



**„Synthese und Charakterisierung von Calciumcarbonat-Phasen  
und Calciumphosphat-basierter Knochenersatzmaterialien“**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
vorgelegt von

**Markus Neumann**

geboren in Krefeld

Institut für Anorganische Chemie  
der Universität Duisburg-Essen

Essen 2008

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum vom 01. Juni 2005 bis zum 23. Mai 2008 im Arbeitskreis von Prof. Dr. Matthias Epple im Institut für Anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

Gutachter: Prof. Dr. M. Epple  
Prof. Dr. C. Mayer

Vorsitzender: Prof. Dr. G. Jansen

Tag der Disputation: 16.07.2008

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Einleitung und Aufgabenstellung.....	3
2. Theoretische Grundlagen .....	6
2.1 Calciumcarbonat .....	6
2.1.1 Die beteiligten Ionen .....	6
2.1.2 Calciumcarbonat und seine polymorphen Phasen.....	7
2.1.2.1 Calcit .....	12
2.1.2.2 Aragonit .....	13
2.1.2.3 Vaterit.....	15
2.1.2.4 Monohydrocalcit .....	15
2.1.2.5 Ikaite .....	17
2.1.2.6 Amorphes Calciumcarbonat (ACC).....	22
2.1.3 Calciumcarbonat und Biomineralisation.....	25
2.2 Calciumphosphate.....	29
2.2.1 Das Orthophosphat-System.....	30
2.3 Arteriosklerose und glatte Muskelzellen .....	38
2.4 Knochen .....	42
2.4.1 Aufbau von Knochen.....	42
2.4.2 Zusammensetzung des Knochenminerals .....	46
2.4.3 Knochenersatzmaterialien .....	48
3. Verwendete Analysemethoden.....	52
3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX).....	52
3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) .....	53
3.3 IR-Spektroskopie (IR).....	54
3.4 Thermogravimetrie (TG) .....	56
3.5 Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC).....	57
3.6 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) .....	58
3.7 Kernresonanzspektroskopie (NMR) .....	60

3.8 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und Elementaranalyse (EA) .....	64
4. Ergebnisse und Diskussion.....	66
4.1 Calciumcarbonate .....	66
4.1.1 ACC.....	66
4.1.2 Ikait.....	79
4.1.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie an Calciumcarbonat-Phasen .....	85
4.2 Knochenersatzmaterialien.....	94
4.2.1 Zelltests an synthetischem Knochenersatzmaterial.....	94
4.2.2 Analyse von zwei Knochenersatzmaterialien .....	105
4.3 Einfluss von Apatit auf glatte Muskelzellen.....	117
5. Experimenteller Teil.....	123
5.1 Herstellung von ACC.....	123
5.2 Umwandlung von ACC .....	123
5.3 Herstellung von Ikait .....	124
5.4 Herstellung von MHC.....	124
5.5 Fällung von Hydroxylapatit und Carbonatapatit .....	124
5.6 Apatit für Osteoblasten- und Osteoklastentests.....	127
5.7 Apatit für Tests mit glatten Muskelzellen .....	128
6. Zusammenfassung .....	129
7. Literaturverzeichnis.....	132
8. Anhang .....	143
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	143
8.2 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien .....	144
8.3 Publikationsliste.....	145
8.4 Lebenslauf.....	147
8.5 Danksagung.....	148

## **1. Einleitung und Aufgabenstellung**

Die in der Natur häufig vorkommenden Calciumcarbonate spielen vor allem im Bereich der Biomineralien eine wichtige Rolle. In den letzten Jahren hat mit dem amorphen Calciumcarbonat (ACC) neben den kristallinen Modifikationen Calcit, Aragonit und Vaterit eine weitere Phase das Interesse der Forscher im Bereich der Biomineralisation geweckt. Trotz seiner Instabilität wurde es in vielen Biomineralien, in denen es durch organische Substanzen stabilisiert wird, nachgewiesen<sup>[1-8]</sup>. Ziel der momentanen Forschung ist es, ACC im Labor ohne Zusätze herzustellen. In dieser Arbeit wurde eine bestehende Synthesevorschrift<sup>[9]</sup> auf Reproduzierbarkeit überprüft und das ACC weiter charakterisiert; vor allem mittels Festkörper-NMR-Spektroskopie, wodurch geklärt werden sollte, ob das ACC Hydrogencarbonat enthält. Weiterhin wurden die Stabilität und Umwandlung von ACC näher untersucht.

Zusätzlich wurde eine neue Synthese zur Herstellung von Calciumcarbonat-Hexahydrat (Ikait) entwickelt. Ikait wurde bisher in keinem Biomineral gefunden, da er unter Normalbedingungen eine instabile kristalline Phase ist, die nur bei niedrigen Temperaturen stabil ist<sup>[10-12]</sup>. Der in dieser Arbeit synthetisierte Ikait wurde mit verschiedenen Analysemethoden charakterisiert; erstmals wurden auch Festkörper-NMR-Untersuchungen am Ikait durchgeführt.

Der menschliche Knochen ist ein hochgradig strukturiertes Kompositmaterial bestehend aus einer anorganischen Phase sowie einer organischen Phase<sup>[13-16]</sup>. Bisher gelingt es nur der Natur solche optimierten Komposite herzustellen. Es ist also noch nicht gelungen ein Knochenersatzmaterial zu synthetisieren, das die gleichen physikalischen, chemischen und biologischen Eigenschaften wie natürlicher Knochen aufweist.

Ein Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Herstellung eines Knochenersatzmaterials und daran vorgenommenen Zelltests. In der Medizin gibt es einen hohen Bedarf, Knochen zu ersetzen. Unter anderem werden Defekte im

Knochen, z. B. durch Frakturen, Tumore oder durch das Entfernen von infiziertem Knochengewebe hervorgerufen. Diese Defekte müssen mit einem geeigneten Knochenersatzmaterial aufgefüllt werden, da ab einer bestimmten Größe des Defekts der natürliche Heilungsprozess nicht mehr ausreicht, um den Defektbereich mit natürlichem Knochen zu stabilisieren. Ziel der Defektfüllung ist es, wieder einen stabilen, völlig belastbaren Knochen zu erhalten. Aufgrund der limitierten Menge und der Nachteile von natürlichen Materialien gibt es ein großes Interesse an synthetischen Knochenersatzmaterialien. Zu den Nachteilen gehört bei körperfremden Implantaten (von Tieren, so genannte Xenografts) vor allem die Gefahr von Infektionen. Diese Gefahr kann auch bei Materialien, die von einem menschlichen Spender stammen (Allografts), nicht ausgeschlossen werden. Implantate, die aus dem eigenen Körper gewonnen werden (Autografts), sind nach wie vor der Standard für Knochenersatz, da sie eine perfekte Biokompatibilität besitzen und nicht die Gefahr von Infektionen mit sich bringen<sup>[17-20]</sup>. In dieser Arbeit wurden in Zusammenarbeit mit Kooperationspartnern sowohl Osteoblasten- als auch Osteoklastentests zur Überprüfung der Biokompatibilität und der Bioresorbierbarkeit des Materials durchgeführt. Das Material besteht aus nanokristallinem Carbonatapatit und ist somit in seiner chemischen Zusammensetzung dem natürlichen Knochen sehr ähnlich. Aufgrund der Nanokristallinität soll das Material im Gegensatz zu anderen kristallinen Biomaterialien eine bessere Resorbierbarkeit aufweisen.

Neben den gewünschten Calcifikationen (z. B. Knochen und Zähne) gibt es auch viele unerwünschte Verkalkungen (z. B. Arteriosklerose, Nierensteine). Unter Arteriosklerose versteht man Ablagerungen in arteriellen Blutgefäßen, die die Ursache für eine Reihe von Krankheiten sein können (z. B. Herzinfarkt, Schlaganfall). Die Ablagerungen, auch Plaques genannt, setzen sich aus Calciumphosphat und organischen Substanzen, insbesondere Cholesterin, zusammen<sup>[21-23]</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von

---

nanokristallinen Apatit-Phasen auf glatte Muskelzellen, die bei einer Arteriosklerose eine entscheidende Rolle spielen, untersucht. Glatten Muskelzellen wird eine schützende Wirkung zugeschrieben, da sie die Plaques vor dem Abreißen schützen und somit eine mögliche Thrombose oder Lungenembolie verhindern<sup>[22]</sup>. Untersuchungen mit basischen Calciumphosphaten (BCP) und Kristallen aus explantierten Plaques führten zum Tod der glatten Muskelzellen.

