auflösungsgeschwindigkeit geschlossen werden kann. Dabei ist das langkettige Polyaspartat mit 18000g/mol offenbar in der Lage, Calciumionen auch in (010)-Richtung der Kristallmatrix zu entreißen.
- Effekte, die sowohl in Polyaspartat- als auch in Poly-L-Lysin-Lösungen zu beobachten sind, sind in BSA-Lösungen wiederzufinden.

Die Beobachtung, daß in Polyaspartat-Lösungen eine Auflösung des Kristalls stattfindet und keine Adsorption von Polymeren nachzuweisen ist, wird gestützt von Ergebnissen zur Komplexbildung von Calciumionen durch Polyaspartat aus Brushit- und Hydroxyapatitablagerungen zwecks Reinigung von Stahl⁶¹. Der Aufbau des Brushits mit stark hydratisierten Calciumionen ist noch einmal schematisch gezeigt, wobei Calciumionen mit unterschiedlichen Koordinationszahlen hervorgehoben sind.

Abb. 25: Ausgezeichnete Calciumionen mit 4 nächsten Nachbarn. Relativ dazu sind stabile und instabile Kanten bei der Auflösung der (010)-Brushitebene in Wasser eingetragen mit — .



Die geringe Koordinationszahl von vier und die zwei benachbarten Hydratwassermoleküle senken enorm die Energiebarriere für das Entreißen des Calciumions aus dem Kristallverband und seine Bindung an die Carboxylgruppe des Polyaspartats. Es liegt nah anzunehmen, daß die Positionierung von Ca^{2+} -Ionen kleiner Koordinationszahl im Kristallgefüge für die Ausbildung der charakteristischen Muster bei der Auflösung der (010)-Ebene sowohl in Wasser wie auch in Polyaspartat-Lösungen von Bedeutung ist. Da sich beide eingesetzten Polyaspartat-Lösungen nur im Molekulargewicht bei gleicher molarer Konzentration des Polymers unterscheiden, ist die beobachtete Auflösung des Kristalls in (010)-Richtung in der Lösung des langkettigen Polyaspartats auf sein hohes Molekulargewicht zurückzuführen. Das bedeutet wiederum, daß dieses Polymer in der Lage ist, in drei Dimensionen selektiv eine Bindung mit Calciumionen einzugehen, was in weiteren Experimenten mit kolloidalem Calciumphosphat in Lösung bestätigt werden soll.

Trotz der hohen Konzentration komplexierter Ca^{2+} -Ionen in der Polyaspartat-Lösung tritt sogar nach endgültiger Auflösung der Brushitkristalle kein Ausflocken des Polymers auf. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die starke Affinität des Polymers zu zweiwertigen Ionen, die entscheidend für die Dynamik des Systems ist.

Die Ergebnisse der Experimente mit BSA und Poly-L-Lysin führen zu der Annahme, daß deren Wechselwirkungen mit Ca^{2+} - bzw. HPO_4^{2-} -Ionen einer anderen Kinetik folgen, die die Ausbildung anderer Strukturen nach sich zieht. Diese Kinetik soll ebenfalls in Experimenten an kolloidalen Dispersionen von Calciumphosphat untersucht werden.

7 Kolloidale Calciumphosphat-Dispersionen

Der folgende Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem dynamischen Verhalten und der strukturellen Charakterisierung von Dispersionen kolloidalen Calciumphosphats. Zunächst soll die Herstellung der Dispersionen erörtert werden. Es folgt eine Betrachtung ihrer Stabilität auf verschiedenen Zeitskalen. Eine Zunahme in der Langzeitstabilität korreliert mit zunehmender Unterdrückung der Ausbildung einer kristallinen Phase, wie WAXS zeigt. Eine wesentliche Aufgabe soll darin bestehen, Mechanismen der Stabilisierung der Kolloide durch polymere Additive zu beleuchten, und der Frage nachzugehen, in welcher Weise diese die Kristallinität beeinflussen.

Diese Überlegungen führen zum Einsatz von Methoden, mittels derer die Struktur der in Lösung befindlichen Kolloide beschrieben werden soll. Die Kopplung vom Verständnis der vorhandenen Strukturen mit Erkenntnissen über die Kinetik im System soll zu einem Gesamtbild vom gleichermaßen kinetisch wie stereochemisch kontrollierten Entstehen von Calciumphosphat führen, das somit eine Parallele zu biomineralisierten Systemen darstellt. Die Kontrolle soll durch ausgewählte Polymere ausgeübt werden.

Die Vorgehensweise bei den im Kapitel 6 dargelegten Experimenten war die, eine definierte kristalline Struktur dem Polymer zur Wechselwirkung anzubieten. Die Voraussetzungen sind Kenntnis der Kristallmodifikation und somit der Anordnung der Atome in ihr, sowie Kenntnis über den chemischen Aufbau des Polymers und seine Konformation, wobei diese nicht immer bekannt ist. Es zeigte sich, daß die eingesetzten Polymere sehr spezifisch mit dem Atomverband im Kristall wechselwirken. Nun soll das umgekehrte Experiment ebenfalls durchgeführt werden: einer wäßrigen Lösung eines bestimmten Polymers sollen Ca^{2+} - und HPO_4^{2-} -Ionen in einer Übersättigung zugeführt werden, die es erlaubt, daß eine feste Calciumphosphatphase gebildet wird. Die Polymere, die dafür gewählt wurden, sind das Polyaspartat mit den zwei verschiedenen Molekulargewichten von 10000g/mol bzw. 18000g/mol und das BSA. Aus den Versuchen, die im Kapitel 6 dargestellt wurden, kann deduziert werden, daß eine Wechselwirkung zwischen dem Polymer und kristallinem Calciumphosphat zuerst durch Komplexierung von Calciumionen geschieht. Es ist zu erwarten, daß das um so mehr der Fall sein wird, wenn Ca^{2+} -Ionen frei in Lösung vorliegen. Es erhebt sich also die Frage, welche Auswirkung das Komplexieren von Calciumionen auf die Polymerkonformation haben und wie dieser Komplex seinerseits mit den Phosphationen interagieren wird.

Um die Kinetik dieser Prozesse sowie die Struktur der entstandenen Kolloide analysieren zu können, werden als analytische Methoden in Lösung dynamische und statische Lichtstreuung sowie Kleinwinkel-Röntgenstreuung eingesetzt. Als abbildende Methoden kamen die Lichtmikroskopie, die Transmissions-Elektronenmikroskopie und die Atomkraftmikroskopie zum Einsatz.

7.1 Herstellung der Calciumphosphat-Dispersionen

Alle Lösungen für die folgenden Experimente wurden nach der schon aus Kapitel 6.1 bekannten Methode in Doppel-*Jet*-Reaktor hergestellt. Davon abweichende Experimente werden an gegebener Stelle explizit beschrieben.

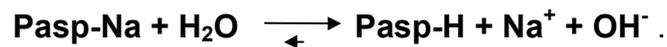
Die Vorgehensweise ist die, eine Polymerlösung vorzulegen, in die durch zwei benachbarte *Jets* Ca^{2+} - und HPO_4^{2-} -Ionen mit einer bestimmten Geschwindigkeit zugegeben werden. Die Polymerlösung nimmt im Reaktor ein Volumen von 100ml ein, welches auf 25°C thermostatiert ist. Die Zufuhr von Ionen findet innerhalb von 60min unter ständigem, starkem Rühren statt. Da über den Doppel-*Jet* eine kontrollierte, homogene Nukleation von Calciumphosphat-Kolloiden in der Polymerlösung eingeleitet werden soll, wird versucht, alle möglichen Verunreinigungen im Reaktor sowie der Reaktanden selbst auszuschließen. Zu diesem Zweck wird der Reaktor immer vor dem Einsatz mit HCl gereinigt und ausgiebig mit doppelt destilliertem Wasser gespült. Die als Reaktanden benutzten wäßrigen Polymer-, CaCl_2 - und Na_2HPO_4 -Lösungen werden durch Minisart-Filter (Sartorius, Göttingen) der Porengröße 450nm gereinigt.

Es wurde bereits betont, daß es in dieser Arbeit um die Aufklärung von Strukturausbildung, aber besonders der ihr zu Grunde liegenden Dynamik gehen soll. Mit dem Polymermolekül, dem Ca^{2+} - und dem HPO_4^{2-} -Ion stehen bei der Fällungsreaktion drei Reaktionspartner und deren Gegenionen Na^+ und Cl^- zur Verfügung. Erkenntnisse über die Kinetik des Systems sind daher durch Variation der absoluten Konzentration jedes einzelnen Reaktionspartners wie der Verhältnisse der Konzentrationen zueinander zu gewinnen, falls alle sonstigen Bedingungen wie pH-Wert, Temperatur und Druck unverändert bleiben. Begonnen wird mit einer Reihe von Fällungsexperimenten, in der der einzige variable Parameter die Konzentration des Polymers ist. Den Ergebnissen aus Kapitel 6.2.2 zufolge, ist das Polyaspartat mit dem Molekulargewicht von 18000g/mol ein vielversprechendes Makromolekül hinsichtlich komplexer Wechselwirkungen mit Calciumphosphat. Deshalb wird eine Konzentrationsreihe wäßriger Lösungen des Pasp18 hergestellt, in denen mit der hier beschriebenen Doppel-*Jet*-Methode kolloidales Calciumphosphat gefällt wird. Das Poyaspartat wird in bidestilliertem, entionisiertem Wasser zu 100% gelöst. Die folgende Tabelle enthält die Konzentrationen der hergestellten Lösungen in %G/V und Mol/l. Der mit einem 716 DMS Titrimo-pH-Meter (Metrohm, Filderstadt) gemessene pH-Wert aller Lösungen beträgt 8,1.

% G/V	Mol/l
0,01	$5,56 \cdot 10^{-8}$
0,1	$5,56 \cdot 10^{-7}$
0,5	$2,78 \cdot 10^{-6}$
1	$5,56 \cdot 10^{-6}$

Tab. 2: Konzentration der wäßrigen Lösungen des Polyaspartats mit Molekulargewicht 18000g/mol.

Die basischen pH-Werte sind darauf zurückzuführen, daß das Natriumsalz der Asparaginsäure in Wasser zwar dissoziiert, Wasser aber die stärkere Säure ist, weshalb das Aspartat protoniert vorliegt und ein Überschuß an OH⁻-Ionen besteht. Das Gleichgewicht kann dargestellt werden als:



Mögliche Konformationen des Moleküls haben bereits in Kapitel 4 Erwähnung gefunden.

0.5M CaCl₂ und 0.3M Na₂HPO₄ werden zu je 10ml der Polymerlösung zugeführt. Das bedeutet für die molaren Konzentrationen in der Polyaspartatlösung 5 mMol/l für CaCl₂ und 3 mMol/l für Na₂HPO₄. Das Konzentrationsverhältnis Ca/P von 1,67 entspreche einer bevorzugten Kristallmodifikation des Hydroxyapatit. Diese würde zusätzlich durch den pH 8,1 favorisiert werden.

7.2 Ergebnisse für Pasp18

Die so entstandenen Dispersionen unterscheiden sich stark in ihrer Stabilität. Oberhalb der Polyaspartatkonzentration von 0.1%G/V bildet sich im Anschluß an die Fällungsreaktion kein Niederschlag mehr aus. Die Dispersionen sind farblos, aber von auffällig hoher Viskosität. Alle Dispersionen werden zentrifugiert, bei 50°C getrocknet und mit WAXS in Reflexion vermessen. Die Unterdrückung der Kristallinität mit zunehmender Polyaspartatkonzentration korreliert mit der

besprochenen Stabilität. Dies ist an der nachfolgend abgebildeten Graphik verdeutlicht.

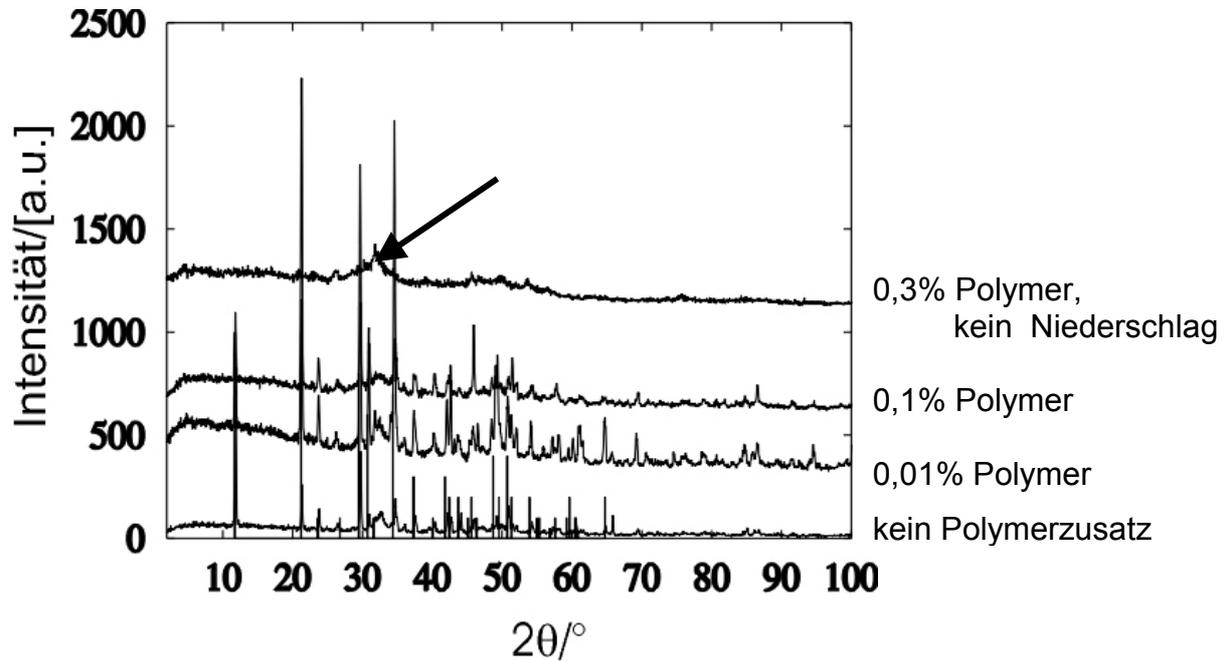


Abb. 26: WAXS-Refraktogramme, die eine Abnahme der Kristallinität von unten nach oben zeigen. Angepaßt ist das Refraktogramm für Bruschi. Der Pfeil deutet den Zuwachs des amorphen Anteils an.

Die mit steigender Polyaspartatkonzentration zunehmende Breite der Peaks bedeutet eine Abnahme in der Ausdehnung der Kristallite. Ihre Modifikation ist Bruschi zuzuordnen, während mit abnehmender Kristallinität der Anteil einer amorphen Komponente in den WAXS-Refraktogrammen wächst. Ein Vergleich der polarisationsmikroskopischen Aufnahmen vom Niederschlag in den gering konzentrierten Polyaspartat-Lösungen (G/V unter 0,1%) mit in Wasser gefälltem Bruschi deuten darauf hin, daß die kristalline Phase stark durch das Polymer beeinflusst ist.

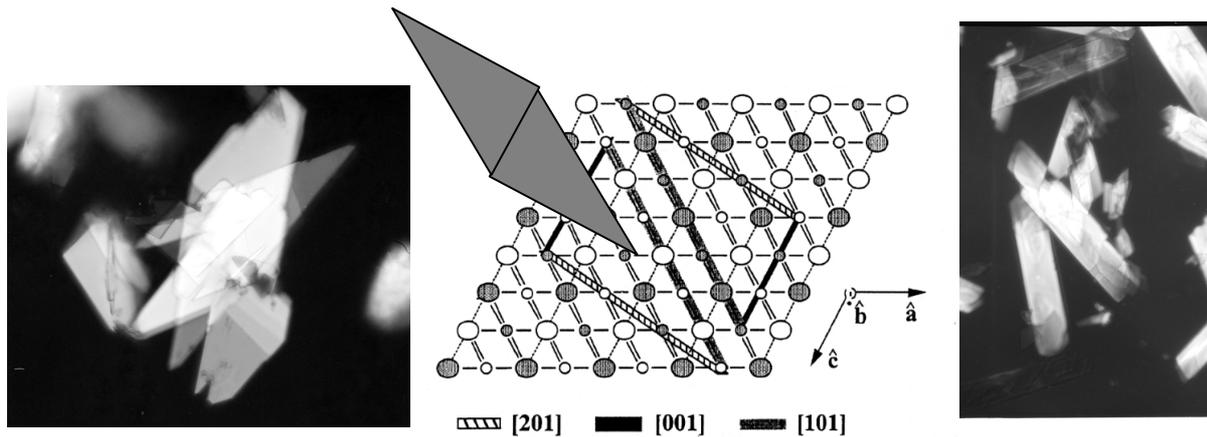


Abb. 27: Bruschkristalle, ca. 1mm lang, entstanden in Wasser (rechts) und in einer wäßrigen 0,01%-igen Pasp18-Lösung (links), aufgenommen im Polarisationsmikroskop. Die Symmetrie ist bekannt.