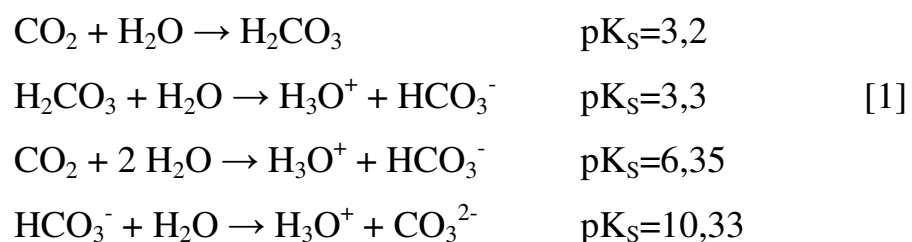
## 2. Theoretische Grundlagen

### 2.1 Calciumcarbonat

#### 2.1.1 Die beteiligten Ionen

Calcium (lat.: calx = Stein, Kalkstein) gehört zu den Erdalkalimetallen und hat die Ordnungszahl 20. Der Ionenradius der zweiwertigen Calciumionen beträgt 100 pm. Es ist mit 3,6 Gew.-% das dritthäufigste Metall in der Erdkruste. Es kommt in der Natur vor allem als Carbonat (Kalk), Sulfat (Gips), Phosphat (Apatit) und Silikat (z. B. Wollastonit) vor. Calciumverbindungen spielen in der Tier- und Pflanzenwelt eine wichtige Rolle; aus ihnen werden unter anderem Knochen, Schalen und Gehäuse aufgebaut. Sie sind zudem ein wichtiger Wachstumsfaktor für Pflanzen. Das Knochengerüst eines erwachsenen Menschen enthält ungefähr 1,2 kg Calcium <sup>[24]</sup>.

Carbonate sind die Salze der Kohlensäure, einer mittelstarken Säure, die sich aus wässriger Lösung nicht isolieren lässt. In wässriger Lösung steht die Kohlensäure im Gleichgewicht mit hydratisiertem Kohlendioxid <sup>[25]</sup>.



In Lösungen von Carbonaten entsteht ein pH-Wert-abhängiges Konzentrationsverhältnis vom Carbonat-Ion zum Hydrogencarbonat-Ion.

Carbonate sind meist schwer löslich. Daneben gibt es die leichter löslichen Hydrogencarbonate, die das Ion  $\text{HCO}_3^-$  enthalten. Da es sich um basische Salze handelt, werden die Carbonate von Säuren unter Bildung von  $\text{CO}_2$  zersetzt. Durch Erhitzen zerfallen die Carbonate zu den entsprechenden Metalloxiden und  $\text{CO}_2$ . Das  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ion mit einer delokalisierten  $\pi$ -Bindung ist trigonal-planar mit einem durchschnittlichen C-O-Bindungsabstand von 130 pm aufgebaut.



Ebenfalls als Carbonate werden die Ester der Kohlensäure bezeichnet, mit der allgemeinen Formel  $O=C(OR)_2$ , wobei R einen Alkyl- oder Aryl-Rest angibt <sup>[24, 25]</sup>.

### 2.1.2 Calciumcarbonat und seine polymorphen Phasen

Calciumcarbonat ist in reinem Wasser ein schwerlösliches Salz. In kohlensäurehaltigem Wasser steigt die Löslichkeit jedoch um mehr als das 100fache an, da sich das folgende Gleichgewicht zum Calciumhydrogencarbonat hin verschiebt:



Beim Kochen oder Eindunsten einer  $Ca(HCO_3)_2$ -Lösung liegt das Gleichgewicht aufgrund des Entweichens von  $CO_2$  auf der linken Seite, so dass Calciumcarbonat ausfällt. Hierauf beruhen sowohl die Abscheidung von Kesselstein beim Erhitzen von calciumcarbonathaltigem Wasser als auch die Bildung von Stalagmiten und Stalaktiten in Tropfsteinhöhlen <sup>[25]</sup>.

Vom Calciumcarbonat gibt es fünf kristalline und eine amorphe Form (ACC). Die drei wasserfreien kristallinen Modifikationen unterscheiden sich nur in ihrer Kristallstruktur. Zudem existieren noch zwei wasserhaltige Modifikationen, das Calciumcarbonat-Monohydrat (Monohydrocalcit, MHC)  $CaCO_3 \cdot H_2O$  und das Calciumcarbonat-Hexahydrat (Ikait)  $CaCO_3 \cdot 6 H_2O$ . Eine Zusammenfassung der kristallographischen und physikalischen Daten der verschiedenen kristallinen Phasen zeigt Tabelle 1.

Die Löslichkeit von Calciumcarbonaten nimmt mit steigender Temperatur ab; eine Ausnahme bildet der Ikait, dessen Löslichkeit mit steigender Temperatur zunimmt. In Tabelle 2 sind die  $pK_L$ -Werte der einzelnen Polymorphe aufgelistet. Die Werte zeigen deutlich, dass die Phase umso besser löslich ist, je thermodynamisch instabiler sie ist <sup>[26]</sup>.

**Tabelle 1:** Kristallographische <sup>[27]</sup> und physikalische Daten <sup>[28-30]</sup> der verschiedenen kristallinen Polymorphe und Pseudopolymorphe von Calciumcarbonat.

Eigenschaft	Calcit	Aragonit	Vaterit	MHC	Ikait
Formel	CaCO <sub>3</sub>	CaCO <sub>3</sub>	CaCO <sub>3</sub>	CaCO <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	CaCO <sub>3</sub> ·6 H <sub>2</sub> O
Raumgruppe	$R\bar{3}c$	$Pmcn$	$P6_3/mmc$	$P3_121$	$C2/c$
Kristallsystem	trigonal	orthorhombisch	hexagonal	trigonal	monoklin
Gitter- konstanten [Å]	$a=4,99$	$a= 4,96$	$a= 7,15$	$a= 6,09$	$a= 8,79$
	$b= 4,99$	$b= 7,97$	$b= 7,15$	$b=6,09$	$b= 8,31$
	$c=17,06$	$c= 5,74$	$c=16,95$	$c= 7,54$	$c=11,02$
	$\alpha=90^\circ$	$\alpha=90^\circ$	$\alpha=90^\circ$	$\alpha=90^\circ$	$\alpha= 90^\circ$
	$\beta=90^\circ$	$\beta=90^\circ$	$\beta=90^\circ$	$\beta=90^\circ$	$\beta=110,5^\circ$
	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=90^\circ$	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=120^\circ$	$\gamma=90^\circ$
Dichte [g cm <sup>-1</sup> ]	2,71	2,94	2,54	2,38	1,82
Stabilität bei 25 °C und 1013 hPa	thermodynamisch stabilste Phase	stabil	metastabil	instabil	sehr instabil

**Tabelle 2:** Löslichkeitsprodukte und Löslichkeiten der Polymorphe von Calciumcarbonat; bei ACC wird ein Molekül Wasser pro Molekül CaCO<sub>3</sub> zur Berechnung der Löslichkeit angenommen.

	pK <sub>L</sub> (25 °C)	K <sub>L</sub> (bei 25 °C in mol l <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	Löslichkeit (mg l <sup>-1</sup> )
Calcit	8,48 <sup>[31]</sup>	3,31·10 <sup>-9</sup>	5,8
Aragonit	8,336 <sup>[31]</sup>	4,61·10 <sup>-9</sup>	6,8
Vaterit	7,931 <sup>[31]</sup>	1,22·10 <sup>-8</sup>	10,8
MHC	7,149 <sup>[32]</sup>	7,10·10 <sup>-8</sup>	31,5
Ikait	6,585 <sup>[11]</sup>	2,60·10 <sup>-7</sup>	106,2
ACC	6,393 <sup>[26]</sup>	4,05·10 <sup>-7</sup>	75,1

Die unterschiedlichen Modifikationen lassen sich mittels Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) und IR-Spektroskopie unterscheiden. ACC ist völlig röntgenamorph und zeigt im XRD keine diskreten Reflexe. Für das jeweilige Polymorph zeigen die Röntgenpulverdiffraktogramme unterschiedlich intensive Peaks bei charakteristischen  $2\theta$ -Werten. Das freie  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ion, das zur Punktgruppe  $D_{3h}$  gehört, besitzt vier Normalschwingungen, die im IR-Spektrum zu sehen sind; diese sind:  $\nu_1$  symmetrische C-O-Streckschwingung,  $\nu_2$  OCO-Deformationsschwingung außerhalb der Molekülebene (Dreh- bzw. Kippschwingung),  $\nu_3$  asymmetrische C-O-Streckschwingung und  $\nu_4$  OCO-Deformationsschwingung innerhalb der Molekülebene (Biege- bzw. Biegeschwingung) (Tabelle 3). Allerdings ist aus Symmetriegründen (Gruppentheorie) im Calcit die  $\nu_1$ -Schwingung IR-inaktiv, so dass sich Calcit von den anderen Modifikationen unterscheiden lässt <sup>[33, 34]</sup>. Die Lage der Banden ( $\nu_1$  1080-1090  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_2$  853-881  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_3$  1419-1511  $\text{cm}^{-1}$  und  $\nu_4$  694-750  $\text{cm}^{-1}$ ) ist für jedes Polymorph unterschiedlich. Im amorphen  $\text{CaCO}_3$  sind alle oben genannten Normalschwingungen IR-aktiv. Die  $\nu_3$  und  $\nu_4$  Moden können zudem in zwei Banden aufgelöst sein. Für die kristallinen Formen existieren zudem noch Gitterschwingungen, die im Bereich von 450-200  $\text{cm}^{-1}$  beobachtet werden können. Treten im ACC in diesem Bereich auch Banden auf, so ist dies ein Hinweis, dass es eine gewisse Ordnung besitzt. Da ACC Wasser enthält, findet man im IR-Spektrum die zugehörigen Banden im Bereich von 3375-3230  $\text{cm}^{-1}$  (asymmetrische und symmetrische OH-Streckschwingung) und bei 1640  $\text{cm}^{-1}$  (HOH-Deformationsschwingung) <sup>[33]</sup>. Zusätzlich zur qualitativen Analyse wurde eine Methode entwickelt, mit der man mittels IR-Spektroskopie Gemische der drei wasserfreien Polymorphen quantitativ analysieren kann <sup>[35]</sup>. Es ist allgemein bekannt, dass die Partikelgröße einen Einfluss auf die Spektren hat; je kleiner die Partikel sind, desto intensiver sind die Banden im IR <sup>[36, 37]</sup>.

**Tabelle 3:** Symmetrie der Normalschwingungen des Carbonat-Ions <sup>[33,34]</sup>.

D <sub>3h</sub> (freie CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -Ion)	D <sub>3</sub> (Calcit)	C <sub>s</sub> (Vaterit, ACC, Aragonit)
A <sub>1</sub> (R) (ν <sub>1</sub> )	A <sub>1</sub> (R) (ν <sub>1</sub> )	A' (IR,R) (ν <sub>1</sub> , 2ν <sub>3</sub> , 2ν <sub>4</sub> )
A <sub>2</sub> (IR) (ν <sub>2</sub> )	A <sub>2</sub> (IR) (ν <sub>2</sub> )	A'' (IR,R) (ν <sub>2</sub> )
E (IR,R) (ν <sub>3</sub> , ν <sub>4</sub> )	E (IR,R) (ν <sub>3</sub> , ν <sub>4</sub> )	

IR: Infrarot-aktiv; R: Raman-aktiv; ν<sub>1</sub>, ν<sub>2</sub>, ν<sub>3</sub>, ν<sub>4</sub>: Normalschwingungen des Carbonations; ν<sub>1</sub>: symmetrische C-O-Streckschwingung von 1080 bis 1090 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>2</sub>: CO<sub>3</sub>-Deformationsschwingung von 853 bis 881 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>3</sub>: asymmetrische C-O-Streckschwingung von 1419 bis 1511 cm<sup>-1</sup>; ν<sub>4</sub>: OCO-Deformationsschwingung innerhalb der Ebene (*bending*) von 694 bis 750 cm<sup>-1</sup>

Es gibt auch eine Vielzahl chemischer Tests, die zur Unterscheidung der einzelnen Polymorphe dienen. So verursacht Aragonit in einer Eisensulfatlösung einen grünen, Calcit einen gelben Niederschlag. Aragonit ergibt in einer verdünnten Cobaltnitrat-Lösung eine violette Färbung, während Calcit erst beim Erwärmen eine blaue Färbung der Lösung verursacht. Diese Tests waren früher oft die einzige Möglichkeit einen Hinweis auf die Modifikation zu erhalten. Heute finden sie jedoch aufgrund der Entwicklung leistungsstarker Methoden wie XRD und IR-Spektroskopie keine Verwendung mehr <sup>[38]</sup>.

Der Unterschied in der Stabilität zwischen Calcit und Aragonit ist so gering, dass sie sich nach ihrer Bildung im trockenen Zustand bei Raumtemperatur nicht umwandeln. Das Phasengleichgewicht zwischen Calcit und Aragonit wurde in der Vergangenheit grundlegend untersucht <sup>[15-18]</sup>. Selbst Vaterit, der deutlich instabiler als die beiden anderen wasserfreien Polymorphe ist, bleibt über einen langen Zeitraum unverändert, wenn er trocken ist. Die Tendenz zur Bildung metastabiler Phasen von CaCO<sub>3</sub> aus wässriger Lösung wird durch die Erhöhung der Fällungsgeschwindigkeit und der Konzentration von bestimmten Zusätzen gesteigert. Es wird angenommen, dass diese Additive die Keimbildung der

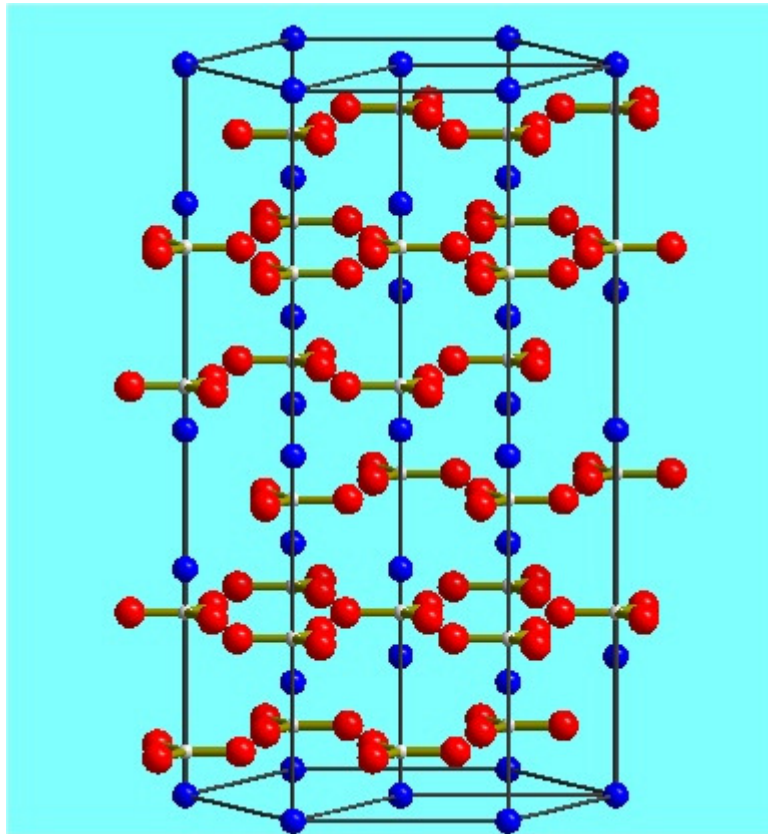
stabilen Phasen verzögern, wodurch eine Übersättigung der Lösung eintritt und somit die Bildung metastabiler Phasen begünstigt wird. Dabei ist der Einfluss von Additiven spezifisch für eine bestimmte Calciumcarbonatphase. So wurden in Gegenwart von Magnesium alle Phasen bis auf Vaterit synthetisiert, während bei Zugabe von Calgon<sup>®</sup> (ein Polyphosphat) in unterschiedlichen Konzentrationen alle Polymorphe außer Aragonit identifiziert werden konnten<sup>[39]</sup>. Makromoleküle, die aus Biomineralien gewonnen wurden, begünstigen *in vitro* die Bildung der für sie charakteristischen Calciumcarbonatphase<sup>[7]</sup>. Dickinson et al.<sup>[40]</sup> haben den Kristallisationsmechanismus von Calciumcarbonat, kontrolliert durch die Menge an  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und  $\text{CO}_2$  im Kristallisationsraum, unter dem Gesichtspunkt des kinetischen/thermodynamischen Gleichgewichts untersucht. Im Bereich geringer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (2-6 mM) bestimmt diese die Fällung und das System wird thermodynamisch kontrolliert. Liegt die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  über 80 mM, so beeinflusst der Partialdruck von  $\text{CO}_2$  die Kristallisation. Bei ausreichend hohem  $\text{CO}_2$ -Druck ist das System unter kinetischer Kontrolle, und es bildet sich überwiegend Vaterit. Im Bereich hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen wird für alle  $\text{CO}_2$ -Drücke eine Vateritbildung beobachtet.

### 2.1.2.1 Calcit

Calcit, die bei 25 °C und 1013 hPa thermodynamisch stabilste Calciumcarbonat-Modifikation, kristallisiert in einer trigonalen Struktur in der Raumgruppe  $R\bar{3}c$  (Abbildung 1). Zudem existieren noch eine Hochtemperaturmodifikation (985 °C bei Normaldruck) mit der Raumgruppe  $R3m$ <sup>[41]</sup> und mehrere Hochdruckmodifikationen (Calcit II - Calcit V). Bei Raumtemperatur entsteht Calcit II bei 1,70 GPa, der dann bei 2,15 GPa in Calcit III übergeht. Calcit III ist bei Raumtemperatur bis 6,16 GPa stabil und wandelt sich erst bei einer Temperaturerhöhung auf 345 °C in Aragonit um<sup>[42]</sup>. Calcit zerfällt bei ungefähr 600 °C in Calciumoxid und Kohlendioxid; die genaue Zerfallstemperatur hängt dabei vom vorliegenden CO<sub>2</sub>-Partialdruck ab.