Die Gestalt der in der 0,01%-igen Lösung gefällten Bruschkristalle weicht von der der in Wasser hergestellten Plättchen ab. Ein Ausmessen der Winkel in der Aufnahme rechts zeigt, daß sie genau mit den Winkeln übereinstimmen, die bei der Auflösung von Bruschkristallen in Polyaspartat-Lösungen mit AFM als charakteristisch gezeigt wurden.

Diese Beobachtung steht im Einklang mit experimentellen Ergebnissen, die darauf hin deuten, daß stark carboxylhaltige Polymere und Proteine sowohl gute Nukleatoren für das Mineral als auch effektive Inhibitoren seines Wachstums sind⁶². Hier kann aber zwischen beiden Effekten nicht unterschieden werden. In den Bildern ist ebenfalls die Zunahme des amorphen Anteils zu sehen, der auch im Überstand präsent ist. Seine Beschaffenheit zu untersuchen ist die Aufgabe der im folgenden dargestellten Streuexperimente.

7.2.1 Streuung an den Pasp18-Dispersionen

Um die im Doppel-Jet hergestellten Dispersionen zunächst mit Lichtstreuung untersuchen zu können, werden sie, wenn nicht explizit anders erwähnt, mit Minisart-Filtern der Porengröße 800nm filtriert. Größere Partikel würden zu den sogenannten Teilchenzahlfluktuationen im Streuvolumen führen und damit das Meßsignal

zerstören. Außerdem sollen dadurch eventuell vorhandene Staubkörner und sonstige Verunreinigungen vermieden werden.

Die so präparierten Proben werden im DLS- und SLS-Experiment eingesetzt.

7.2.1.1 DLS-Ergebnisse

Es ist zu beobachten, daß erst in den Lösungen höherer Polyaspartatkonzentration streuende Partikel durch die DLS nachweisbar sind. Gemessen wird über viele Stunden.

In der Lösung der Konzentration 0,01% ist kein Streusignal meßbar. Ab der Konzentration von 0,1% Polyaspartat sind Streuer vorhanden, die nicht nur eine Population bilden. Im folgenden Graphen ist beispielhaft die zeitliche Entwicklung des hydrodynamischen Radius der dominierenden Population in einer Lösung mit 0,4% Polyaspartatkonzentration des Pasp18 gezeigt.

Abb. 28: Zeitabhängigkeit des hydrodynamischen Radius der dominierenden Population in der Dispersion, DLS.

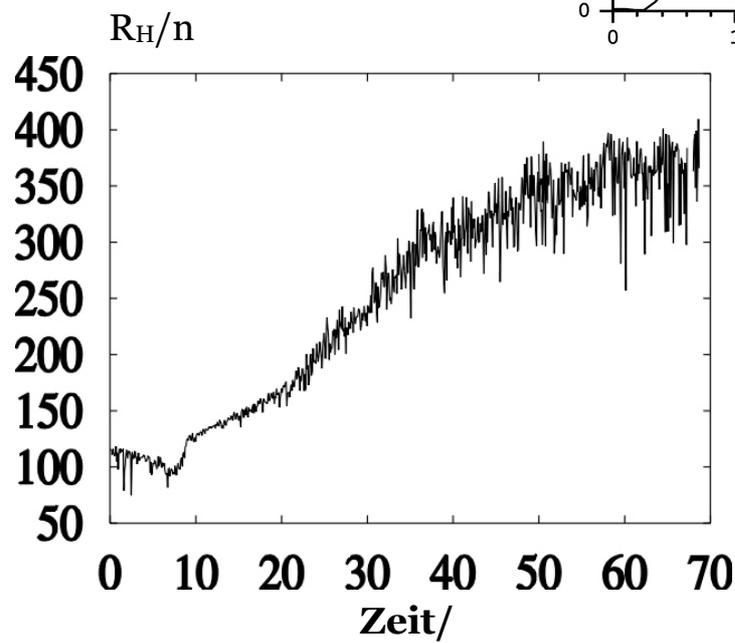
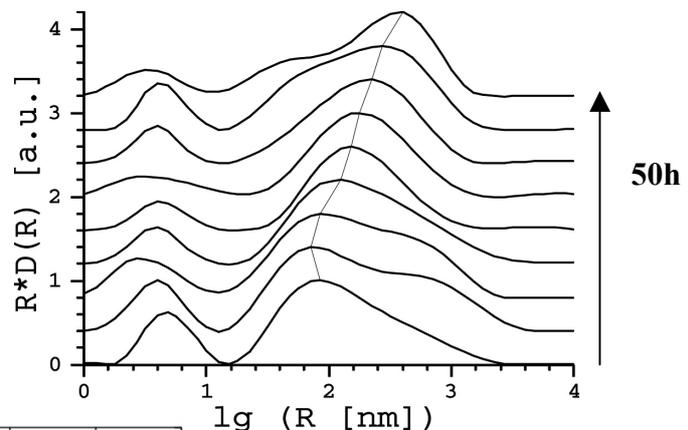


Abb. 29: Gezeigt ist der Verlauf der Position des höchsten Peaks in Abb. 28 mit anschließendem Wachstumsstop.

Wie in der Abb. 28 zu sehen ist, ist eine Population mit Radius $< 4\text{nm}$ im Laufe der Messung zu beobachten, die stabil bleibt. Eine zweite Population, die die Verteilung anfangs dominiert, bildet sich zurück zugunsten einer dritten, die letztlich die Überhand gewinnt.

Wichtige und allen streuenden Lösungen gemeinsame Merkmale im Verlauf der dargestellten Kurven sind

- eine Partikelpopulation mit konstant bleibendem hydrodynamischen Radius von 3-4nm
- Zunahme im hydrodynamischen Radius der zweiten Population
- Erreichen eines Gleichgewichtszustandes dieser, in dem kein Wachstum der Partikel mehr stattfindet
- Unterschiedliche Abschnitte in den Wachstumskurven, die unterschiedlichen Wachstumsregimen zuzuordnen sind.

Die Ergebnisse der DLS-Messungen für alle Konzentrationen von Pasp18 für die zweite Population in den Calciumphosphat-Dispersionen sind zusammengefaßt in der nächsten Tabelle zu sehen.

Pasp18-Konzentration	R_h/nm
0,01% G/V	-
0,1% G/V	210
0,5% G/V	120
1% G/V	25

Tab. 3: Abhängigkeit des hydrodynamischen Radius der zweiten Population von der Polyaspartat-Konzentration in %G/V, die dritte Population bleibt hier unberücksichtigt.

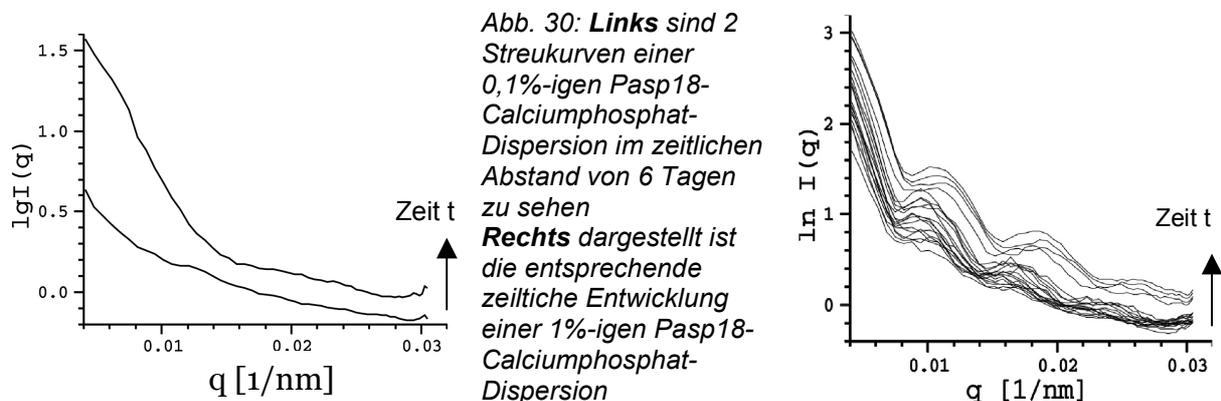
Noch einmal ist anhand der DLS-Ergebnisse der inhibierende Effekt von Polyaspartat festzustellen, der schon durch die WAXS-Ergebnisse nahegelegt wurde. Eine dritte Population bildet sich erst ab der Polyaspartat-Konzentration von 0,1%. Ihre Dynamik und die Struktur der entstehenden Partikel wird später besprochen.

Es ist wichtig, an dieser Stelle zu unterstreichen, daß die aus der Auswertung des Streusignals laut Kapitel 5.1.6 gewonnenen Radien intensitätsgewichtet sind. Das Meßsignal wird stärker von den größten Streuern beeinflusst, auch wenn ihre Anzahl nicht überwiegt. Somit gewichtet das DLS-Experiment das Verhalten der Partikel, die im Wachstum begriffen sind, was die Dynamik der Strukturausbildung verdeutlicht.

Die Frage, die an dieser Stelle entsteht, ist die, ob in dem Graphen in Abb. 29 manifestierte Wachstumsregime, die unterschiedliche Zeitskalen einnehmen, zu Strukturausbildung auf unterschiedlichen Längenskalen in den Dispersionen führen. Das bedeutet, daß nun eine Strukturanalyse auf verschiedenen Größenskalen zunächst in Lösung vorzunehmen ist. Diese wird mit SLS und SAXS durchgeführt. Die Ergebnisse aus solchen Experimenten sind später mittels bildgebender Methoden mit einer hohen Auflösung zu überprüfen.

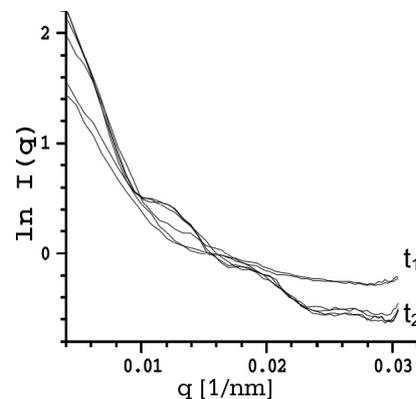
7.2.1.2 SLS- und SAXS-Messungen

Die SLS-Messungen fanden parallel zu den oben beschriebenen mit DLS statt. Die Ergebnisse aus beiden korrelieren miteinander insofern, als Strukturen mit typischen Dimensionen unter 50nm im SLS lediglich zu einer Basislinie beitragen, während größere zu einer charakteristischen Winkelabhängigkeit der Intensität führen. Eine solche Winkelabhängigkeit stellt sich in allen Lösungen mit Polyaspartat-Konzentrationen $> 0,1\%$ ein. Bei allen deutet sie auf hochgradig monodisperse Strukturen hin. Nach den Beobachtungen im DLS-Experiment variiert die Wachstumsgeschwindigkeit der Partikel aus der zweiten Population mit der Polyaspartatkonzentration. So bilden sich große, einheitliche Strukturen, die eine dritte Population darstellen, in der 1%-igen Lösung zuerst aus, während sie in der 0.1%-igen zuletzt ihren Gleichgewichtszustand erreichen. In den Abbildungen im Anschluß sind die Streukurven verschieden konzentrierter Polyaspartatlösungen nach der Fällung von Calciumphosphat zum gleichen Zeitpunkt dargestellt.



Aufgrund des Kurvenverlaufs ist die Ausbildung eines Strukturfaktors auszuschließen. Die Partikel, die hier das Signal liefern, liegen vereinzelt vor, ohne eine Wechselwirkung miteinander einzugehen. Sie sind außerdem kugelsymmetrisch, was an den ausgeprägten Minima und deren Abstand festzumachen ist⁶³. Andere Geometrien besitzen Streucharakteristika, die sich klar von den hier gezeigten unterscheiden⁶⁴. Es sei nochmals hier betont, daß bedingt durch das Experiment, eine Gewichtung der gewonnenen Information mit $(\text{Radius})^6$ der streuenden Partikel stattfindet, siehe Kapitel 5.1.6. Die hier gezeigten Streukurven spiegeln demnach die größten vorhandenen Strukturen wieder. Betrachtet man die zeitliche Entwicklung der Streukurven in einer Lösung, ist eine Zunahme der Strukturierung der Kurve auf Kosten der Basislinie ersichtlich.

Abb. 31: Die zunehmende Strukturierung der Streukurve einer 0,5%-igen Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion und gleichzeitige Abnahme in der Basislinie.



Interessant ist dabei die Tatsache, daß mit steigender Polyaspartatkonzentration die Strukturausbildung offenbar beschleunigt wird. Bisher sind aus der Literatur viele experimentellen Befunde bekannt, die darauf hindeuten, daß Polyaspartat einer der effektivsten Inhibitoren für Calciumphosphat-Wachstum sei⁶⁵. Stiege die Polymerkonzentration in der Lösung an, wäre zu erwarten, daß die mineralischen Partikel kleiner würden. Als Nukleator ist Polyaspartat ebenfalls bekannt, jedoch vergleichsweise nicht besonders effektiv. Eine Nukleierung von Calciumphosphat an Polyaspartat könnte das zeitliche Verhalten der hier untersuchten Partikel erklären, das Wachstum der großen auf Kosten der kleinen entspräche einer Ostwald-Reifung im System.

Eine andere Möglichkeit, die Ergebnisse zu begründen, wäre die Ausbildung größerer Strukturen aus Bausteinen, deren Ausdehnung unter 50nm liegt. Diese können sowohl kristallin wie auch amorph sein. An dieser Stelle sei nochmals an den Befund aus den WAXS-Messungen erinnert, der beinhaltet, daß oberhalb einer Polyaspartatkonzentration von 0,1% Kristallinität nicht mehr nachgewiesen werden kann.

Argumente für und wider beide Konzepte könnte die Auswertung der Dynamik der SLS-Ergebnisse bringen. Damit ist eine Auswertung aller Streukurven hinsichtlich geometrischer Parameter der zugrundeliegenden Strukturen in ihrer zeitlichen Entwicklung gemeint. Eine solche wurde beispielhaft für die 0,1%-ige Polyaspartatkonzentration gezeigt. Die Streukurven wurden innerhalb von 16 Tagen aufgenommen, danach stellte sich ein Gleichgewicht ein (Abb. 32).

Am besten gelingt deren Interpretation mit einem Modell monodisperser kugelsymmetrischer Streuer mit einer inhomogenen Dichteverteilung, die Gegenstand der Modellanpassung ist⁶⁶. Die Ergebnisse sind nachfolgend für repräsentative Streukurven gezeigt.

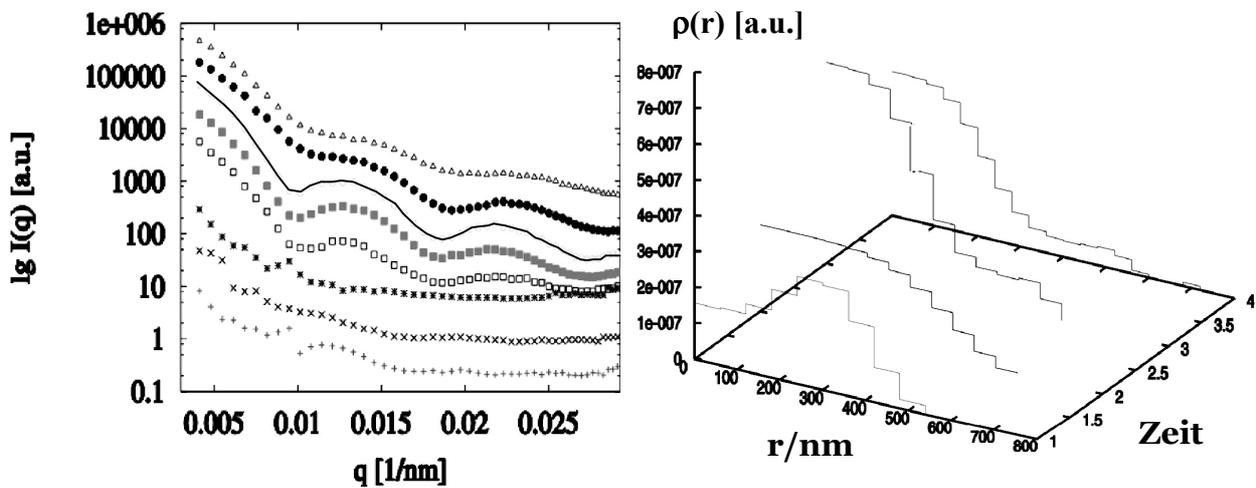


Abb. 32: SLS-Kurven (links) und radialer Dichteverlauf (rechts) für angenommene monodisperse Äquivalenzkugeln, die sich im Laufe von 16 Tagen in der 0,1%-igen Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion ausbilden.