Reiner Calcit ist durchsichtig und farblos. In der Natur vorkommender Calcit ist meist in Abhängigkeit der Ionen, die einige Calcium-Ionen im Kristallgitter ersetzen, gefärbt. Calcit hat die besondere Eigenschaft, wie alle nichtkubischen, lichtdurchlässigen Minerale, einen einfallenden Lichtstrahl in zwei polarisierte Lichtstrahlen zu zerlegen, die verschieden stark gebrochen werden. Durch diese Doppelbrechung erscheint ein durch einen Calcitkristall beobachtetes Objekt doppelt. Calcitvorkommen findet man auf Island, in den USA, in Mexiko und auch in Deutschland (im Sauerland, im Harz und im Erzgebirge). Aus dem Isländischen Doppelspat werden so genannte Nicol'sche Prismen für optische Geräte (Polarisationsapparate) angefertigt. Die gewöhnlichen Erscheinungsformen des Calciumcarbonats in der Natur sind Kalkstein, Kreide und Marmor.

Kalkstein ist überwiegend durch Ton verunreinigt und feinkristallin, während Marmor sehr rein und grobkristallin ist. Kreide hat sich aus Schalentrümmern von Einzellern gebildet<sup>[24, 25, 43]</sup>.



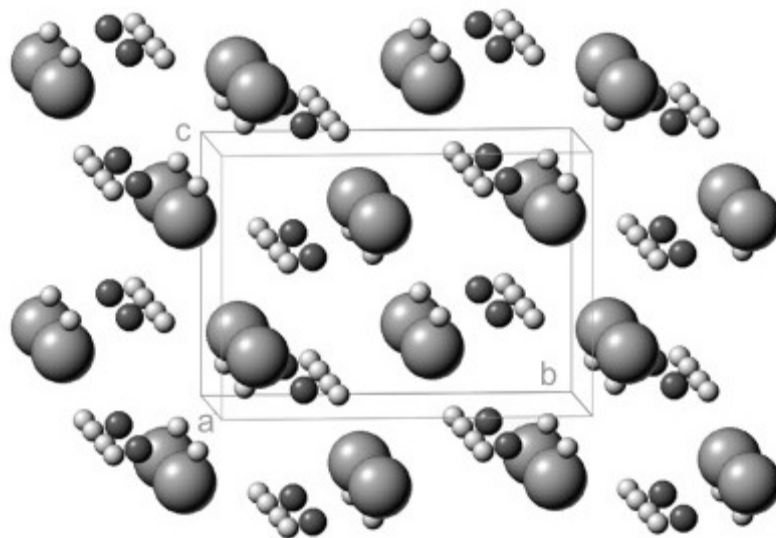
**Abbildung 1:** Kristallstruktur von Calcit; Calcium – blau, Kohlenstoff – weiß, Sauerstoff – rot <sup>[44]</sup>.

### 2.1.2.2 Aragonit

Aragonit (der Name leitet sich vom bedeutendsten Vorkommen des Minerals in Aragonien ab) kommt vermehrt in marinen Gewässern vor. Die Ursache hierfür ist das im Meerwasser enthaltene Magnesium, das die Bildung von Aragonit gegenüber Calcit begünstigt <sup>[43]</sup>. Aragonit kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe *Pmcn* (Elementarzelle siehe Abbildung 2).

Trockener Aragonit ist bei Raumtemperatur über einen unbestimmten Zeitraum stabil. Dagegen wandelt er sich in Lösung langsam in Calcit um, dessen Morphologie bei der Umwandlung von Aragonit abhängig von den Bedingungen ist. Findet die Transformation in Lösung statt, so liegen rhomboedrische Kristalle vor, während der Calcit weiterhin die nadelförmige Struktur des Aragonits aufweist, wenn die Umwandlung durch Erhitzen erfolgt <sup>[38, 45]</sup>. Die Aragonit-Calcit-Transformation ist irreversibel und findet

nicht bei einer bestimmten Temperatur statt. Beim Erhitzen auf 400 °C dauert die Umwandlung zu Calcit ungefähr drei Stunden, während es bei 470 °C nur wenige Minuten dauert <sup>[38]</sup>; der gesamte Umwandlungsbereich liegt zwischen 387 °C und 488 °C <sup>[46]</sup>. Geologisch mineralisierter Aragonit tendiert nicht dazu, sich zwischen 10 und 90 °C umzuwandeln, während sich synthetisch hergestellter Aragonit in Lösung nahe 90 °C in Calcit umwandelt <sup>[47]</sup>. Die von Wolf et al. ermittelte thermodynamische Gleichgewichtstemperatur  $T_{tr}$  zum Calcit liegt bei  $455 \pm 10$  °C. Die molare Phasenumwandlungsenthalpie  $\Delta_{tr}H$  weist bei  $T_{tr}$  mit  $403 \pm 8$  J mol<sup>-1</sup> einen niedrigen endothermen Wert auf <sup>[47]</sup>. Zhou et al. untersuchten die Synthese von CaCO<sub>3</sub> bei unterschiedlichen Temperaturen und Synthesebedingungen (Lösungszusätze und Keimkristalle) und kamen zu dem Ergebnis, dass die Aragonitbildung sowohl im Bereich von 50-90 °C als auch durch Magnesium-Ionen begünstigt wird <sup>[45]</sup>.



**Abbildung 2:** Kristallstruktur von Aragonit mit Elementarzelle; Calciumatome – grau, Kohlenstoffatome – schwarz, Sauerstoffatome –hellgrau <sup>[48]</sup>.

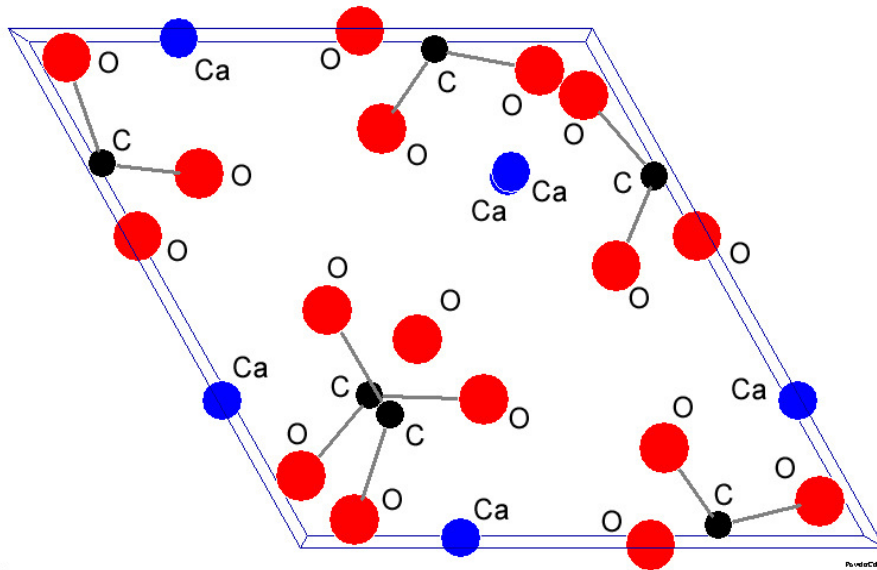


### 2.1.2.3 Vaterit

Vaterit (benannt nach dem deutschen Chemiker und Mineralogen Heinrich Vater) ist die instabilste wasserfreie kristalline Form des  $\text{CaCO}_3$ . Er kristallisiert in der hexagonalen Raumgruppe  $P6_3/mmc$ . Das Calcium ist von 8 O-Atomen umgeben, davon sechs in einem durchschnittlichen Abstand von  $2,4 \text{ \AA}$  und zwei in einem Abstand von  $2,9 \text{ \AA}$  <sup>[49]</sup>. Im Vergleich zu Calcit und Aragonit kommt Vaterit in der Natur nur selten vor <sup>[50]</sup>. Er ist im trockenen Zustand über einen langen Zeitraum stabil. In Kontakt mit Wasser wandelt er sich dagegen aufgrund von Auflösung und anschließender Rekristallisation in Calcit um. Von daher ist es schwierig, Vaterit aus wässrigen Lösungen zu erhalten. Die Phasenumwandlungstemperatur  $T_{\text{tr}}$  zu Calcit ist abhängig von den jeweiligen Synthesebedingungen und liegt im Bereich von  $320\text{-}460 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die zugehörige Phasenumwandlungsenthalpie ist mit  $-3,1 \pm 0,1 \text{ kJ mol}^{-1}$  deutlich exotherm <sup>[47]</sup>.

### 2.1.2.4 Monohydrocalcit

Das Calciumcarbonat-Monohydrat (Monohydrocalcit, MHC)  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kristallisiert in den beiden trigonalen Raumgruppen  $P3_121$  oder  $P3_221$ . Das Calcium ist von 8 Sauerstoffatomen umgeben, wobei der durchschnittliche Ca-O-Abstand zu den Sauerstoffatomen der Carbonatgruppe  $2,448 \text{ \AA}$  und der Ca-O-Abstand zu den zwei benachbarten Wassermolekülen  $2,49 \text{ \AA}$  beträgt. Der Koordinationspolyeder ist als verzerrtes tetragonales Antiprisma beschreibbar <sup>[51]</sup>. Der durch Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS: *extended x-ray absorption fine structure*) ermittelte Wert von  $2,42 \text{ \AA}$  für den Ca-O-Abstand stimmt gut mit den oben genannten Werten aus Einkristallstrukturanalysen überein <sup>[52]</sup>. Die Elementarzelle ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3:** Elementarzelle von Monohydrocalcit in der ab-Ebene <sup>[53]</sup>.

Krauss et al. erhielten Monohydrocalcit durch Abbau des Hexahydrates. Er geht innerhalb weniger Stunden in Calcit über, beim Befeuchten mit Wasser sofort. Eine Rückbildung zum Hexahydrat war nicht zu beobachten <sup>[54]</sup>.

In Gegenwart von Additiven, wie Calgon<sup>®</sup> und  $Mg^{2+}$ -Ionen, konnte er im Temperaturbereich von 0-40 °C hergestellt werden <sup>[39]</sup>. Da sich ein Ca:Mg-Verhältnis, das dem im Meerwasser entspricht, als günstig für die Entstehung von Monohydrocalcit erwies <sup>[55]</sup>, wurden spätere Synthesen in künstlichem Meerwasser durchgeführt <sup>[32, 56]</sup>.

Das erste natürliche Vorkommen von Monohydrocalcit wurde 1959 und 1964 als ein unreines Sediment im Issyk Kul See in Kirgisien beschrieben <sup>[57, 58]</sup>. Danach wurde er unter anderem im Sedimentgestein des Lake Kivu in Ostafrika <sup>[59]</sup> und im Solar Lake (Sinai) gefunden <sup>[60]</sup>. Erster mariner Fundort war der Ikka Fjord in Grönland, wo auch schon der Ikait erstmals in der Natur entdeckt wurde. Geochemische Daten weisen darauf hin, dass MHC eine Übergangsphase im Rekristallisierungsprozess von Ikait zu Calcit ist und somit MHC immer dort entstehen kann wo auch Ikait vorkommt <sup>[28]</sup>. In Lebewesen kommt es in Blasensteinen von Meerschweinchen <sup>[61]</sup> und in den Gehörsteinchen einiger Wirbeltiere vor <sup>[62]</sup>.

Dejehet et al. <sup>[63]</sup> untersuchten die genauen Bedingungen der Bildung von MHC in künstlichem Meerwasser. Sie kamen zu dem Schluss, dass ein hohes Mg:Ca-Verhältnis ( $\geq 1$ ) und ein hoher pH-Wert bei der MHC-Bildung entscheidend sind. Die Kristallwasserabgabe findet bei 213-215 °C statt, der maximale Mg-Gehalt liegt bei 12-13 Gew.-%.

Thermochemische Untersuchungen führten zu dem Ergebnis, dass MHC metastabil ist und sich bei Normalbedingungen allmählich in Calcit oder Aragonit umwandelt. Eine Temperaturerniedrigung und eine Erhöhung des hydrostatischen Druckes stabilisieren es <sup>[64]</sup>.

Die Löslichkeit von MHC in Wasser im Temperaturbereich von 10-50 °C kann mit folgender Gleichung berechnet werden <sup>[32]</sup>:

$$\text{pK}_L = -\log(\text{K}_L/\text{M}^2) = 7,05 + 0,000159 (T \text{ } ^\circ\text{C}^{-1})^2 \quad [3]$$

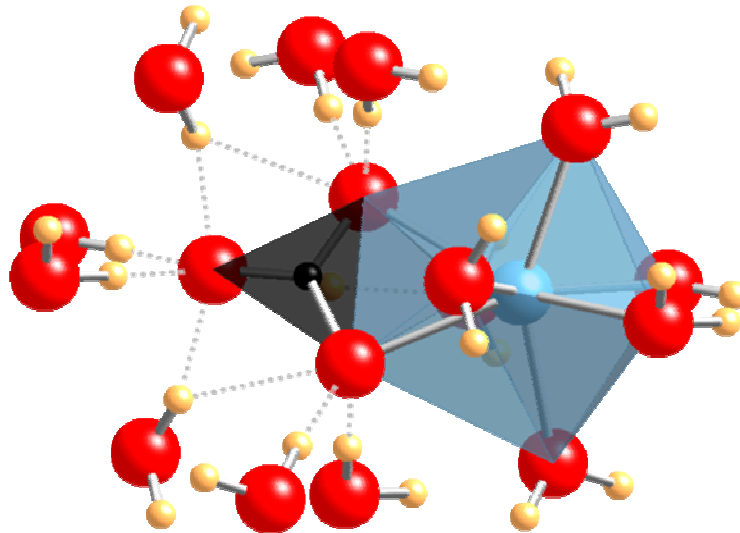
mit:  $\text{M} : \text{mol l}^{-1}$

$T$  : Temperatur in °C

### 2.1.2.5 Ikait

Das Mineral Ikait, Calciumcarbonathexahydrat  $\text{CaCO}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ , kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe  $C2/c$  (Struktur siehe Abbildung 4). Die Struktur enthält diskrete  $\text{CaCO}_3$ -Ionenpaare, die jeweils von einer Hülle aus 18 Wassermolekülen umgeben sind. Die Calcium-Ionen sind von acht Sauerstoffatomen koordiniert, von denen sechs vom Wasser und zwei von einem Carbonat-Anion stammen. Acht Wassermoleküle sind durch Wasserstoffbrückenbindungen zu den Sauerstoffatomen des  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ions gebunden; die restlichen vier Wassermoleküle sind an benachbarte Ionenpaare und zu anderen Wassermolekülen der Hülle gebunden. Der durchschnittliche Ca-O-Abstand liegt bei 2,469 Å, der C-O-Abstand in der planaren

Carbonatgruppe beträgt 1,286 Å und die O-H-Abstände in den Wassermolekülen betragen 0,73-0,83 Å. Es wird angenommen, dass die Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im Ikait die Koordination von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in wässriger Lösung widerspiegelt <sup>[29, 65, 66]</sup>.



**Abbildung 4:** Kristallstruktur von Ikait; Das Calcium-Ion (blau) ist von acht Sauerstoffatomen (rot), wovon sechs vom Wasser und zwei vom Carbonat (Kohlenstoff schwarz) stammen, koordiniert. Es existieren Wasserstoffbrückenbindungen (gestrichelte Linien) zwischen den H-Atomen (gelb) der Wassermoleküle und den Sauerstoffatomen des Carbonats <sup>[67]</sup>.

Ikait wurde in der Natur erstmals 1963 in Form von bis zu 20 Meter hohen Säulen am Ikka Fjord (Abbildung 5) auf Grönland entdeckt. Der Fundort verlieh dem Mineral auch seinen Namen. Die dort herrschende Temperatur betrug 3-7 °C <sup>[68]</sup>. Weitere spätere Fundorte des Minerals, an denen überall eine Wassertemperatur von 3 °C oder geringer herrschte, waren unter anderem Bransfield Strait, eine antarktische Halbinsel <sup>[69]</sup>, Shiowakka in Japan <sup>[70]</sup> und der Mono Lake in Kalifornien, der der erste nicht-marine Fundort von Ikait war <sup>[71, 72]</sup>. Erstmals entdeckten Dieckmann et al. 2008 Ikait im Eis der Antarktis <sup>[28]</sup>. In Shiowakka bildet der Ikait sich in den Wintermonaten und zersetzt sich wieder mit ansteigender Lufttemperatur zu Calcit. Von daher wird

angenommen, dass Ikait an vielen noch unentdeckten Orten vorkommt, es aber aufgrund seiner Unbeständigkeit schwierig ist, ihn zu entdecken.



**Abbildung 5:** Ikaitssäule am Ikka Fjord <sup>[73]</sup>.

Im Labor wurden schon im 19. Jahrhundert die ersten Versuche von Daniell, Becquerel und Pelouze unternommen, das Hexahydrat herzustellen, was ihnen jedoch zunächst nicht gelang <sup>[74-77]</sup>. 1865 war Pelouze dann aber erfolgreich und konnte durch Einleiten von CO<sub>2</sub> in eine wässrige CaO/Zucker-Lösung das Hexahydrat herstellen <sup>[78]</sup>. Bütschli präparierte Ikait aus dem Blut und den Schalen von Krustentieren <sup>[79]</sup>.

MacKenzie wiederholte die Versuche von Daniell und Pelouze bei unterschiedlichen Temperaturen und stellte fest, dass sich das Hexahydrat im Bereich von 0-15 °C bildete. Er fand zudem heraus, dass bei 5 °C eine Umwandlung des Ikait zu Calcit erfolgt, die auch bei erneuter Temperaturerniedrigung nicht mehr aufgehoben werden kann. Die Dichte des Ikait wurde von ihm mit 1,777 g cm<sup>-1</sup> bei 3 °C bestimmt <sup>[80]</sup>.