Man beobachtet zunächst Kugeln mit niedriger Dichte im Zentrum. Ihr innerer Aufbau scheint mit der Zeit eine Umgruppierung zu durchlaufen, so daß sich letztendlich die höchste Dichte im Zentrum einstellt. Die Anpassung überzeugt dadurch, daß die aus der Abbildung ersichtlichen Kugelradien mit den aus DLS gemessenen von 600nm übereinstimmen. Ein Modell, das alternativ zur Interpretation herangezogen werden kann, ist das für eine Verteilung polydisperser aber homogener Kugeln. Es scheitert allerdings an der schlechten Anpassung der Lage der lokalen Minima in der Streukurve.

Die Modellvorstellung einer dynamischen Dichteverteilung innerhalb der einzelnen streuenden Körper mit einer Verlagerung höchster Dichte von außen nach innen ist schwer mit der Reifung kompakter kristalliner Körper vereinbar. Aus der Fällung von

Bruschi und dessen Auflösung mit EDTA wurde bereits in Kapitel 6 klar, daß das Wachstum der festen Phase im Zentrum beginnt und sich in alle Richtungen fortsetzt. Noch unwahrscheinlicher erscheint die Ausbildung kugelsymmetrischer kristalliner Festkörper. Dagegen ist bereits aus der Literatur bekannt, daß eine solche Kugelsymmetrie gepaart mit höchster Monodispersität sehr wohl für kristalline Systeme erreicht werden kann, allerdings für nanokristalline⁶⁷. Die Stabilisierung von Calciumcarbonat-Nanokristalliten wird durch Zugabe von doppelhydrophilen Blockcopolymeren während der Fällung erreicht. Die Kristallmodifikation ist Vaterit. Wird eine kritische Konzentration der stabilisierten Kristallite in der Lösung erreicht, organisieren sich diese zu regelmäßigen, monodispersen Vollkugeln mit einer Größe von 2µm. Die Kugelsymmetrie spricht für die Ausbildung einer Gleichgewichtsstruktur, die minimale Grenzflächenenergie anstrebt. Trotzdem sind die Kugeln nicht stabil in Lösung und fallen als Niederschlag aus. Werden sie aufgelöst, beginnt der Prozeß zuerst im Inneren und setzt sich nach außen hin fort. Grund dafür ist die Umkristallisation, die durch die Säurefunktion des eingebauten Polymers eingeleitet wird, und zur Umwandlung von Vaterit in Calcit führt. Diese verläuft von außen nach innen. Die höhere Löslichkeit von Vaterit in der Mitte stellt eine Parallele zur Dynamik der Auflösung von Bruschi in EDTA-Lösungen dar.

Die Dynamik der Strukturausbildung, die in Abb. 32 zu sehen ist, ist ebenfalls konsistent mit der Vorstellung, daß kleinere Bausteine aufeinander treffen, um zu größeren Gebilden zusammengefügt zu werden. Wenn diese Bausteine frei in der Lösung diffundieren, ihr Zusammentreffen also nicht durch spezifische Wechselwirkungen gesteuert ist^f, ist die Ausbildung inhomogener Strukturen wesentlich wahrscheinlicher als die Entstehung niederenergetischer und höchstgeordneter. Die Analogie zur Bildung von fraktalen Strukturen durch diffusionskontrollierte Aggregation von Kolloiden liegt auf der Hand⁶⁸. Eine sphärische Gestalt garantiert minimale Grenzflächenenergie und damit maximale Stabilität im Lösungsmittel. Die Dynamik dieses Systems beruht entweder darauf, daß die einzelnen Bausteine gegeneinander verschiebbar sind und so umgeordnet werden können, oder daß ihr Gefüge durchlässig ist für Moleküle und Ionen, die den Innenraum niedriger Dichte allmählich ausfüllen.

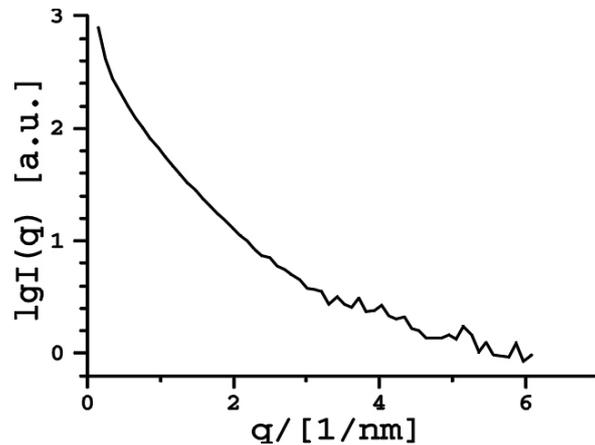
Entfernt man sich von der Vorstellung von Überstrukturen aus kleineren Bestandteilen, ist es ebenso denkbar, daß die kugelsymmetrischen Streuer aus Polymer und amorphem Calciumphosphat bestehen, ohne eine Strukturierung auf

^f Solche Wechselwirkungen hätten die Ausbildung eines Strukturfaktors zur Folge.

kleineren Skalen aufzuweisen. Ergebnisse der DLS-Messungen favorisieren keinen dieser möglichen Prozesse, da das mit DLS beobachtete Wachstum der Partikel sowohl auf Reifung der größeren auf Kosten der kleineren wie auf Aggregation der kleinen beruhen kann. Die hier aufgeführten Experimente können keinen der beiden Mechanismen ausschließen.

Von großer Wichtigkeit werden in diesem Zusammenhang die Informationen sein, die über den inneren Aufbau der sphärischen Strukturen mittels SAXS auf Längenskalen unter 50nm zu gewinnen sind. Beispielhaft sind nun die Ergebnisse der Messungen an der 1%-igen Polyaspartat-Lösung dargelegt. Die bereits mit Lichtstreuung untersuchte und in keiner Weise weiter behandelte Dispersion zeigt in SAXS einen charakteristischen Streukurvenverlauf, der auf zweidimensional ausgedehnte Strukturen hindeutet (siehe $I(q)$ für $q \rightarrow 0$).

Abb. 33: $I(q)$ -Abhängigkeit gemessen für die 1%-ige Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion mit SAXS.



Anhand der Paarkorrelationsfunktion $p(r)$ gelingt die Interpretation der $I(q)$ -Abhängigkeit am besten mit einem Modell für Lamellen inhomogener Dichte, die in zwei Dimensionen eine Ausdehnung $> 40\text{nm}$ besitzen. Die Entfaltung der $p(r)$ führt zu einer Dichteverteilung in der dritten Dimension, die in Abhängigkeit vom Abstand r vom Mittelpunkt nachfolgend dargestellt ist.

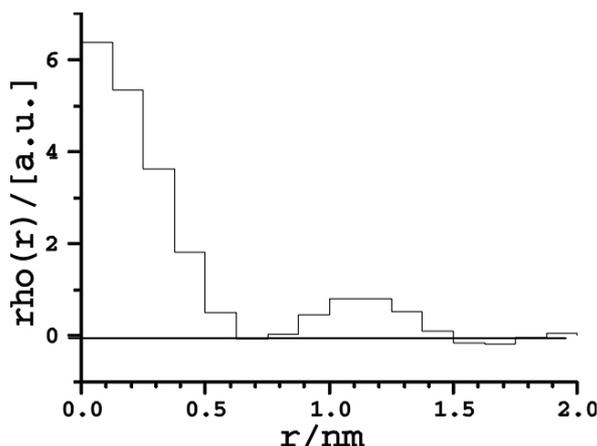
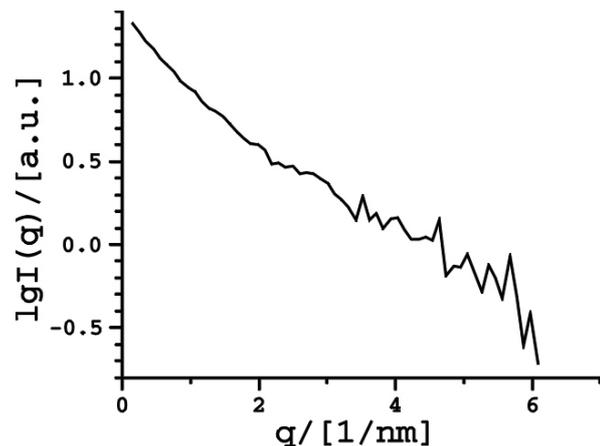


Abb. 34: Dichteverlauf einer Lamelle in z -Richtung zur Meßkurve aus Abb.33.

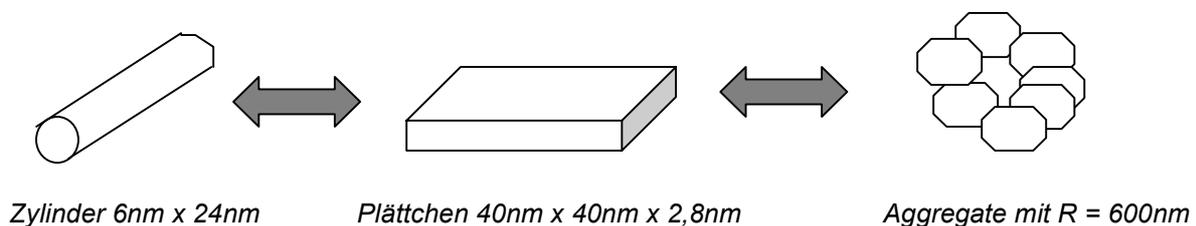
Die Lamelle weist eine 1,2nm-dicke Schicht sehr hoher Dichte auf, die von beiden Seiten mit je einer 0,8nm-dicken Schicht relativ niedriger Dichte belegt ist. Dieselbe Dispersion wird nun durch 200nm-Poren filtriert und wieder in der SAXS gemessen. Die Streukurve, hier zu sehen,

Abb. 35: Streukurve der filtrierten Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion aus der SAXS-Messung.



kann im Sinne elongierter Strukturen wesentlich kleinerer Ausdehnung interpretiert werden. Die $p(r)$ -Funktion spiegelt die Geometrie von Zylindern mit einem Durchmesser von 6nm und einer Länge von 24nm wider. Für diese Zylindergeometrie lässt sich ein entsprechender hydrodynamischer Radius von 11nm berechnen, der qualitativ mit dem mittels DLS erhaltenen von 25nm übereinstimmt.

Die untersuchten Dispersionen erscheinen aus dem Blickwinkel der Streumethoden auf drei unterschiedlichen Längenskalen sehr wohl strukturiert und dies verschiedenartig.



Um die Rolle der Kettenlänge des Polymers zu klären, ist eine Strukturanalyse an Calciumphosphat-Dispersionen durchzuführen, die in Lösungen eines kürzerkettigen Polyaspartats gleicher G/V-Konzentration hergestellt werden. Auf diese Weise bleibt das Verhältnis der Anzahl von Carboxylgruppen im Polymer zu Ca^{2+} -Ionen in Lösung unverändert zu den Pasp18-Lösungen, jedoch verdoppelt sich die absolute Anzahl der Polyaspartat-Moleküle in der Lösung.

7.3 Ergebnisse für Pasp10 aus Streuexperimenten

In Kürze sollen hier zum Vergleich die wesentlichen Ergebnisse aus Streuexperimenten an Dispersionen vorgestellt werden, die in Lösungen des Polyaspartat mit Molekulargewicht 10000g/mol erzeugt wurden. Alle wäßrigen Lösungen weisen vor der Fällung von Calciumphosphat einen pH-Wert von $6,9 \pm 0,1$ auf. Sie wurden nach der Fällung zur Untersuchung mit Lichtstreuung mit 800nm-Poren filtriert. Die 1%-ige Lösung wird als Beispiel angeführt.

DLS-Messungen, gestartet sofort nach der Filtration der Dispersion, zeigen die Präsenz von zwei Populationen von Anfang an. Diese ändern kaum ihre Radien im Laufe der Zeit. Die Werte für R_H betragen 4nm bzw. 120nm.

Im SAXS-Experiment zeigt sich eine $I(q)$ -Abhängigkeit, die deckungsgleich mit der in Abb.33 für die Pasp18-Probe bestimmte ist. Erneut ist das Modell einer Lamelle zur Interpretation der Daten sinnvoll, welches den in Abb. 36 gezeigten Dichteverlauf in der dritten Dimension liefert. Ein Vergleich mit dem Dichteverlauf für die Pasp18-Probe aus Abb. 34 zeigt, daß der innere Aufbau der Lamellen sich annähernd gleich. In der Pasp10-Probe hat die mittlere Schicht hoher Dichte die größere Ausdehnung von 2nm, belegt von je einer Schicht fast verschwindender Elektronendichte der Dicke 1nm.

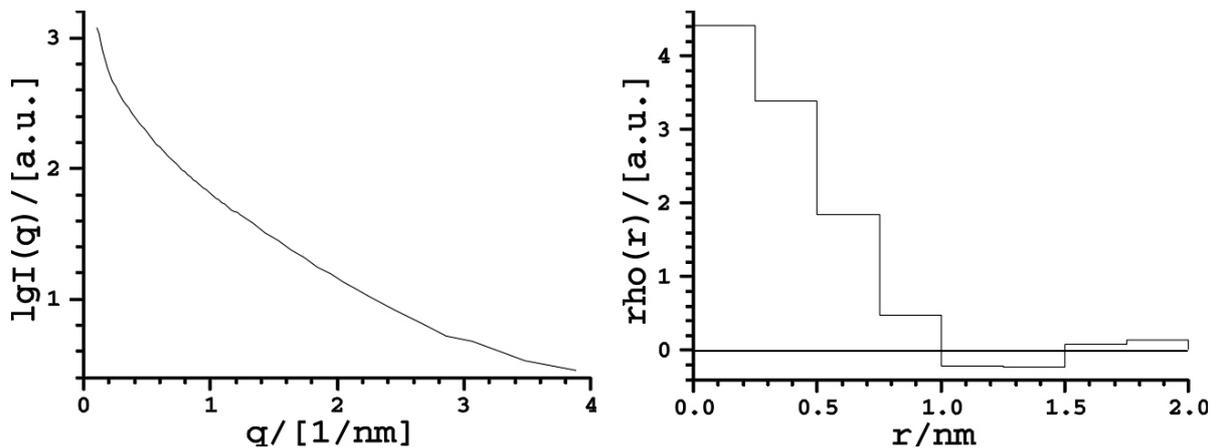


Abb. 36: SAXS-Streukurve der 1%-igen Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion und Dichteverlauf einer Lamelle in z-Richtung als Modellanpassung.

Nun wird die Pasp10-Probe wie die Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion zuvor mit 200nm-Poren filtriert und erneut mit SAXS vermessen. Die Streukurve ist wieder im Vergleich mit der für Pasp18 gemessenen links gezeigt und beide $\rho(r)$ -Funktionen rechts.

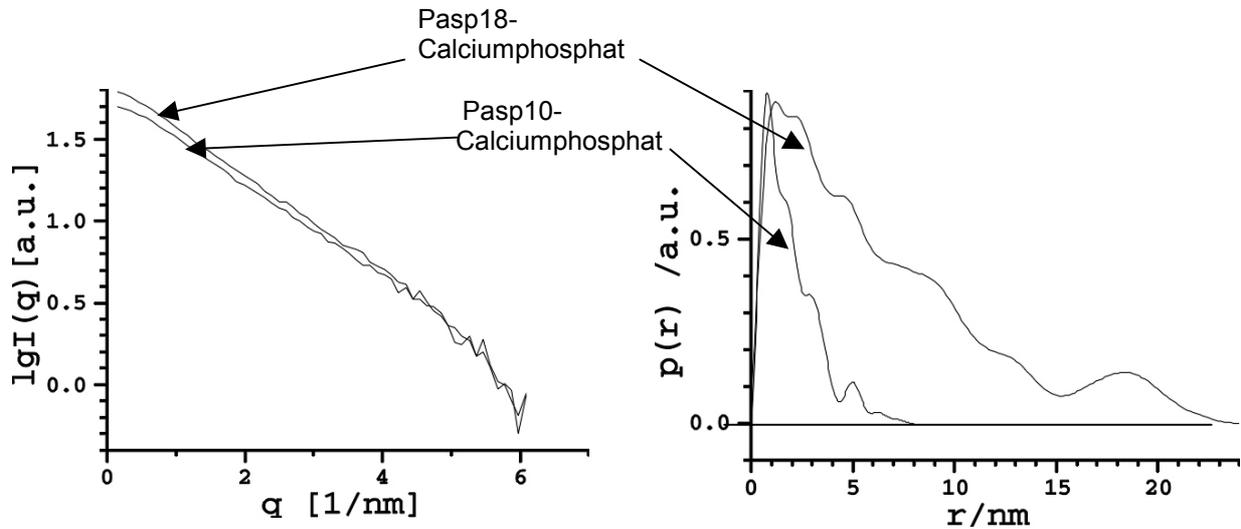
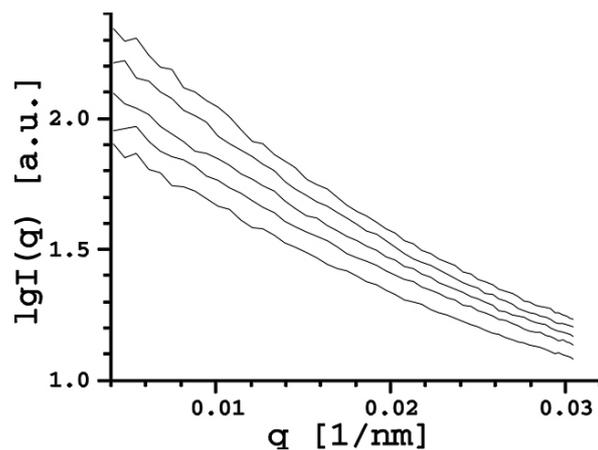


Abb. 37: SAXS-Streukurven der beiden filtrierten Pasp-Calciumphosphat-Dispersionen (links) und die dazugehörigen $p(r)$ -Funktionen (rechts).

Die Symmetrie der enthaltenen Strukturen verändert sich durch die Variation im Molekulargewicht des Polymers nicht, sie bleibt zylindrisch. Allerdings erscheinen die charakteristischen Dimensionen für den Durchmesser, und die Länge des Zylinders in der Pasp10-Probe skaliert mit dem Faktor $1/3$. Für den Durchmesser ergibt sich der Wert von 2nm und für die Länge der von 8nm. Für einen solchen Zylinder ergäbe sich ein hydrodynamischer Radius von 3,5nm, der wie oben erwähnt, schon mit DLS für die erste Population bestimmt wurde.

Ob eine Strukturierung in der Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion auf einer Längenskala $>50\text{nm}$ vorhanden ist, wird schließlich mit Hilfe der SLS überprüft. Es wird eine Zunahme in der Streuintensität mit der Zeit beobachtet, es sind aber keine Charakteristika in ihrem Verlauf zu sehen, die auf einheitliche Strukturen deuten.

Abb. 37A: SLS-Streukurve an der 1%-igen Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion



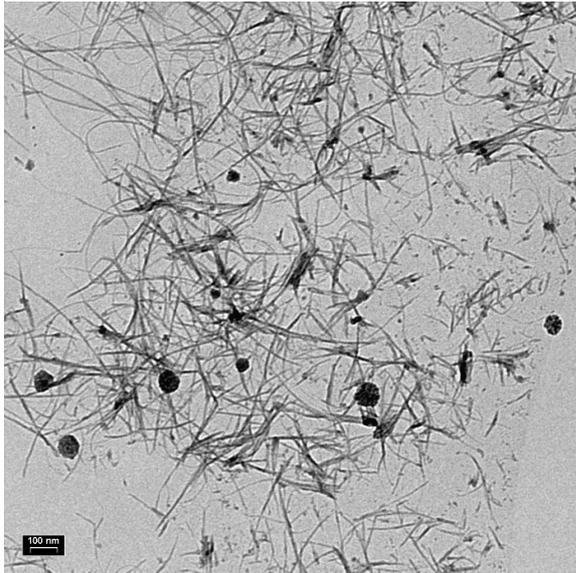
Dies kann einerseits darin begründet sein, daß vorhandene Strukturen polydispers sind, was zu einer Verschmierung der spezifischen Streukurve führt, so daß keine Informationen über die Geometrie der streuenden Partikel mehr gewonnen werden kann. Andererseits können vorhandene Geometrien so kleine Ausdehnung haben, daß sie sich in dem hier zur Verfügung stehenden q -Bereich nicht mehr manifestieren. Das Anwachsen der absoluten Streuintensität spricht in diesem Fall für eine Zunahme im Molekulargewicht der Streuer. Es kann aber keine Auswertung im Sinne von Kapitel 5.1.3 vorgenommen werden, da die Konzentration der Partikel, die sich auch im Laufe des Streuexperimentes bilden, nicht bekannt ist. Anhand der Messung ist mit Sicherheit auszuschließen, daß etwa monodisperse sphärische Aggregate von der Dimension der für die Pasp18-Lösung bestimmten entstanden seien.

Alle diese Ergebnisse aus den Streuexperimenten müssen mit mindestens einer anderen analytischen Methode überprüft werden. Im nächsten Kapitel sind Aufnahmen der Proben zusammengestellt, die mit TEM und AFM gemacht wurden.

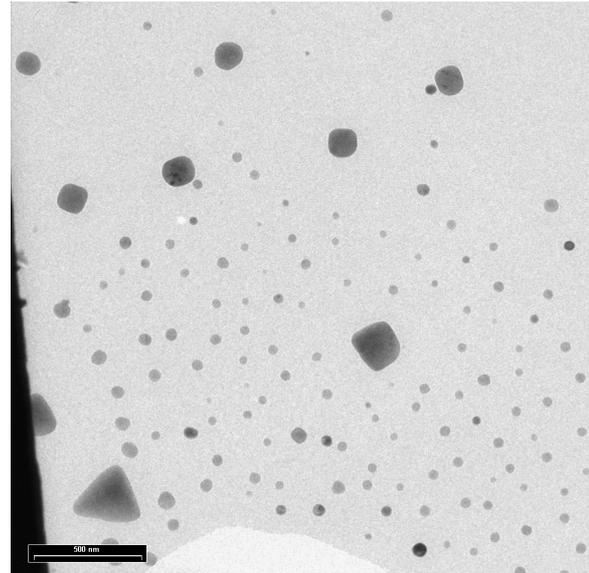
7.4 Abbildungen von Polyaspartat-Calciumphosphat-Dispersionen

Die Auflösung, die Streumethoden wie SAXS haben, ist bei abbildenden Methoden nur dann zu erreichen, wenn die interessierende Probe auf einer Unterlage eingetrocknet vorliegt. AFM-Bilder in Lösung konnten von den Polyaspartat-Calciumphosphat-Dispersionen nicht erstellt werden. Dagegen lassen sich diese an Luft sehr gut abbilden. Neben der hohen Auflösung hat AFM den Vorzug, das Objekt der Messung nicht zu zerstören. Dagegen wechselwirkt der Elektronenstrahl im TEM sehr stark mit der Probe. Die hier abgebildeten Partikel geringen Kontrasts sind oftmals instabil unter dem Elektronenbeschuß und lösen sich auf. Damit wird leider auch eine Analyse des Elektronenbeugungsmusters dieser Partikel unmöglich, die Aufschluß über eventuell vorhandene Kristallinität und ihre Beschaffenheit geben könnte.

Das folgende TEM-Bild zeigt einen repräsentativen Ausschnitt aus der Probe Pasp10-Calciumphosphat, die auch mit Streumethoden untersucht wurde.



Meßbalken = 100nm.



Meßbalken = 500nm.

Abb. 38: TEM-Bilder repräsentativer Strukturen in den Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion.

Es sind sowohl die zylindrischen wie auch die plättchenartigen Strukturen, vermutet schon aus SAXS, wiederzuerkennen. Dabei fällt auf, daß die Lamellen sehr oft geometrische Form aufweisen, die von der einer Kugel stark abweicht. Es sind keine größeren Aggregate oder Partikel zu finden. Um feine Strukturen besser auflösen zu können, wurde auch AFM eingesetzt, dessen Ergebnis im Höhen- und Amplitudenbild zu sehen ist. Zunächst ist ein Überblick über einen größeren Ausschnitt gezeigt, in dem die bereits aus TEM bekannten geometrischen Partikel zu erkennen sind.

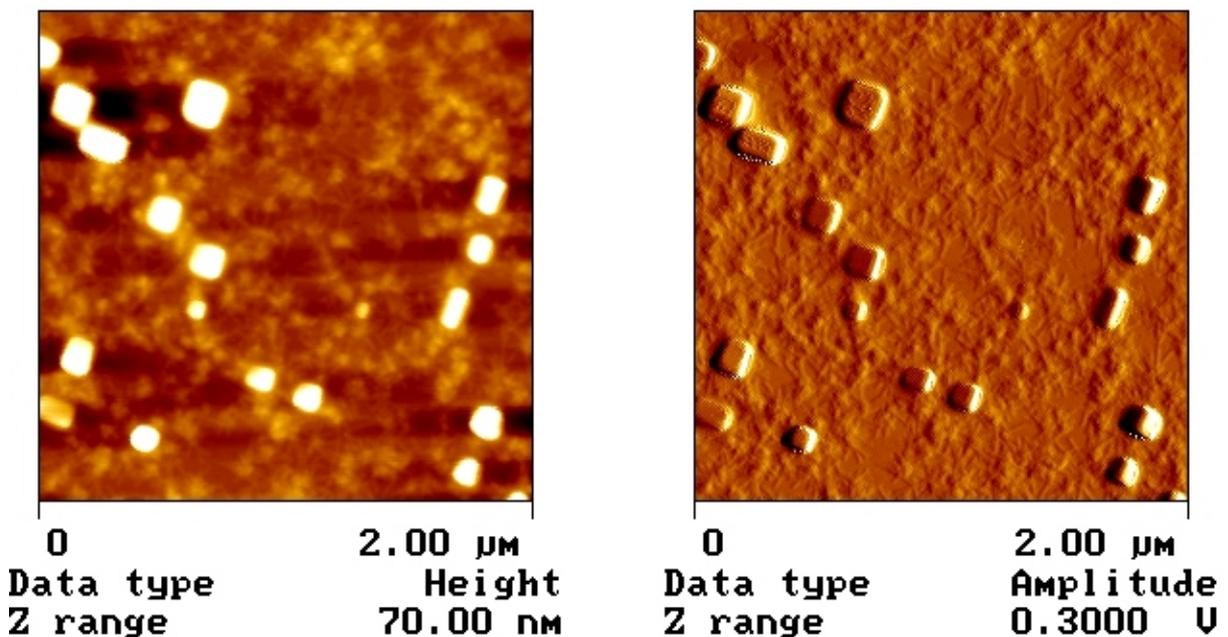


Abb. 39: Höhen- und Amplitudenbild aus der AFM-Messung der Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion.

Ein Zoom ermöglicht das Auflösen der Feinstrukturen im gewählten Ausschnitt. Jetzt sind auch kleine zylindrische Partikel, mit Pfeilen versehen, überall neben den größeren Vierecken auszumachen.

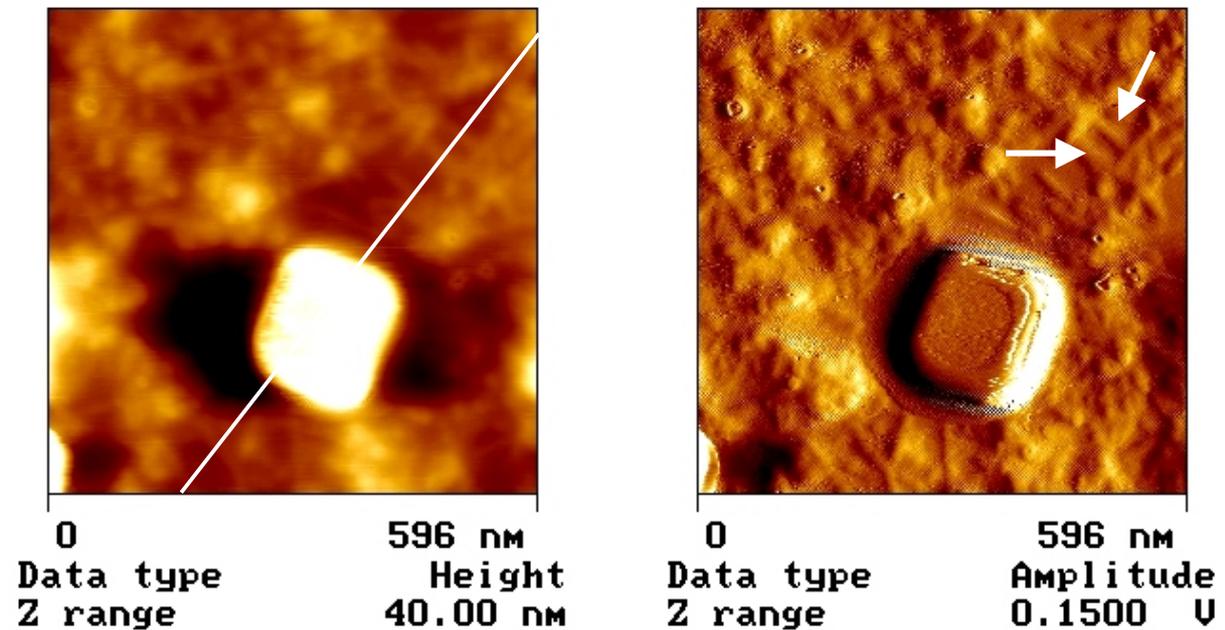


Abb. 40: Vergrößerung des Abschnittes, der in Abb. 39 zu sehen ist, mit Achse für das Höhenprofil.

Eine mögliche Auswertung des Höhenbildes besteht darin, das Höhenprofil entlang einer gewünschten Achse zu erstellen. Diese ist im Höhenbild der Abb. 40 eingetragen. Das Höhenprofil ist in der nächsten Abbildung gezeigt.

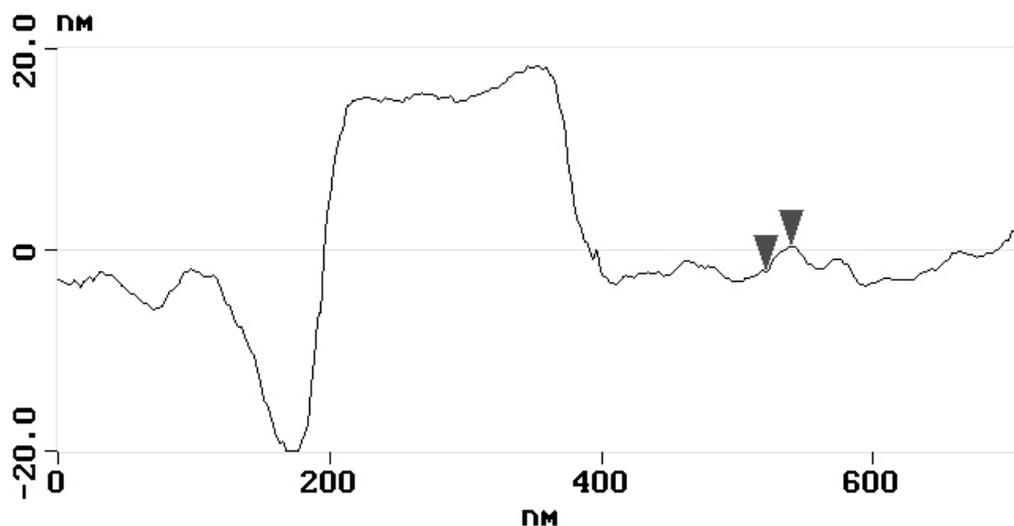


Abb. 41: Höhenprofil der Partikel aus Abb. 40. Die Pfeile grenzen die Dimensionen der mit Pfeilen in Abb. 40 gekennzeichneten Zylinder ein und zeigen eine Höhe von 2nm an.