Krauss et al. stellten das Hexahydrat durch Zugabe einer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in eine eisgekühlte CaCl<sub>2</sub>-Lösung her. Sie untersuchten ferner die Zersetzung und

kamen zu dem Ergebnis, dass es sich bei 8 °C an der Luft oder in der Mutterlauge zu Calcit zersetzt. Führt man die Entwässerung unter ständigem Absaugen des Wassers durch, so entsteht als Zwischenstufe das Calciumcarbonat-Monohydrat, das erst bei 200 °C entwässert wird <sup>[54]</sup>.

Brooks et al. kamen bei ihren Untersuchungen zum Einfluss von Calgon<sup>®</sup> auf die Calciumcarbonatkristallisation zu dem Schluss, dass sich unter vermehrtem Einsatz von Calgon<sup>®</sup> umso mehr Ikait gebildet hat. Dabei hat sich Ikait nie aus einer klaren Lösung gebildet; er scheint das Produkt der Kristallisation von amorphem oder gel-ähnlichem CaCO<sub>3</sub> zu sein. Das in Gegenwart von Calgon<sup>®</sup> entstandene Hexahydrat bleibt in Kontakt mit Wasser länger stabil als das in Gegenwart von Magnesiumionen hergestellte, das sich innerhalb eines Tages zersetzt <sup>[39]</sup>.

Ikait ist bei Atmosphärendruck über 0 °C instabil, bei Drücken von 6-7 kbar ist er auch bei Raumtemperatur stabil <sup>[81]</sup>. Seine Bildung wird von Magnesium, das in Meerwasser reichlich enthalten ist, und von anderen Additiven, wie z. B. Calgon<sup>®</sup>, eine Mischung aus Polymetaphosphaten und Polyphosphaten, begünstigt <sup>[38, 39, 77, 82]</sup>.



Da die Reaktion von einer Volumenabnahme von ungefähr 20 % begleitet ist, scheint die Bildung von Ikait bei erhöhtem Druck begünstigt. Tatsächlich bildet sich Ikait bei 5-6 kbar auf Kosten von Calcit und Aragonit <sup>[10, 38, 77, 82]</sup>. Löslichkeitsbestimmungen zeigen, dass Ikait im Vergleich zu Aragonit und Calcit löslicher ist und seine Löslichkeit im Gegensatz zu den wasserfreien Polymorphen mit sinkender Temperatur abnimmt.

Die Löslichkeit von Ikait in Abhängigkeit von der Temperatur im Bereich von 0-25 °C kann nach folgender Gleichung bestimmt werden <sup>[11]</sup>:

$$pK_L = -\log(K_L/M^2) = -0,15981 + 2011,1/(T \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}) \quad [5]$$

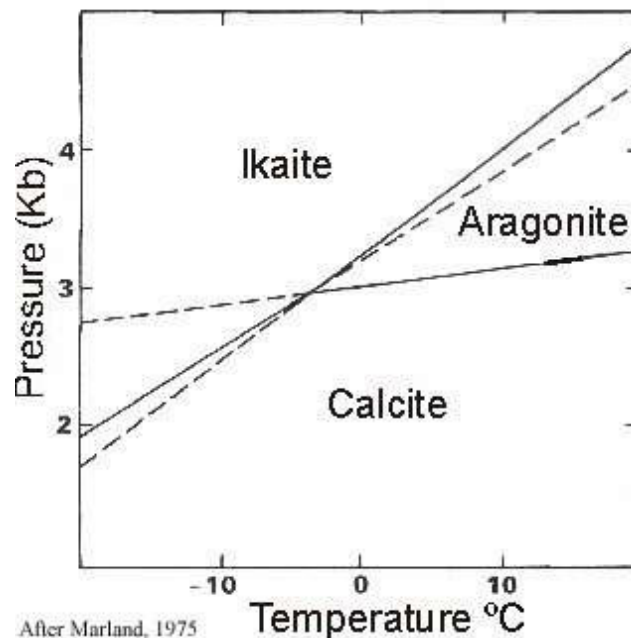
mit:  $M$  : mol l<sup>-1</sup>

$T$  : Temperatur in °K

Ito beschäftigte sich mit Ikait aus nicht-marinen Lagerstätten. Er stellte fest, dass er sich, im Gegensatz zu marinen Fundstellen <sup>[83, 84]</sup>, in Vaterit und nicht in Aragonit umwandelte <sup>[70, 85, 86]</sup>. Die Ursache hierfür ist, dass die im Meerwasser enthaltenen Mg<sup>2+</sup>-Ionen die Aragonitbildung begünstigen.

Weiter untersuchte er den Einfluss von Feuchtigkeit, Zermahlen, Temperatur und von der Magnesiumionen-Konzentration auf die Umwandlung des natürlichen Ikait <sup>[70]</sup>. Feuchtigkeit führt zu einer schnelleren Transformation zu Calcit. Das Zermahlen führte zu einer Abgabe des Kristallwassers, wodurch neben Calcit auch eine beträchtliche Menge an Vaterit entstand. Daraus folgerte er, dass eine schnelle Zersetzung bei Raumtemperatur zu Vaterit führt. Es zeigte sich, dass in kochendem Wasser Vaterit als Hauptphase neben Aragonit, aber kaum Calcit entstanden ist. Aufgrund seiner Versuche zur Umwandlung in Abhängigkeit von der Mg<sup>2+</sup>-Ionen-Konzentration wird vermutet, dass die Geschwindigkeit der Umwandlung von Ikait in Gegenwart von Magnesium reduziert wird; das Produkt dabei ist Aragonit. Auch bei synthetisch hergestelltem Ikait konnte Vaterit als Intermediat bei der Umwandlung zu Calcit identifiziert werden <sup>[12]</sup>. Während Marland eine Umwandlung zu Calcit bei niedrigeren Druck-Temperatur-Bedingungen (3-4,1 kbar, -3 bis 14,5 °C) beobachtete, konnten Shahar et al. bei höheren Drücken (9,6-20,3 kbar) und Temperaturen (65-110 °C) eine Umwandlung zu Aragonit feststellen <sup>[87]</sup>. In

Abbildung 6 ist in einem Phasendiagramm der Stabilitätsbereich von Ikaite dargestellt.



**Abbildung 6:** Phasendiagramm von Ikaite und der beiden wasserfreien Phasen Calcit und Aragonit <sup>[12]</sup>.

### 2.1.2.6 Amorphes Calciumcarbonat (ACC)

Nach der Ostwald'schen Stufenregel <sup>[88]</sup>, die besagt, dass zuerst die instabilste Phase einer Substanz entsteht und diese sich dann in eine stabilere Form umwandelt, bildet sich bei der Calciumcarbonatkristallisation immer zuerst amorphes Calciumcarbonat (ACC). Als ACC werden Modifikationen von Calciumcarbonat bezeichnet, die weder diskrete Röntgen- noch Elektronenbeugungsreflexe liefern.

ACC wurde erstmals von Johnston et al. <sup>[38]</sup> durch Mischen konzentrierter Lösungen von Calciumchlorid und Natriumcarbonat hergestellt und wurde als nichtkristallin beschrieben. Später wurde eine Methode gefunden, wodurch beim Einleiten von CO<sub>2</sub> in eine gesättigte Ca(OH)<sub>2</sub>-Lösung zunächst amorphes Calciumcarbonat entsteht, das dann weiter zu Calcit kristallisiert <sup>[89]</sup>. In Gegenwart organischer Substanzen wie Aminen, Aminosäuren und



Carbonsäuren wandelt sich dieses ACC dagegen in Vaterit um; dabei sind Ethylendiamin und Natriumaspartat die besten Additive für die Vateritbildung<sup>[90]</sup>. Niedrige Fällungstemperaturen stabilisieren die amorphe Phase, während ein Temperaturanstieg zu einer schnellen Kristallisation führt<sup>[91]</sup>. Ebenfalls vorteilhaft zur Stabilisierung von ACC ist eine stark alkalische Mutterlösung<sup>[92]</sup> oder die Verwendung geeigneter Additive bei der Fällung, wozu vor allem Magnesium<sup>[93,94]</sup>, Phosphat<sup>[95]</sup> und eine Reihe organischer Substanzen<sup>[96,97]</sup> gehören. Es wurde gezeigt, dass die Umwandlung von ACC in wässriger Lösung abhängig von der Temperatur ist. So bildeten sich im Bereich von 14-30 °C innerhalb von 3-6 Stunden Vaterit und Calcit, während von 60-80 °C in 17-22 Stunden Aragonit und Calcit entstanden sind. Im dazwischen liegenden Temperaturbereich (40-50 °C) haben sich alle drei kristallinen wasserfreien Phasen gebildet<sup>[98]</sup>. Koga et al.<sup>[99]</sup> untersuchten die Kristallisation von ACC in Abhängigkeit des pH-Wertes, der bei der Herstellung des ACC eingestellt wurde. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass die Kristallisationstemperatur mit abnehmendem pH-Wert ebenfalls sinkt, begleitet von einer Abnahme der Enthalpie und Aktivierungsenergie. Der Grund hierfür ist vermutlich, dass die Ordnung im ACC mit abnehmendem pH-Wert steigt. EXAFS-Untersuchungen zum Einfluss von Additiven auf die Struktur von ACC führten zu dem Ergebnis, dass ACC in Abhängigkeit vom Additiv eine jeweils unterschiedliche Nahordnung besitzt. So hat ACC, das in Gegenwart von Magnesium gefällt wurde, eine dem Monohydrocalcit ähnliche Nahordnung, während ACC in Gegenwart von Polyasparaginsäure anfänglich eine dem Vaterit ähnliche Nahordnung aufweist, die sich nach wenigen Tagen in eine Calcit-ähnliche Struktur umwandelt<sup>[100]</sup>.