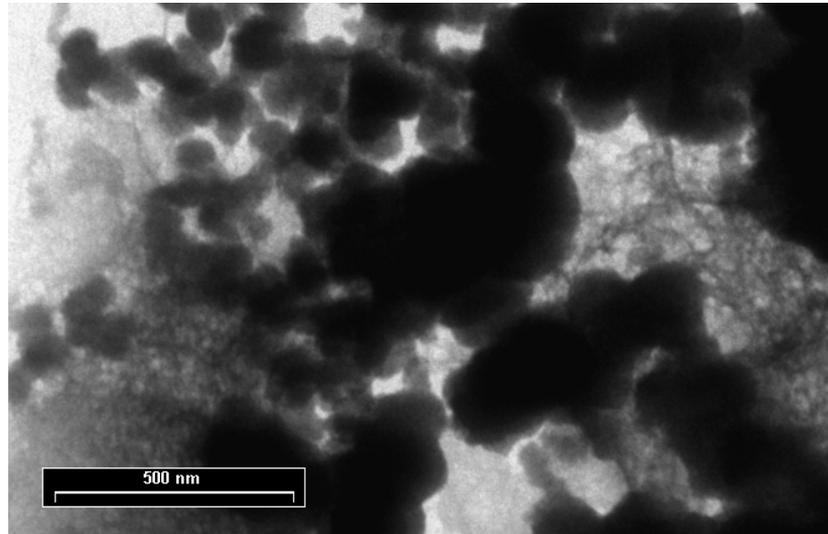
Die Vierecke weisen eine Höhe von ca. 25nm auf. Bei einigen sind Stufen in ihrem Höhenverlauf zu entdecken. Der Vergleich mit den SAXS-Messungen legt nahe, daß

sie 5-6 gestapelte Lamellen darstellen. Die kleinen Zylinder haben eine Höhe von ca. 2nm und entsprechen damit den Befunden aus den SAXS-Messungen.

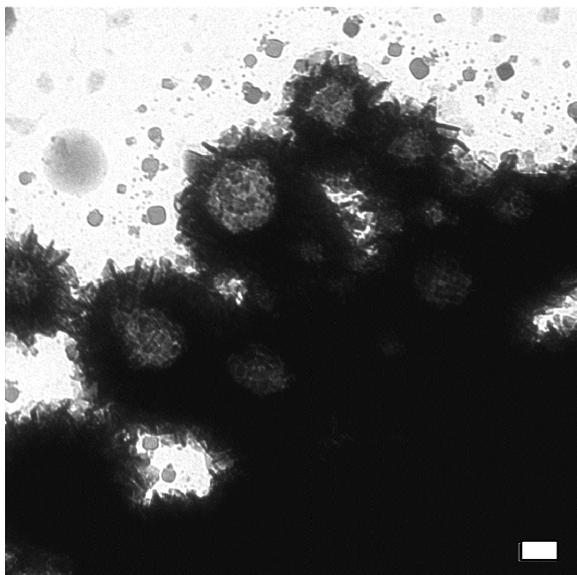
Der Vergleich mit TEM-Bildern an der Pasp18-Calciumphosphat-Probe zeigt, daß sowohl die Partikel mit Ausdehnung 100-200nm wie auch lange, zylindrische Gebilde die Probe dominieren.

Abb. 42: TEM-Bild der 0,1%-igen Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion.

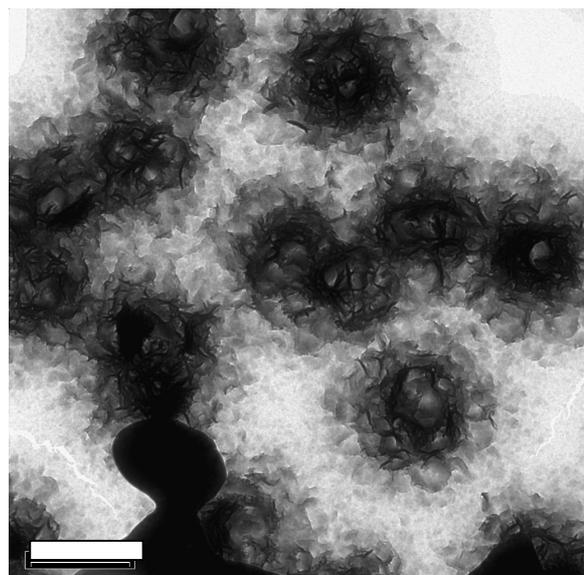
Meßbalken = 500nm



Allerdings liegen diese immer aggregiert vor, unabhängig davon, welcher Ausschnitt zur Abbildung gewählt wird. Das folgende Bild zeigt die aus der SLS bereits bekannten 1000-1200nm-großen sphärischen Aggregate, die aus kleinen, blattförmigen Bausteinen bestehen. Es sind erwartungsgemäß anfangs Kugeln mit geringerer Dichte im Zentrum, später ausgefüllte sichtbar.



Meßbalken = 100nm



Meßbalken = 1000nm

Abb. 43: TEM-Aufnahmen von Aggregaten bestehend aus plättchenartigen Partikeln. Im Bild links haben sie eine niedrigere Dichte im Zentrum. Im Bild rechts ist diese am höchsten.

So entsteht ein konsistentes Bild vom Aufbau der untersuchten Dispersionen, das sowohl von Streu- wie auch von Abbildungsverfahren getragen wird. Die Streuexperimente liefern Informationen aus dem ganzen Streuvolumen und vernachlässigen damit lokale Inhomogenitäten. Solche können bei der Eintrocknung der Probe für abbildende Experimente zustandekommen. TEM und AFM zeigen nur kleine Ausschnitte, diese aber mit enorm hoher Auflösung als direktes Abbild des Objektes. Die Synergie aus beiden Verfahrensweisen ergibt eine komplexe Charakterisierung der Probe. Das so entwickelte Bild von System Polyaspartat-Calciumphosphat wird an dieser Stelle erst einmal zusammengefaßt.

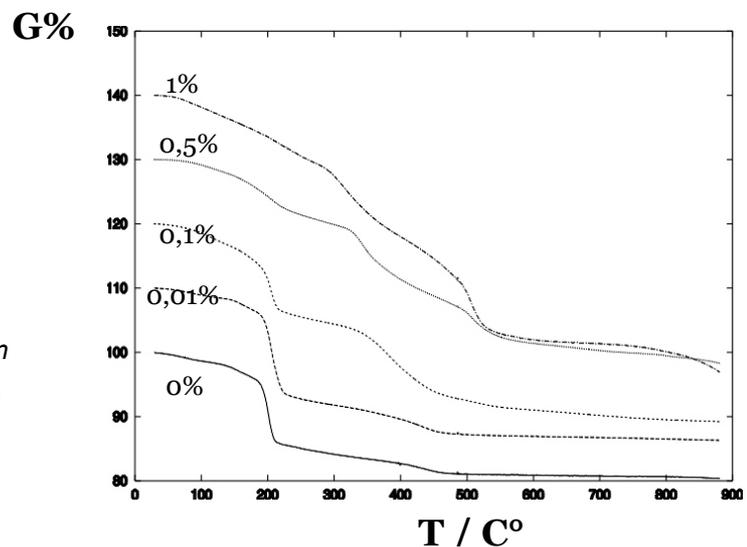
7.5 Zusammenfassung der bisherigen Experimente an Dispersionen und Deduktionen

Aus den bisher erzielten Ergebnissen geht hervor, daß sowohl die Konzentration als auch das Molekulargewicht des Polyaspartatzusatzes einen Einfluß auf die Struktur und die Dynamik der Calciumphosphat-Dispersionen haben. Mit steigender Konzentration des Polymers wird die Ausbildung der diskutierten Strukturen beschleunigt, sie ändern sich aber ihrem Wesen nach nicht. Dagegen scheint das Molekulargewicht des Polyaspartats eine entscheidende Rolle in der Strukturbildung zu spielen. Bei gleichbleibendem Verhältnis der Anzahl von Calciumionen zu Carboxylgruppen, aber einer fast Verdopplung der Kettenlänge des Polymers werden die zylindrischen Körper in ihrer Ausdehnung um einen Faktor 3 vergrößert. Die Lamellen erfahren eine im Rahmen der Meßgenauigkeit nur geringe Veränderung ihrer Dicke, sie werden aber zu sphärischen Überstrukturen „verklebt“ und diese Organisation besitzt eine charakteristische Dynamik. Vergegenwärtigt man sich nochmals den genauen Verlauf der Fällung von Calciumphosphat im *Doppel-Jet*-Experiment, ist im Hinblick auf die Kinetik der stattfindenden Prozesse folgendes festzuhalten. Nur im *Doppel-Jet*-Experiment ist die homogene spontane Nukleierung kleinster Kristallite zu gewährleisten². Damit ist eine kontinuierliche Absättigung der Polyaspartatmoleküle mit Calciumphosphat-Kristalliten zu erwarten, die dann schließlich zu Nukleation führt. Allerdings ist die Säureaktivität der COOH-Gruppe ein wichtiger Parameter, wie aus den AFM-Experimenten in Kapitel 6.2 hervorgeht. Es ist erstrebenswert, die Säurefunktionen von Polyaspartat vor der Mineralisation

zunächst mit Ca^{2+} -Ionen abzusättigen, um dann den Einfluß des Polymers auf die Kristallisation von Calciumphosphat zu untersuchen.

Eine Reihe von Pasp18-Calciumphosphat-Dispersionen, die im Doppel-Jet-Reaktor hergestellt wurden und sich nur in der Polymerkonzentration unterscheiden, wurden abzentrifugiert, eingetrocknet und einer thermogravimetrischen Analyse (TGA mit einem Meßgerät der Firma NETZSCH, Selb) unterzogen. Die folgende Abbildung zeigt die gemessene relative Gewichtsabnahme der Probe in % in Abhängigkeit von der Temperatur $T/^\circ\text{C}$ für verschiedenen Polyaspartat-Konzentrationen, die im Reaktionsgefäß vorgelegt wurden.

Abb. 44: Die TGA-Kurven zeigen den Temperaturverlauf des relativen Gewichtsverlustes G% in den Dispersionen für verschiedene Pasp18-Konzentrationen in den Calciumphosphat-Dispersionen



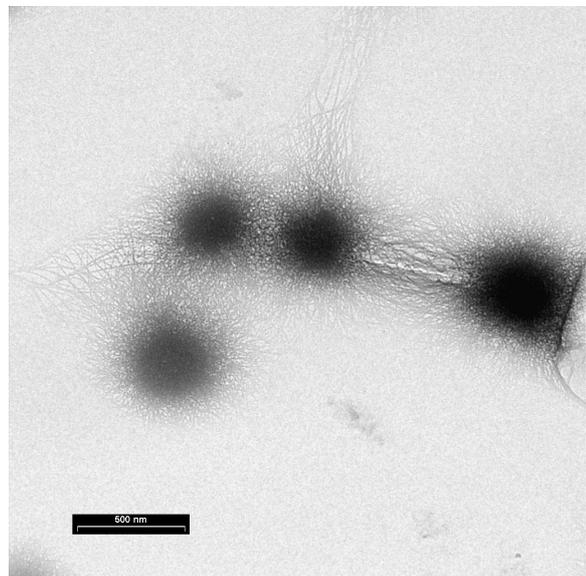
Unter der Annahme, daß keine Ca^{2+} - und HPO_4^{2-} -Ionen nach Ablauf der Fällungsreaktion frei in Lösung vorliegen, kann berechnet werden, wieviel von dem vorgelegten Polyaspartat in die dispergierten Partikel eingebaut worden ist. Für die 0,1%-ige Probe ergibt sich, daß die gesamte Masse des vorgelegten Polymers in die dispergierten Kolloide eingebaut wurde. Unter dieser Voraussetzung kann nun ein sogenanntes *Triple-Jet*-Experiment durchgeführt werden, in dem einer 0,1%-igen Pasp18-Lösung Calcium- und Phosphationen unveränderter Konzentration im Laufe einer Stunde zugeführt werden, und gleichzeitig genauso viel Polymer nachgeliefert wie in die entstehenden Partikel eingebaut wird. So ist zu jedem Zeitpunkt der Reaktion die gleiche Konzentration an unkomplexiertem Polyaspartat gegeben. Die Ergebnisse sind überraschend, wie nachfolgend gezeigt wird.

7. 6 Das *Triple-Jet-Experiment*

Das oben geschilderte Fällungsexperiment führt zur Formung eines hellen Niederschlags, während der Überstand klar bleibt und hochviskos erscheint. Beide werden analysiert.

Der Niederschlag wird verdünnt und auf TEM-Grids präpariert. Die Aufnahme zeigt einheitlich ausgebildete Strukturen, die die Probe prägen.

Abb. 45: Die TEM-Aufnahme zeigt Aggregate aus fadenartigen Strukturen, wie sie schon aus Abb. 38 bekannt sind.



Meßbalken = 500nm

Die erste Frage, die zu stellen ist, betrifft die Zusammensetzung der fadenartigen Gebilde, die zu Knäueln aggregieren. Der Versuch, anhand der Elektronenbeugung eine Kristallinität nachzuweisen, scheitert am geringen Kontrast der Fäden und ihrer Instabilität im Elektronenstrahl. Eine WAXS-Analyse an der abzentrifugierten und bei 50°C getrockneten Probe liefert folgendes Refraktogramm.

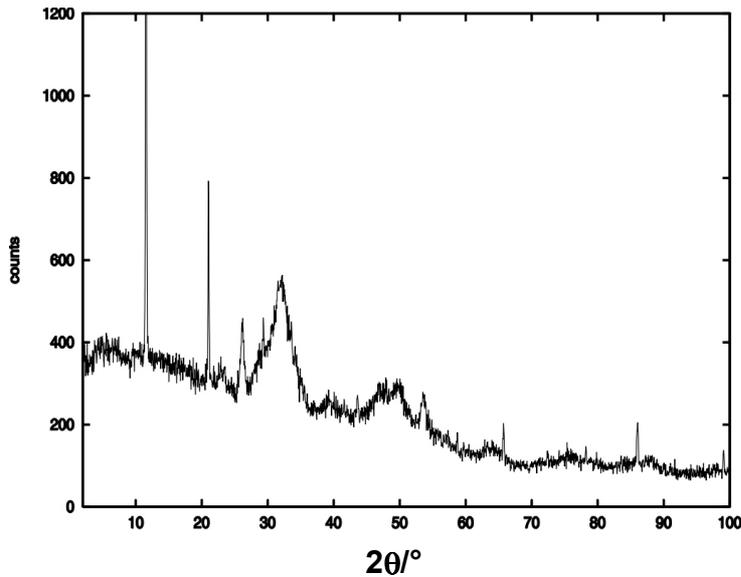
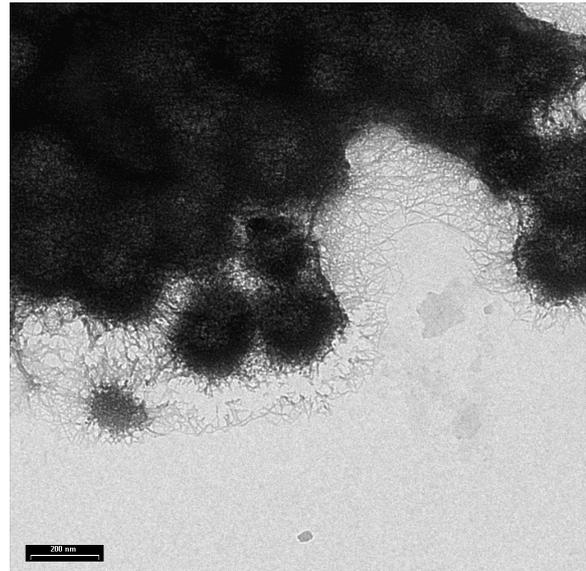


Abb. 46: WAXS-Refraktogramm der Probe aus Abb. 45.

Die beiden ersten Peaks sind aus der Bruschitphase bereits bekannt, ab dem dritten zeichnet sich eine Hydroxyapatitphase ab. Der dritte Peak kann dem (002)-Reflex von Hydroxyapatit zugeordnet werden, was mit einem bevorzugten Wachstum entlang der z-Symmetrieachse korreliert. Er ist verbreitert und weist damit auf eine geringe Ausdehnung der Kristallordnung hin. Die Information, die in diesem Refraktogramm enthalten ist, reicht jedoch nicht aus, um mit Sicherheit sagen zu können, daß eine Hydroxyapatitphase in der Probe vorhanden sei. Die geringe Gesamtzahl der Peaks kann auch daher rühren, daß die im TEM-Bild sichtbaren Strukturen lediglich in einer Dimension große Ausdehnung haben und deshalb nicht alle für einen dreidimensional unendlich ausgedehnten Festkörper zu erwartenden charakteristischen Reflexe zeigen. Mit $P6_3$ besitzt Hydroxyapatit allerdings eine Kristallgitter-Symmetrie, die sich makroskopisch sehr wohl in der Ausbildung von langen Nadeln manifestiert.

Altert die Dispersion nur wenige Stunden, bilden sich, wie in der nächsten TEM-Aufnahme zu sehen ist, die Fäden zurück, und die Knäuel werden kompakter.

Abb. 47: Rückbildung der dünnen Strukturen zu kompakten, aufgenommen im TEM

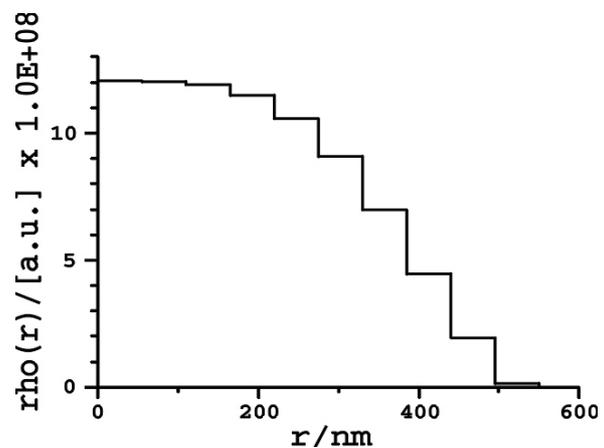


Meßbalken = 200nm

Es ist leicht einzusehen, daß fadenartige Strukturen eine enorm große Oberfläche aufweisen, die es zu stabilisieren gilt. Kompakte Strukturen sind energetisch wesentlich günstiger.

Der mit 800nm-Poren filtrierte Überstand wurde mit DLS und SLS untersucht. Beide Methoden zeigen die langsame Ausbildung von Partikeln mit einem Radius von ca. 300nm. Sie können als relativ monodispers und sphärisch mit folgender zeitlich konstanter Dichteverteilung des einzelnen interpretiert werden.

Abb. 48: Der Dichteverlauf unter Annahme von monodispersen Partikeln mit Kugelsymmetrie, bestimmt aus SLS-Messungen an der Probe aus dem Triple-Jet-Experiment.



In der TEM-Aufnahme in Abb. 47 sind Netzwerke aus den bekannten Fäden zu sehen, die die Probe dominieren. Solche Gebilde sind für Calciumphosphat-Systeme

bisher nur einmal, allerdings unter Zusatz von Blockcopolymeren in der Literatur beschrieben worden⁶⁹. Es handelt sich um die Templatierung von Calciumphosphat mittels Mizellen, die von PEO-b-PMAA-C₁₂-Blockcopolymeren gebildet werden. Die Kontrolle über die Bildungskinetik der anorganischen Komponente scheint durch den pH-Wert der Lösung vonstatten zu gehen. Bei einem pH-Wert unter 4,5 wandeln sich die Fäden, die sternförmig angeordnet sind, innerhalb von Stunden zu kompakten Polymer-Bruschat-Kompositen um. Bei höherem pH-Wert weisen sie geringere Dicke und größere Länge auf und bleiben über Wochen stabil. Es existieren Hinweise darauf, daß die mineralische Phase Hydroxyapatit sei, das konnte aber nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Auf die Relevanz dieser Befunde wird noch ausführlich in der Diskussion aller Ergebnisse eingegangen.

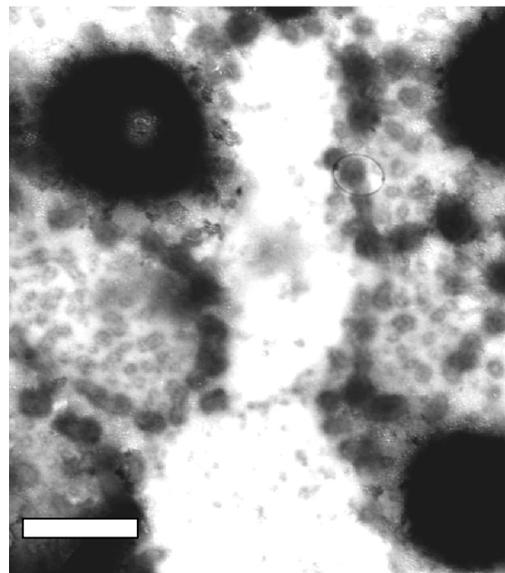
Ein nächster Schritt hin zur umfassenderen Charakterisierung dieses hochdynamischen Polyaspartat-Calciumphosphat-Systems besteht darin, durch Ca²⁺ induzierte Strukturen in wäßrigen Polyaspartat-Lösungen zu untersuchen.

8 Die Polyaspartat-Calcium-Systeme

Unter gleichen Bedingungen wie in allen Doppel-Jet-Experimenten bisher, wird zu einer 1%-igen Pasp18-Lösung CaCl₂ zugegeben. Das Polymer flockt in Form eines weißen Niederschlages aus. Der Überstand wird filtriert und mit DLS und SLS untersucht. Es zeigt sich die Bildung kugelförmiger Strukturen mit einem Radius von 300nm. TEM-Aufnahmen von den eingetrockneten Lösungen werden hier in Abb. 49 gezeigt.

Abb. 49: TEM-Aufnahmen von Pasp18-Calciumchlorid-Dispersionen.

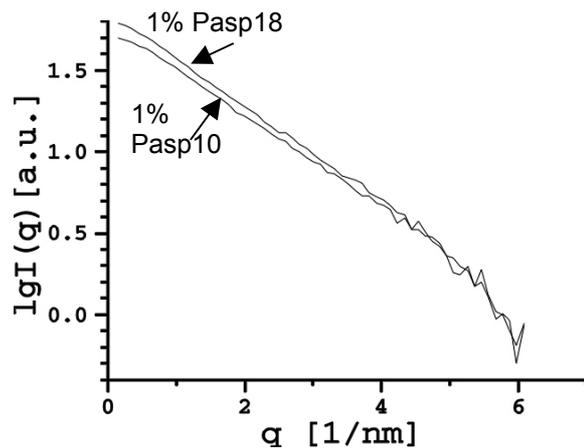
Meßbalken = 500nm



Die Kugeln mit niedriger Dichte in ihrem Zentrum sowie die ausgefüllten erinnern in ihrer Größe und Dichteverteilung an die aus den Pasp18-Calciumphosphat-Dispersionen bekannten. Jedoch ist in keiner der vielen ausgewerteten Aufnahmen eine Strukturierung der Kugeln auf kleinerer Skala zu entdecken. Ihre Erscheinung erinnert an die vernetzter Polymere.

Zum Vergleich wird eine SAXS-Untersuchung von Lösungen des Pasp18 und Pasp10 in Wasser herangezogen. Die SAXS-Streukurven sind hier zu sehen.

Abb. 50: SAXS-Streukurven wäßriger Lösungen von Polyaspartat mit beiden Molekulargewichten



Der aus der Streukurve gewonnene $p(r)$ -Verlauf läßt auf eine Zylindersymmetrie der Partikel schließen, wie sie schon im Kapitel 7.3 aus den Messungen der filtrierten Dispersionen für beide Polymere festgestellt wurde. Die Zylinder haben hier einen Durchmesser von 1,6nm und eine Länge von 6nm. Mittels TEM konnte dieser Befund aufgrund des niedrigen Kontrasts nicht bestätigt werden.

Mit diesem Schritt sollen die experimentellen Untersuchungen an den Polyaspartat-Systemen abgeschlossen und der Versuch unternommen werden, ein konsistentes Bild ihres Verhaltens zu zeichnen. Dies geschieht im Wissen, daß dieses Bild unvollständig und deshalb noch wandlungsfähig ist.

9 Zusammenfassung zu den Polyaspartat-Systemen

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Charakteristika von Polyaspartat-Calciumphosphat-Dispersionen mit Hilfe von abbildenden und Streumethoden ermittelt. Dabei wurde Calciumphosphat einerseits im Doppel-Jet-, andererseits im

Tiple-Jet-Experiment gefällt. Die Art der Herstellung wirkt sich offenbar spezifisch auf die Kinetik des Systems aus.

Im *Doppel-Jet*-Reaktor entstehen Partikel, die auf drei verschiedenen Längenskalen unterschiedlich strukturiert sind. Dabei zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Verhalten, das vom Molekulargewicht der Polyaspartat-Komponente abhängt.

Polyaspartat mit dem Molekulargewicht 10000g/mol bewirkt als Zusatz bei der Fällung von Calciumphosphat im *Doppel-Jet*-Experiment die Ausbildung von zylindersymmetrischen Kolloiden mit einem Durchmesser von 2nm und einer Länge von 8nm. Daneben bilden sich Plättchen mit einer Fläche von über 40nm x 40nm und einer Höhe von 4nm. Darin weist eine mittlere Schicht von 2nm Dicke eine besonders hohe Elektronendichte auf. Sie ist beidseitig bedeckt von je einer Schicht der Dicke 1nm mit einer sehr niedrigen Elektronendichte. Über den Zeitraum von Wochen ist keine Bildung von größeren Partikeln, z.B. Aggregaten zu beobachten.

Eine Erhöhung des Polyaspartat-Molekulargewichtes auf 18000g/mol führt im *Doppel-Jet*-Experiment zur Entstehung von Kolloiden auf drei Größenskalen. Die Zylindersymmetrie bleibt erhalten, allerdings wächst der Durchmesser auf 6nm und die Länge der Zylinder auf 24nm an. Das bedeutet eine Skalierung beider Dimensionen mit dem Faktor 3 gegenüber der Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion. In Entsprechung zu der Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion bilden sich in Folge der Fällung in der Pasp18-Lösung ebenfalls Plättchen aus. Sie haben die unveränderten Maße von über 40nm x 40nm und einer Dicke von 4nm. Allerdings ist hier die Elektronendichteverteilung entlang der z-Achse leicht abgewandelt. Eine Schicht hoher Dichte erstreckt sich über 0,8nm. Sie ist eingeschlossen von zwei Schichten niedrigerer Dichte der Dicke 1,6nm. Diese beiden Symmetrien dominieren den Größenbereich unter 50nm. Darüber hinaus beobachtet man die Ausbildung von monodispersen sphärischen Aggregaten mit einem Radius von 500-600nm, die aus plättchenartigen Bausteinen bestehen. Die Eigenschaften dieser Aggregate sind zeitabhängig. Zunächst weisen sie eine geringere Dichte im Zentrum und eine erhöhte zum Rand hin auf. Im Laufe von mehreren Tagen wird der mittlere Bereich aufgefüllt und erreicht die höchste Dichte, während sie sich am Rand asymptotisch der des Lösungsmittels annähern.

Eine Variation der Konzentration des Polyaspartates führt zu dem Ergebnis, daß durch Konzentrationserhöhung der Prozeß der Ausbildung von Strukturen, die für alle Konzentrationen gleich sind, beschleunigt und die Bildung von Makrokristallen unterdrückt wird. Alle Dispersionen zeigen eine Stabilität über Wochen.

Das *Triple-Jet*-Experiment in einer 0,1%-igen Pasp18-Lösung hat das Wachstum und die Aggregation langer, fadenartiger Gebilde zur Folge. Es konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, ob diese kristallin sind, obwohl Hinweise darauf bestehen. Die Aggregate sind, ähnlich wie in den Doppel-Jet-Versuchen, sphärisch und monodispers und haben ein charakteristisches zeitliches Verhalten. Diesmal ist eine höchste Dichte in ihrem Zentrum von Anfang an gegeben. Die Fäden bilden sich aber mit der Zeit zurück.

Schließlich wurde der Vergleich mit Dispersionen angestellt, die aus Pasp 18 und CaCl_2 in Wasser erzeugt wurden. Sofort fällt ein Großteil des Materials als weißer Niederschlag aus. Im Überstand bleiben sphärische Partikel mit einem Radius von 300nm. Manche von ihnen weisen eine geringere Dichte im Zentrum auf. Sie sind nicht aus kleineren Bausteinen zusammengesetzt.

Die Röntgen-Kleinwinkelstreuung an Polyaspartat-Wasser-Lösungen zeigt für beide Polyaspartat-Molekulargewichte zylindrische Strukturen mit einem Durchmesser von 1,6nm und der Länge 6nm.

Offenbar ist diese Symmetrie durch das Polyaspartat-Molekül vorgegeben. Sie ist unabhängig vom Molekulargewicht. Die Größe der Struktur deutet darauf hin, daß sie aus mehr als einem Polyaspartat-Molekül aufgebaut ist. Sie ist konsistent mit der Vorstellung, daß Polyaspartat Helices oder Knäuel ausbilden kann. Anhand der vorliegenden Daten kann jedoch keine Aussage über die Konformation von Polyaspartat gemacht werden.

Die Zugabe von zweiwertigen Ca^{2+} -Ionen vernetzt die Polyaspartat-Moleküle miteinander. Die einzige Struktur, die einheitlich erscheint, ist die sphärischer Partikel, die auf kleinerer Längenskala nicht weiter strukturiert sind. Insgesamt ist die Dispersion von niedriger Stabilität, was noch einmal die Wirkung von Ca^{2+} als Flockungsmittel bestätigt. Die später in den Calciumphosphat-Dispersionen beobachteten Strukturen sind nicht allein durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen an Polyaspartat herzustellen.

Obwohl die Kinetik in den Calciumphosphat-Dispersionen von der Bindung von Ca^{2+} -Ionen an das Polyaspartat dominiert wird, ist die Anwesenheit der Phosphationen für die Ausbildung der verschiedenen angeführten Strukturen notwendig.

Die zylindrischen Gebilde, die in der Pasp10-Calciumphosphat-Dispersion entstehen, haben eine nur gering höhere Ausdehnung als die der Zylinder in den wäßrigen Polyaspartat-Lösungen. Es ist anzunehmen, daß dies auf Adsorption von Calcium- und Phosphationen an die in wäßriger Lösung bereits vorhandenen Zylinder beruht.

Ob diese Adsorption geordnet ist und letztlich zur Ausbildung einer kristallinen Struktur führt, kann nicht bewiesen werden.

Pasp18 dagegen skaliert beide charakteristischen Größen der Zylinder mit dem Faktor 3. Diese ganze Zahl und die Tatsache, daß die zylindrischen Strukturen in der wäßrigen Pasp-18-Lösung nur die Maße 1,6nm x 6nm haben, legt nahe, daß die 6m x 24nm großen Zylinder in der Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion aus kleineren zusammengesetzt sind. Dieses Verhalten entspricht auch der Beobachtung, daß in den Pasp18-Calciumphosphat-Dispersionen 1000-1200nm große Aggregate aus Plättchen entstehen, die in den Pasp10-Calciumphosphat-Dispersionen fehlen. Das Molekulargewicht von 18000g/mol reicht offensichtlich aus, um vorgeformte kleinere Strukturen zu größeren zu verbrücken. Das von 10000g/mol ist dafür zu niedrig. Die Umordnung der Bausteine geschieht von Rand zur Mitte hin.

Im *Triple-Jet*-Experiment sind dank einer anderen Kinetik nur noch fadenähnliche Partikel zu sehen. Hier ist davon auszugehen, daß zunächst das Polyaspartat mit Calciumionen abgesättigt wird, um dann eine Wechselwirkung mit den Phosphationen einzugehen. Dagegen wird im *Doppel-Jet*-Versuch zuerst amorphes Calciumphosphat gefällt, das sich später auflöst und somit Calcium- und Phosphationen freisetzt. Das *Triple-Jet*-Experiment bildet eine Parallele zu den in ⁶⁹ beschriebenen Versuchen mit einem vergleichbaren Ausgang: der Bildung der Fäden. In Referenz 69 wurde durch Variation des pH-Wertes eine Änderung der Anzahl der deprotonierten Carboxylgruppen im Blockcopolymer erreicht. Dort wurde die Polymerlösung auch zunächst mit Ca^{2+} -Ionen abgesättigt, bevor Phosphationen zugegeben wurden.