Die Löslichkeit von ACC kann nach folgender Gleichung in Abhängigkeit von der Temperatur berechnet werden <sup>[26]</sup>:

$$pK_L = -\log(K_L/M^2) = 6,1987 + 0,005336 \cdot (T \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}) + 0,0001096 \cdot (T \text{ } ^\circ\text{C}^{-1})^2 \quad [6]$$

mit:  $M$  : mol l<sup>-1</sup>

$T$  : Temperatur in °C

ACC enthält bis zu einem Molekül H<sub>2</sub>O pro Carbonat-Ion. Dies wurde sowohl mittels TG-Analysen als auch IR-Spektroskopie bestätigt <sup>[9, 26, 33, 101]</sup>. Ein bei Raumtemperatur durch Hydrolyse von Dimethylcarbonat in Calciumchlorid-Lösung hergestelltes ACC verliert sein Strukturwasser bei 149 °C <sup>[101]</sup>; das nach der Methode von Günther et al. synthetisierte ACC gibt sein Strukturwasser zwischen 100 und 250 °C ab. Wird das Wasser, das die amorphe Phase stabilisiert, komplett entfernt, so findet eine Kristallisation zu Calcit statt <sup>[9]</sup>. ACC kann zudem durch einen steigenden Magnesiumgehalt stabilisiert werden, da dadurch seine Löslichkeit abnimmt <sup>[93, 94, 102, 103]</sup>. Die Kristallisation von ACC kann auch durch organische Zusätze bei der Fällung verhindert werden <sup>[96, 104-107]</sup>.

Li et al. <sup>[108]</sup> haben eine Methode entwickelt, bei der ausgehend von ACC dreidimensional-geordnete, makroporöse Calcit-Einkristalle hergestellt wurden. Die Methode basiert auf der Strategie, dass ACC als Precursor der kristallinen Calciumcarbonate fungiert und zusätzlich die kolloidalen Kristalle als Templat dienen. Die so hergestellten Calcit-Einkristalle weisen eine erwartete Nanostruktur und Morphologie auf.

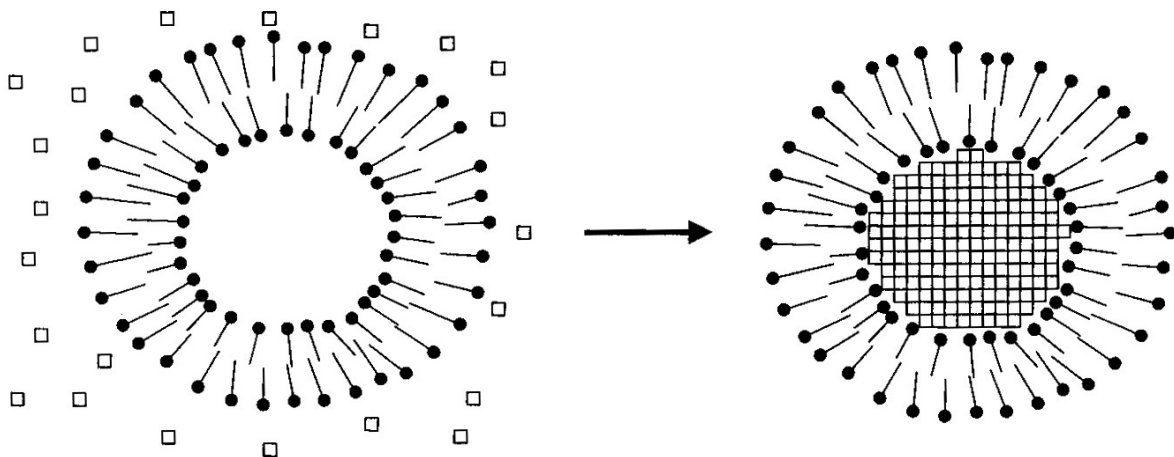
### 2.1.3 Calciumcarbonat und Biomineralisation

Die Biomineralisation befasst sich mit der Bildung anorganischer Mineralien (meist schwerlösliche Salze) in der belebten Natur. Dabei findet ein Wechselspiel zwischen anorganischem Material und organischer Matrix statt, wodurch die Biomineralien oft sowohl hart als auch elastisch sind. 55 Stämme des biologischen Stammbaums produzieren Biomineralien, in 26 davon kommen Carbonate vor. Insgesamt wurden ungefähr 60 verschiedene Mineralien in Organismen gefunden, von denen 80 % kristallin und 20 % amorph sind. Biomineralien kommen in einem bestimmten Organismus stets in der gleichen kristallinen Phase und Morphologie vor und werden vor allem zum Schutz vor Feinden (Schalen von Schnecken und Muscheln), als Werkzeug (Zähne), zur Orientierung (Schwerkraftsensoren) und zur internen Stabilisierung (Skelette) verwendet <sup>[27, 109]</sup>.

Wie oben erwähnt, sind in Biomineralien auch organische Makromoleküle enthalten, wobei zwischen den unlöslichen und löslichen Makromolekülen unterschieden wird. Bei den löslichen Makromolekülen handelt es sich meist um acide Glycoproteine, die einen hohen Anteil an Glutaminsäure und/oder Asparaginsäure enthalten. Diese aciden Proteine sind aktiv an der Mineralbildung beteiligt. Diese können unter der Voraussetzung, dass sie in der  $\beta$ -Faltblattstruktur vorliegen, spezifisch mit bestimmten Kristallflächen wechselwirken. Dies ist die Ursache dafür, dass die biogenen Mineralien im Vergleich zum reinen anorganischen Mineral oft eine andere Morphologie aufweisen. Die unlöslichen Makromoleküle sind von Organismus zu Organismus sehr verschieden. Es wird angenommen, dass ihre Hauptfunktion darin besteht, die mechanischen Eigenschaften des Biominerals zu optimieren. So lagern sich z. B. geringe Mengen organischer Matrix im Kristall ein und verursachen dadurch ein anderes Bruchverhalten im Vergleich zum reinen Mineral, indem sie die Rissausbreitung entlang kritischer Netzebenen verhindern. Die Mineralisation findet meistens in abgegrenzten Bereichen statt,

den so genannten Kompartimenten. Sie bestehen unter anderem aus einer Lipid-Doppelschicht oder aus wasserunlöslichen Makromolekülen. In diese Kompartimente werden die Ionen hineingepumpt, wo sie mit den organischen Makromolekülen wechselwirken und sich die entsprechenden Mineralien bilden. Der wahrscheinlichste Grund für das Ende des Kristallwachstums ist die fehlende Versorgung der Mineralisationsstelle mit Ionen. Die Kristallisation in Kompartimenten führt dazu, dass die Kristalle andere Morphologien aufweisen als bei einer üblichen Kristallisation (Abbildung 7). Sowohl die thermodynamischen als auch die kinetischen Bedingungen, die für Mineralienbildung aus gesättigten Lösungen gelten, treffen auch auf die Mineralisation in Kompartimenten zu <sup>[27, 109]</sup>.

Neben Calciumcarbonaten sind Calciumphosphate (mineralisierte Teil des Skelettes von Wirbeltieren) und amorphes Siliziumdioxid (in Pflanzen) die am häufigsten vorkommenden Biominerale.

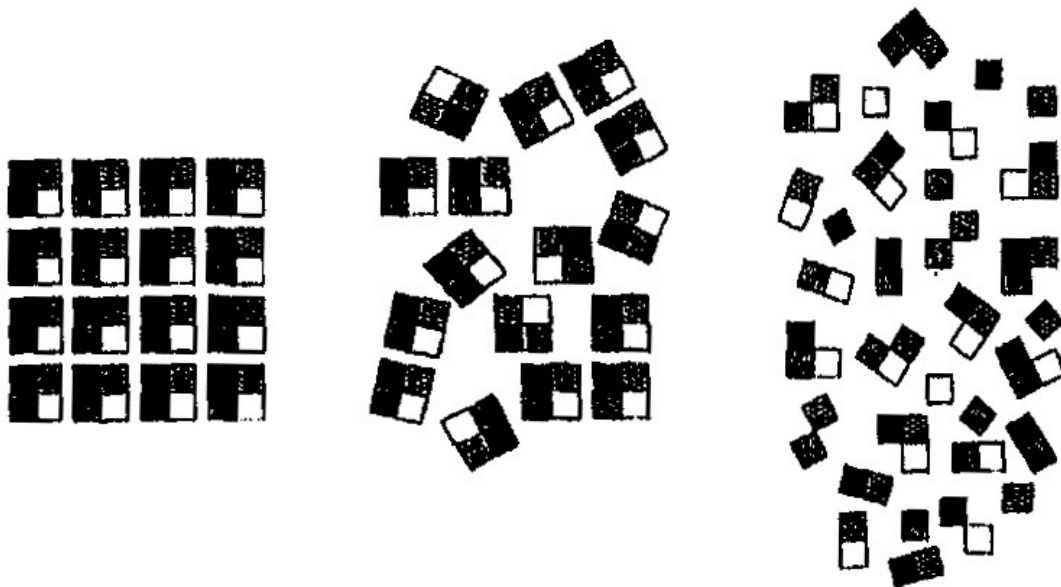


**Abbildung 7:** Schematische Darstellung der Kristallisation in Kompartimenten. Die Kristallisation im Inneren des kugelförmigen Vesikels führt zu einem annähernd kugelförmigen Kristall, der ansonsten eine andere Form annehmen würde <sup>[27]</sup>.