Somit liegt nahe, daß die Ausbildung von plättchenförmigen Partikeln, die nur im *Doppel-Jet*-Experiment auftritt, ein kinetisches Phänomen ist. Zunächst werden amorphe Calciumphosphat-Cluster gebildet. Diese treffen auf Polyaspartat-Moleküle, die sofort Ca^{2+} -Ionen binden. Dabei kann, wie aus der Literatur bekannt³⁴, eine β -Faltblatt-Konformation im Polyaspartat induziert werden. Darin haben die Carboxylgruppen, die an Ca^{2+} binden, den Abstand 7Å voneinander, wenn man annimmt, daß aus thermodynamischen Gründen nur jede zweite COOH-Gruppe sich auf der gleichen Seite des β -Faltblattes befindet. Dieser Abstand entspricht genau dem doppelten von 3,5Å der Ca^{2+} -Ionen im Bruschi-Wellblatt⁷⁰. Die gleichzeitige Anwesenheit von Phosphationen in hoher lokaler Konzentration kann durch Adsorption an die bereits gebundenen Ca^{2+} -Ionen zum epitaktischen Aufwachsen von Bruschi auf der Polyaspartat-Matrix führen. Durch erneute Adsorption von

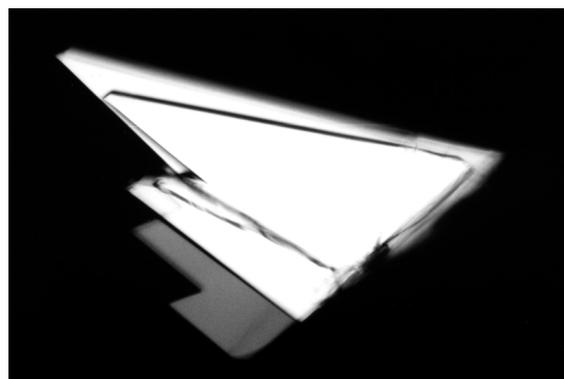
Polyaspartat kann das Wachstum der kristallinen Komponente gestoppt werden. Für ein solches Modell spricht die Beobachtung, daß die Plättchen im TEM eine streng geometrische drei- oder viereckige Form aufweisen. Die aus den SAXS-Experimenten resultierende Dichteverteilung der Plättchen mit einer mittleren Schicht sehr hoher Elektronendichte steht im Einklang mit dieser Vorstellung. Die Dicke dieser Schicht von 2nm in der Pasp10- und 0,8nm in der Pasp18-Calciumphosphat-Dispersion entspricht der einfachen bzw. dreifachen Dicke einer Bruschtschicht von 7Å. Das wäre andererseits eine erneute Bestätigung der bereits bekannten Tatsache, daß länger-kettige Polyaspartate die besseren Inhibitoren in biomineralisierenden Systemen sind (Zitat).

Da amorphe Calciumphosphat-Cluster im *Triple-Jet*-Experiment fehlen, bilden sich keine Plättchen aus. Die Fäden hier entsprechen den Zylindern im *Doppel-Jet*-Experiment mit dem Unterschied, daß im *Triple-Jet*-Reaktor sämtliche Ionen zu deren Bildung zur Verfügung stehen und die Fäden deshalb weiter wachsen können. Im *Doppel-Jet*-Reaktor wird ein Teil der Ionen auch zur Bildung der Plättchen und deren Verbrückung genutzt.

10 Vergleich mit BSA-Calciumphosphat-Systemen

Calciumphosphat-Dispersionen wurden nach der *Doppel-Jet*-Methode ebenfalls in gepufferten Lösungen von BSA hergestellt. Die BSA-Konzentration beträgt 0,05% G/V. Bei einem Molekulargewicht von 66000g/mol entspricht das einer molaren Konzentration von 0,076 µMol/l. Eine 0,01-molare HEPES-Lösung puffert den pH-Wert auf 5,5. Die Ca^{2+} - und HPO_4^{2-} -Konzentration bleibt unverändert zu den vorherigen Versuchen. Erneut fällt sofort eine kristalline Phase aus. Sie weist die Modifikation des Bruschits auf. Die Geometrie der Kristalle ist regelmäßiger als die der in Polyaspartat-Lösungen gefällten. Darüber hinaus weisen sie keine, durch höhere Löslichkeit ausgezeichneten, Punkte auf und wachsen ausschließlich epitaktisch aufeinander auf.

Abb. 51: Bruschitkristalle aus einer 0,05%-igen BSA-Lösung, ca. 1mm lang, aufgenommen im Polarisationsmikroskop



Diese Form stimmt exakt mit der der Muster überein, die beim Auflösen der Bruschkristalle auf deren Oberfläche entstehen, wie in Kapitel 6.2.2 zu sehen war. Sie hat nichts mehr mit den Parametern der monoklin-prismatischen Einheitszelle des Bruschts gemein. Offenbar greifen BSA-Moleküle, so wie Polyaspartat vorher auch, in die Entstehung der kristallinen Ordnung ein. Die Übereinstimmung mit der Musterbildung während der Auflösung des Kristalls spricht dafür, daß der dominierende Faktor in der Kinetik hier die Anordnung von Ca^{2+} -Ionen durch das Makromolekül ist.

Auch das dynamische Verhalten der Dispersionen unterscheidet sich wenig von dem der Polyaspartat-Dispersionen. DLS Messungen an filtrierten Proben zeigen das Entstehen von monodispersen Partikeln mit einem Radius von ca. 300nm. Im Laufe von 6 Tagen wächst dieser auf ca. 400nm an. Die SLS-Meßergebnisse zeigen einen gut ausgebildeten Formfaktor in der $I(q)$ -Streukurve. Die Interpretation der Daten gelingt sehr gut mit einem Modell für monodisperse kugelsymmetrische Streuer inhomogener Dichteverteilung $\rho(r)$. Im Gegensatz dazu führt die Anwendung eines Modells einer Größenverteilung kugelsymmetrischer Streuer mit homogener Dichte zu keinem akzeptablen Ergebnis, da die Lage der lokalen Minima in der Streukurve schlecht beschrieben bleibt. Mit Hilfe des Programms DECON wird aus der Paarkorrelationsfunktion $p(r)$ die radiale Dichteverteilung $\rho(r)$ der Sphären gewonnen. Im Anschluß ist die Streukurve (links) und die entsprechende Dichteverteilung für monodisperse sphärische Partikel (rechts) gezeigt.

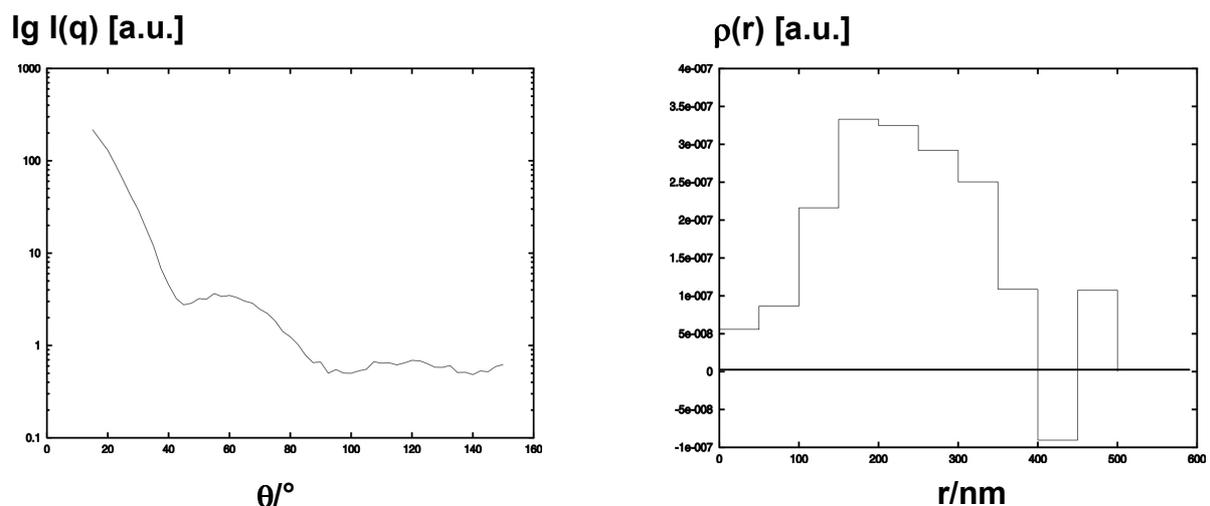
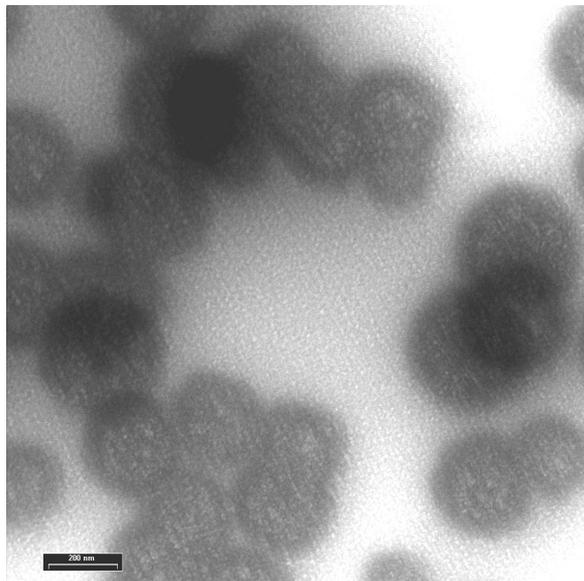


Abb. 52: Streukurve $I(q)$ einer 0,05%BSA-Calciumphosphat-Dispersion 6 Tage nach einer Filtration (rechts) und die radiale Dichteverteilung $\rho(r)$ der monodispersen sphärischen Streuer (links).

Befriedigend ist die Übereinstimmung des aus der Dichteverteilung resultierenden Radius der Partikel von 400nm mit dem aus der DLS-Messung bestimmten. Interessant ist nun, die Struktur der in der Lichtstreuung beobachteten Partikel direkt abbilden zu können. Für die TEM wurden Proben im Laufe von 6 Tagen präpariert. Wieder zeigt sich, daß in der Lichtstreuung das Gesamtsignal durch die größten Gebilde stark dominiert. In den folgenden TEM-Bildern sind hingegen die einzelnen Bausteine der ca. 900nm großen Überstrukturen zu sehen, die sich als monodisperse ca.100-200nm große Kugeln präsentieren. Ihre Zusammensetzung scheint von der Elektronendichte her inhomogen zu sein. Elektronenbeugung an ihnen zeigt keine Anwesenheit von geordnetem Material.

Abb. 53: TEM-Aufnahmen der BSA-Calciumphosphat-Dispersion nach einer Filtration

Meßbalken = 200nm



Nach wenigen Tagen ist in den TEM-Aufnahmen eine zunehmende Aggregation der Bausteine zu beobachten. Die Analyse des ringförmigen Elektronen-Beugungsmusters weist auf polykristalline Strukturen hin.

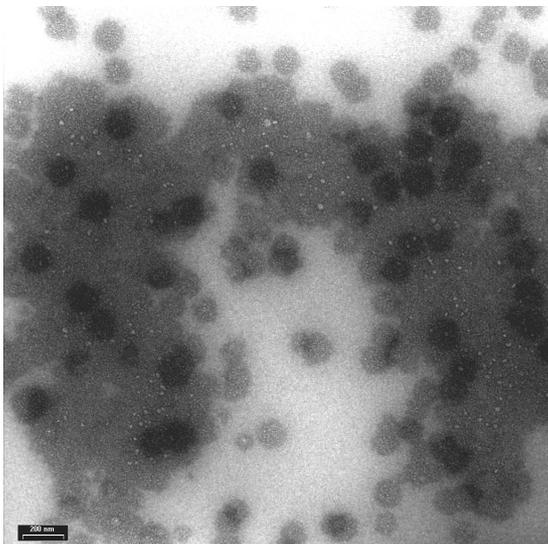


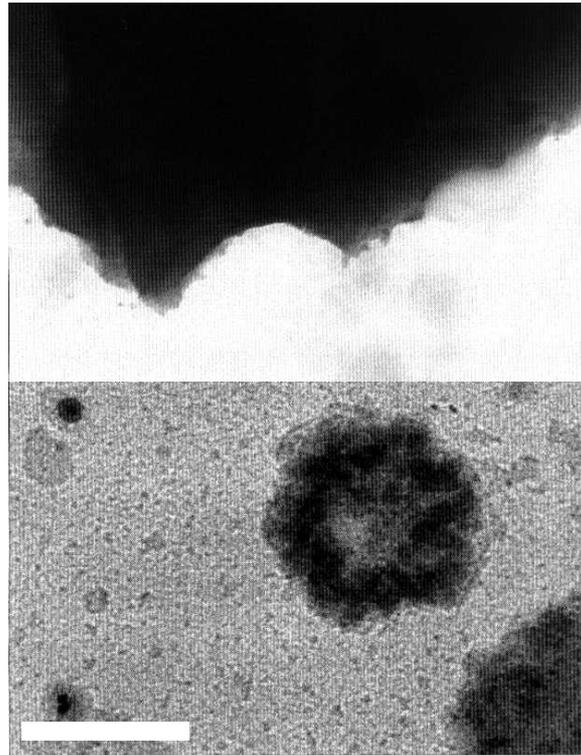
Abb. 54: Aggregierte Partikel aus der Abb. 53 6 Tage später, aufgenommen im TEM.

Meßbalken = 200nm

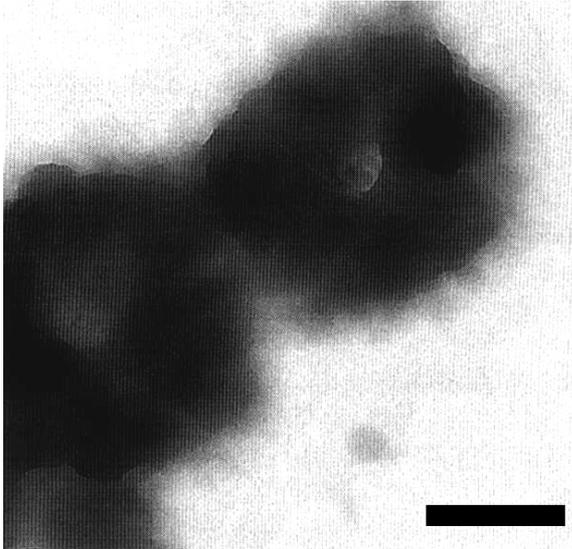
Eine WAXS-Analyse der getrockneten Dispersionen gibt keinen Hinweis auf Kristallinität. Deshalb wurden die Dispersionen in Kieselgel gegossen, getrocknet und anschließend calciniert. Das Produkt wurde gemahlen und wieder mittels TEM untersucht. In den folgenden TEM-Aufnahmen sind sowohl einzelne Partikel und deren Morphologie, wie auch charakteristische Bruchkanten der Silikatmatrix zu beobachten.

Abb. 55: TEM-Aufnahmen der Silikatmatrix mit typischer Bruchkante (oben), deren Form und Größe genau dem darunter gezeigten Partikel entsprechen.

Meßbalken = 500nm



Die Proben enthalten nach dem Calcinieren kein organisches Material mehr. Es erscheint jedoch kein diskretes Elektronen-Beugungsmuster und damit kein Hinweis auf einen kristallinen Gehalt in den abgebildeten Partikeln. Die geringere Dichte in der Mitte der Objekte entspricht der angepassten im Modell für inhomogene sphärische Streuer aus der SLS-Messung (Abb. 52). Offenbar lagern sich die kugelförmigen 100-200nm großen Bausteine zu sphärischen Aggregaten zusammen, die, wie den TEM-Aufnahmen zu entnehmen ist, mit einer hohen Elektronendichte belegt sind. Eine weitere TEM-Aufnahme gibt mehr Aufschluß über den genauen Aufbau dieser torusähnlichen Gebilde. Es sind nun auch einzelne scharfe Kanten am Rand des einzelnen Partikels zu entdecken.



*Abb. 56: Torusähnliche Gebilde
in der BSA-Calciumphosphat-Dispersion
mit erkennbaren scharfen Kanten*

Meßbalken = 200nm

Die Ähnlichkeit dieser Ergebnisse mit denen aus den Experimenten an Pasp18-Calciumphosphat-Dispersionen erstaunt. BSA besitzt im Gegensatz zu Pasp18 verschiedene Funktionalitäten und das 3,6-fache Molekulargewicht. Auch ist das Molekül in der Lage, seine Konformation schnell den Anforderungen der Umgebung anzupassen⁷¹. Aus der Kristallisation von Brushit und aus den Ergebnissen im Kapitel 6.2.3 geht allerdings hervor, daß die Wechselwirkung zwischen den Carboxylgruppen im BSA und den Ca^{2+} -Ionen immer noch die Kinetik dominiert. Diese führt zunächst zur Bildung von 100-200nm großen sphärischen Partikeln, wahrscheinlich bestehend aus BSA-Molekülen, die durch Ca^{2+} -Ionen vernetzt werden. Die Einheitlichkeit dieser Gebilde ist auffällig und wahrscheinlich auf die hohe Monodispersität der BSA-Moleküle zurückzuführen. Ihre Gestalt weicht somit erheblich von der der faden- und plättchenartigen Primärpartikel in den Polyaspartat-Dispersionen ab. Die Ausbildung der kugelsymmetrischen Überstrukturen mit inhomogener radialer Dichteverteilung stellt wiederum eine Parallele zu den Polyaspartat-Systemen dar.

Eine kurze Zusammenfassung aller Ergebnisse und ein Ausblick folgen.

11 Zusammenfassung und Ausblick

Zwei Themenkomplexe wurden in dieser Arbeit behandelt. Zum einen wurde die Einwirkung von wäßrigen Polymerlösungen auf eine ausgesuchte kristallographische Fläche des Brushits untersucht. Zum anderen wurden Experimente zum Verhalten

von Calciumphosphat-Dispersionen, welche in wässrigen Polymerlösungen hergestellt wurden, durchgeführt. Dabei wurde das besondere Augenmerk auf die Strukturausbildung und deren Dynamik gerichtet. Entsprechende analytische Methoden der Wahl sind die dynamische und die statische Lichtstreuung, die Weit- und die Kleinwinkel-Röntgenstreuung einerseits, andererseits die Transmissions-elektronen-Mikroskopie und die Rasterkraftmikroskopie als hochauflösende bildgebende Verfahren.

Als polymere Additive wurden Polyaspartate mit den Molekulargewichten 10000g/mol und 18000g/mol, sowie das Rinderserum-Albumin gewählt.

Das Auflösen der (010)-Fläche des Bruschits unter der Einwirkung von wässrigen Polymerlösungen wurde mittels der AFM abgebildet. Keine Adsorption von Polymeren an die Kristalloberfläche wurde beobachtet. Es bilden sich für die einzelnen Polymer-lösungen charakteristische stabile Kanten aus, die ausgezeichneten kristallographischen Achsen zugeordnet werden können. Daraus resultiert eine selektive Wechselwirkung der Polymere mit Ionen aus dem Kristallverband.

Calciumphosphat-Kolloide wurden in wässrigen Polymerlösungen hergestellt. Mit steigender Polymer-Konzentration wird die Kristallinität in den Dispersionen zunehmend unterdrückt.

In den Dispersionen mit Polyaspartat mit dem Molekulargewicht 10000g/mol als Zusatz bilden sich zylindrische Strukturen mit 2nm Durchmesser und 8nm Länge, sowie plättchenartige Strukturen mit einer Ausdehnung über 40nm x 40nm und einer Dicke von 2nm.

In den Dispersionen mit Polyaspartat mit dem Molekulargewicht 18000g/mol als Zusatz bilden sich zylindrische Strukturen mit 6nm Durchmesser und 24nm Länge, und wiederum plättchenartige Strukturen mit einer Ausdehnung über 40nm x 40nm und einer Dicke von 2nm. Darüber hinaus entstehen kugelsymmetrische Aggregate aus Plättchen, die einen Radius von 500-600nm aufweisen. Diese haben eine inhomogene radiale Dichteverteilung, die zeitabhängig ist. Es findet eine Verlagerung der höchsten Dichte vom Rand der Sphären zu ihrem Mittelpunkt hin statt. Nur das längerkettige Polyaspartat ist in der Lage, kleinere Strukturen zu großen zu verbrücken.

Es gibt Hinweise auf die Ausbildung von Nanokristalliten in den plättchenartigen Partikeln, diese kann jedoch nicht bewiesen werden. Bruschit als Modifikation von kristallinem Calciumphosphat erscheint in diesem Fall plausibel.

Eine Abwandlung des Fällungsexperimentes, welche die Kinetik im System beeinflusst, führt dazu, daß keine plättchenförmigen Gebilde mehr entstehen. Es werden ausschließlich lange dünne fadenähnliche Partikel beobachtet, die aggregieren und sich im Laufe der Zeit zurückbilden. Das WAXS-Experiment gibt Hinweise darauf, daß eine Hydroxyapatit-Komponente gebildet wird.

Wird Calciumphosphat in wäßrigen gepufferten BSA-Lösungen gefällt, bilden sich zunächst monodisperse Kugeln mit einem Radius von 100-200nm. Diese Aggregieren zu sphärischen Gebilden, die wieder mit dem Modell kugelsymmetrischer Partikel mit einer niedrigeren Dichte im Zentrum und einer höheren am Rand beschrieben werden können. Es kann keine Kristallinität in ihnen nachgewiesen werden. Werden diese Aggregate in Kieselgel eingebettet und calciniert, so daß nur noch die anorganische Komponente übrigbleibt, weist sie eine Kugelsymmetrie mit niedrigerer Dichte im Zentrum auf. Die Aggregate sind also mit anorganischem Material belegt, welches jedoch nicht kristallin erscheint.

Die Kinetik der Fällungsexperimente beeinflusst entscheidend die beobachteten Strukturen. Sowohl die chemische Zusammensetzung als auch das Molekulargewicht sind maßgeblich für die Kinetik in den Systemen. Die Variation beider Parameter kann weitere Erkenntnisse über die genaue Art und Abfolge von spezifischen Wechselwirkungen zwischen der anorganischen und der organischen Komponente bringen. Mit Hilfe von maßgeschneiderten Polymeren mit definierten Funktionalitäten können dann einzelne Aspekte der Kinetik herausgegriffen und untersucht werden. Die Fülle der Informationen, die allein durch die Beobachtung des Systems Polyaspartat-Calciumphosphat zu gewinnen ist, spricht dafür, daß einfache Polymere zunächst die Additive der Wahl sind. Eine schrittweise Annäherung an die chemische Zusammensetzung von Proteinen, die an der Biomineralisation beteiligt sind, kann durch die Anwendung maßgeschneiderter Polymere wichtige Aufschlüsse über die genaue Rolle geben, die einzelne Funktionalitäten spielen.

Danksagung

Prof. Dr. M. Antonietti danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und für die Bereitschaft zu intensiven Diskussionen.

Dr. H. Schnablegger bin ich zutiefst für seine Geduld und Begeisterung, alles Wissen weiterzugeben, zu Dank verpflichtet.

Dr. H. Cölfen danke ich für viele Diskussionen und nützliche Hinweise.

Dr. Ch. Göltner, Dr. J. Hartmann und Rona Pitschke sei hier für die vielen schönen TEM-Bilder gedankt.

M. Regenbrecht und A. Heilig danke ich für viele Stunden und wertvolle Bilder am AFM.

Meinen Kollegen danke ich für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und für viele gesellige Stunden.

Literaturverzeichnis

- ¹ Volkmer D.: *Chemie in unserer Zeit* 33(1), 1999, S. 6.
- ² Yamamuro T., Hench L.L., Wilson J.: *Handbook of Bioactive Ceramics II*, CRC Press, 1990, S. 4.
- ³ Fleisch H. in *Biological Mineralization and Demineralization*, Nancollas G. Ed., Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag 1982, S. 233.
- ⁴ Glimcher M.J. in *Handbook of Physiology – Endocrinology VII*, American Physiological Society, Washington 1976, S. 25.
- ⁵ Fleisch H., Russel R.G.G. in *Calcium Metabolism in Renal Failure and Nephrolithiasis*, David D.S. Ed., Wiley & Sons, NY 1977, S. 293.
- ⁶ Boskey A.: *Clin. Orthop.* 157, 1981, S. 225.
- ⁷ Ryall R.L., Harnett R.M., Marshall V.R.: *Clin. Chem. Acta* 112, 1981, S. 349.
- ⁸ Neuman W.F. in *Fundamental and Clinical Bone Physiology*, Urist M.R. Ed., J. B. Lippincott Co., Toronto 1980, S. 83.
- ⁹ Patterson : *Nature* 173, 1954, S. 75.
- ¹⁰ Urist M.R. in *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Bourne Ed., Academic Press, NY 1976, S. 2.
- ¹¹ Heywood B. in *Biomimetic Materials Chemistry*, Mann S. Ed., VCH Weinheim 1996, S. 1.
- ¹² Anderson H.C. in *The Biochemistry and Physiology of Bone*, Bourne Ed., Academic Press, NY 1976, S. 135.
- ¹³ Tsortos A., Ohki S., Zieba A., Baier R.E., Nancollas G.: *J. Coll. Interface Sci.* 177, 1996, S.257.
- ¹⁴ Addadi L., Moradian-Oldak, Weiner S. in *Surface Reactive Peptides and Polymers*, Sikes und Wheeler Eds., ACS Symposium Series 444, Washington DC 1991, S. 13.
- ¹⁵ Addadi L., Moradian J., Shay E., Maroudas N.G., Weiner S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 1987, S. 2732.
- ¹⁶ Mann S.: *Structure and Bonding* 54, 1983, S. 125.
- ¹⁷ La Mer V.K.: *Industrial and Engineering Chemistry* 44, 1952, S. 1270.
- ¹⁸ Mann S.: *Chemie in unserer Zeit* 20, 1986, S. 69.
- ¹⁹ Mann S.: *Nature* 332, 1988, S.119.
- ²⁰ Li M., Schnablegger H., Mann S.: *Nature* 402, 1999, S. 393.
- ²¹ Blakemore R.P., Frankel R.B.: *Sci. American* 245(6), 1981, S. 42.
- ²² Kniep R., Busch S.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 35, 1996, S. 2624.
- ²³ Antonietti M., Göltner Ch.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36, 1997, S.910.
- ²⁴ Wong K.K.W., Douglas T., Gider S., Awschalom D.D., Mann S.: *Chem. Materials* 10(1), 1998, S. 279.
- ²⁵ Mann S., Shanton, Li, Connolly, Fitzmaurice: *Adv. Mater.* 12, 2000, S. 147.
- ²⁶ Walsh D., Lebeau B., Mann S.: *Adv Mater.* 11, 1999, S.324.
- ²⁷ Qi L., Cölfen H., Antonietti M.: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39(3), 2000, S.604.
- ²⁸ Nancollas G. in *Biological Mineralization and Demineralization*, Nancollas G. Ed., Dahlem Konferenzen, Springer-Verlag 1982, S. 79.
- ²⁹ Brown, Smith, Lehr, Frazier: *Nature* 196, 1962, S. 1048.
- ³⁰ Cölfen H.: *Vorlesung Bioceramics*, Universität Potsdam, 1999.
- ³¹ Katchalski E.: *Adv. Protein Chem.* 6, 1951, S. 123.
- ³² Fox S.W., Harada K., Rohlfing D.L. in *Polyamino Acids, Polypeptides and Proteins*, Stahmann M. Ed., University of Wisconsin Press, Madison 1962, S. 47.
- ³³ Wolk S.K., Swift G., Paik Y.H., Yocom K.M., Smith R.L., Simon E.S.: *Macromolecules* 27, 1994, S. 7613.
- ³⁴ Navas J.J., Aleman C., Lopez-Carrasquero F., Munos-Guerra S.: *Polymer* 38(14), 1997, S. 3477.
- ³⁵ Fernandez-Santin J.M., Aymami J., Rodrigues-Galan A., Munos-Guerra S., Subirana A.J.: *Nature* 311, 1984, S. 53.
- ³⁶ Wright A.K., Tompson M.R.: *Biophys. J.* 15, 1975, S 137.
- ³⁷ Guinier A.: *Ann. Phys.* 12, 1939, S.161.
- ³⁸ Benoit H., Holtzer A.M., Doty P.: *J. Phys. Chem.* 58, 1954, S. 636.
- ³⁹ Glatter O.: *J. Appl. Cryst.* 21, 1988, S. 886.
- ⁴⁰ Glatter O.: *J. Appl. Cryst.* 14, 1981, S. 101.
- ⁴¹ Porod G.: *Kolloid-Z.* 125, 1952, S. 51.
- ⁴² Mie G.: *Ann. Phys.* 25, 1908, S. 377.
- ⁴³ Glatter O.: *J. Appl. Cryst.* 13, 1980, S. 577
- ⁴⁴ Scherrer P.: *Gött. Nachr.* 2, 1918, S. 98.
- ⁴⁵ Schnablegger H., Glatter O.: *Appl. Optics* 30(33), 1991, S. 4889.
- ⁴⁶ Binnig G., Quate F.C.: *Phys. Rev. Lett.* 56, 1986, S. 930.
- ⁴⁷ Magonov S.N., Whangbo M.-H.: *Surface Analysis with STM and AFM*, VCH Weinheim 1996.
- ⁴⁸ Hansma P.K., Cleveland J.P., Radmacher M., Walters D.A., Hillmer P.E., Bezantilla M., Fritz M., Vie D.: *Appl. Phys. Lett.* 64, 1994, S. 1738.
- ⁴⁹ Drake B.: *Science* 243, 1989, S. 1586.
- ⁵⁰ Hertz H.: *J. Reine Angew. Math.*, 1881(92), S.156.

-
- ⁵¹ Zhong Q., Inniss D.: *Surface Sci. Lett.* 290, 1993, S. 688.
- ⁵² Krüger D., Anczykowski B., Fuchs H.: *Annalen der Physik* 5, 1997, S. 341.
- ⁵³ Sedlak M., Antonietti M., Cölfen H.: *Macromol. Chem. Phys.* 199, 1998, S. 247.
- ⁵⁴ Stavek, Sipek, Hirasawa, Toyokura: *Chem Metr.* 4, 1992, S. 545.
- ⁵⁵ Matijevic E.: *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 1(2), 1996, S. 176.
- ⁵⁶ Eanes E.D., Meyer J.L.: *Calcif. Tiss. Res.* 23, 1977, S.259.
- ⁵⁷ Scudiero L., Langford S.C., Dickinson J.T.: *Tribology Letters* 6, 1999, S. 41.
- ⁵⁸ Beevers C.A.: *Acta Chryst.* 11, 1958, S. 273.
- ⁵⁹ Hausmanns G.: *Diss.*, Universität Bonn, 1977.
- ⁶⁰ Alexander, Alexander, Mustion, Spector, Wright: *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 247, 1982, S. 831.
- ⁶¹ Littlejohn F., Saez A.E., Grant C.S.: *Industrial & Eng. Chem. Res.* 37(7), 1998, S. 2691.
- ⁶² Campbell A.A., Ebrahimpour A., Perez L., Smesko S.A., Nancollas G.: *Calcif. Tiss. Int.* 45, 1989, S. 122.
- ⁶³ Kerker M.: *The Scattering of Light*, Academic Press Inc, NY 1969, S. 64.
- ⁶⁴ Glatter O.: *J. Appl. Cryst.* 12, 1979, S. 166.
- ⁶⁵ Sikes S.C., Wheeler A.P. in *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation*, Westbroek, de Jong Eds., Reidel Dordrecht 1983, S. 285.
- ⁶⁶ Glatter O.: *J. Appl. Cryst.* 21, 1988, S. 886.
- ⁶⁷ Cölfen H., Antonietti M.: *Langmuir* 14, 1998, S. 582.
- ⁶⁸ Schaefer D.W.: *Science* 244, 1989, S. 1023.
- ⁶⁹ Antonietti M., Breulmann M., Göltner Ch., Cölfen H., Wong K.K.W., Walsh D., Mann S.: *Chem. Eur. J.* 4(12), 1998, S. 2493.
- ⁷⁰ Ohta M., Tsutsumi M., Ueno S.: *J. Chryst. Growth* 47, 1979, S. 135.
- ⁷¹ Foster J.F. in *Albumin Structure, Funktion and Uses*, Rosenoer, Oratz, Rothschild Eds., Pergamon, Oxford, 1977.