Im Folgenden wird genauer auf die Rolle des ACC in der Biomineralisation eingegangen. Trotz seiner Instabilität kommt ACC häufig in Biomineralien vor, wobei es mehrere Aufgaben erfüllt. Zum einen dient es als Precursor-Phase für die kristallinen  $\text{CaCO}_3$ -Polymorphe, zum anderen fungiert es als Speicherphase für Calcium-Ionen, und in stabiler Form dient es vor allem mechanischen Zwecken. Alle bekannten biogenen ACC-Phasen enthalten Magnesium und in vielen Fällen auch Phosphat, die beide zur Stabilisierung des ACC beitragen<sup>[110, 111]</sup>. Die ACC-Precursor-Strategie ist bei den wirbellosen Tieren weit verbreitet. So bestehen die Nadeln der Seeigelarten *Strongylocentrotus purpuratus*<sup>[7]</sup> und *Paracentrotus lividus*<sup>[1]</sup> im Larvenstadium aus ACC, das dann mit der Zeit zu Calcit kristallisiert. Ein weiteres Beispiel ist die Schale der Schnecke *Biomphalaria glabatra*; auch hier dient ACC, das bereits eine Nahordnung aufweist, die dem Aragonit ähnelt, als Vorläufer-Phase für das aus Aragonit bestehende Schneckenhaus<sup>[112, 113]</sup>. Die Funktion von ACC als Speicherphase findet man vor allem bei Krustentieren aber auch in Pflanzen. So speichert die Assel *Porcellio scaber* bei der Häutung das Calciumcarbonat in Form von ACC am Bauch in so genannten sternalen Ablagerungen für die spätere Neubildung der Haut. Das ACC in den Lagerstätten weist eine Nahordnung auf, die dem Vaterit oder Monohydrocalcit ähnlich ist<sup>[3, 4]</sup>. Hier spielt vor allem die bessere Löslichkeit des ACC im Vergleich zu den kristallinen Modifikationen eine entscheidende Rolle, da es somit bei der Neubildung der Haut besser transportiert werden kann. Pflanzen der Sorte *Ficus retusa* haben in ihren Blättern so genannte Cystolithe. Der mineralisierte Teil dieser intrazellulären Körper besteht aus ACC, das sich bei Feuchtigkeit rasch in Calcit umwandelt. Die Nahordnung dieses ACC ähnelt der Struktur des Calciumcarbonat-Monohydrats<sup>[8]</sup>. In den Stacheln der Seescheide *Pyura pachydermatina* liegt das ACC in stabilisierter Form vor. EXAFS-Untersuchungen haben ergeben, dass sich seine Nahordnung am besten an Monohydrocalcit anpassen lässt<sup>[114]</sup>.

Aus den vorangegangenen Beispielen wird deutlich, dass die biogenen ACC-Phasen sich in ihrer Nahordnung unterscheiden und somit ACC strukturell gesehen nicht eine Mineralphase, sondern eine Familie verwandter Phasen darstellt<sup>[5,6]</sup>. Die Nahordnung, die mittels Röntgenabsorptionsspektroskopie (EXAFS) untersucht werden kann, ähnelt der kristallinen Phase, in die sich das ACC umwandelt. Mit EXAFS kann ein Bereich von ungefähr 0,5 nm Entfernung von einem Zentralatom erfasst werden. Da mit Röntgenbeugung oder Elektronenbeugung dieser Bereich nicht mehr untersucht werden kann, ist EXAFS eine geeignete Methode, um die Struktur amorpher Substanzen zu analysieren<sup>[2]</sup>. Das Konzept von amorpher Struktur, Nahordnung und Fernordnung ist in Abbildung 8 dargestellt.

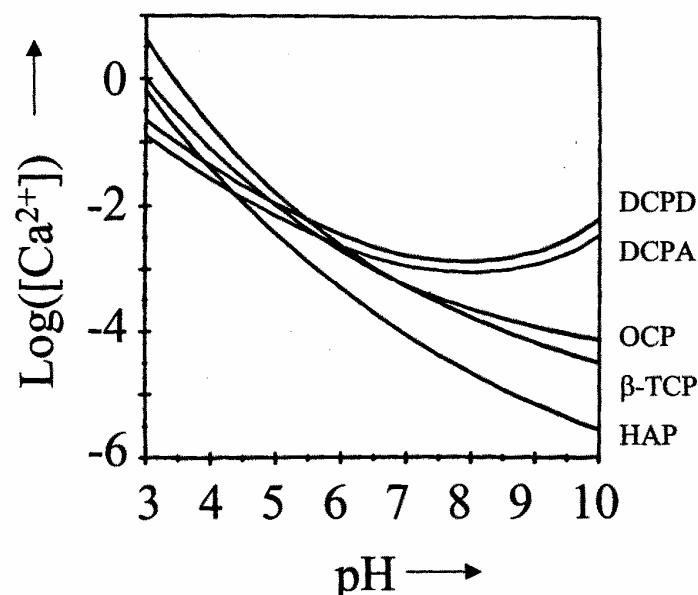
Zudem unterscheiden sich die biogenen ACC-Phasen in ihrem Wassergehalt. Transientes ACC enthält wenig oder kein Strukturwasser, während stabiles ACC, das in den meisten Fällen die Stöchiometrie  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  aufweist, Strukturwasser enthält. Daher wird angenommen, dass Wasser zur Stabilisierung des ACC beiträgt und eine Kristallisation verhindert<sup>[6]</sup>.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Fernordnung (links), der Nahordnung (Mitte) und des amorphen Zustandes (rechts). Es ist zu sehen, dass mit abnehmender Ordnung das Volumen zunimmt<sup>[2]</sup>.

## 2.2 Calciumphosphate

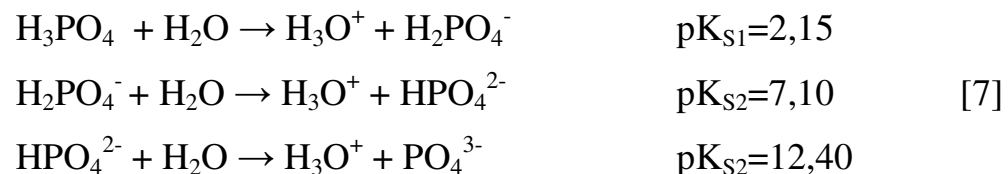
Calciumphosphate sind überwiegend schwer wasserlöslich, jedoch sind alle gut säurelöslich. Die Löslichkeit von Calciumphosphaten ist abhängig vom pH-Wert (siehe Abbildung 9). Sie mit Hilfe der Löslichkeitsprodukte zu vergleichen ist sehr schwierig, da die einzelnen Calciumphosphat-Phasen eine unterschiedliche Stöchiometrie aufweisen. Zudem muss bedacht werden, dass im Löslichkeitsprodukt die Konzentration an Phosphat eingeht, diese jedoch in Wirklichkeit aufgrund des Gleichgewichts mit Hydrogenphosphat und Dihydrogenphosphat kleiner ist. Es wird zwischen den Ortho- ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), Pyro- ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) und Polyphosphaten ( $(\text{PO}_3)_n^{n-}$ ) unterschieden <sup>[25, 115, 116]</sup>. Diese sind alle weiße Festkörper, wobei die natürlich vorkommenden Calciumphosphate oftmals aufgrund des Einbaus von Fremdionen gefärbt sind. So ergibt z. B.  $\text{Ni}^{2+}$  grüne Ni-Apatite. Calciumphosphatminerale, z. B. Phosphorit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , sind wichtige Ausgangsstoffe zur Herstellung von Phosphatdüngemitteln wie Calciumdihydrogenphosphat  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$ .



**Abbildung 9:** Löslichkeit unterschiedlicher Calciumphosphat-Phasen in Abhängigkeit vom pH-Wert; aufgetragen ist der Logarithmus der Gesamt-Calciumkonzentration in Lösung gegen den pH-Wert bei 25 °C, äquimolarem Ca:PO<sub>4</sub>-Verhältnis und einer Ionenstärke von 0,1 mol L<sup>-1</sup> <sup>[27]</sup>.

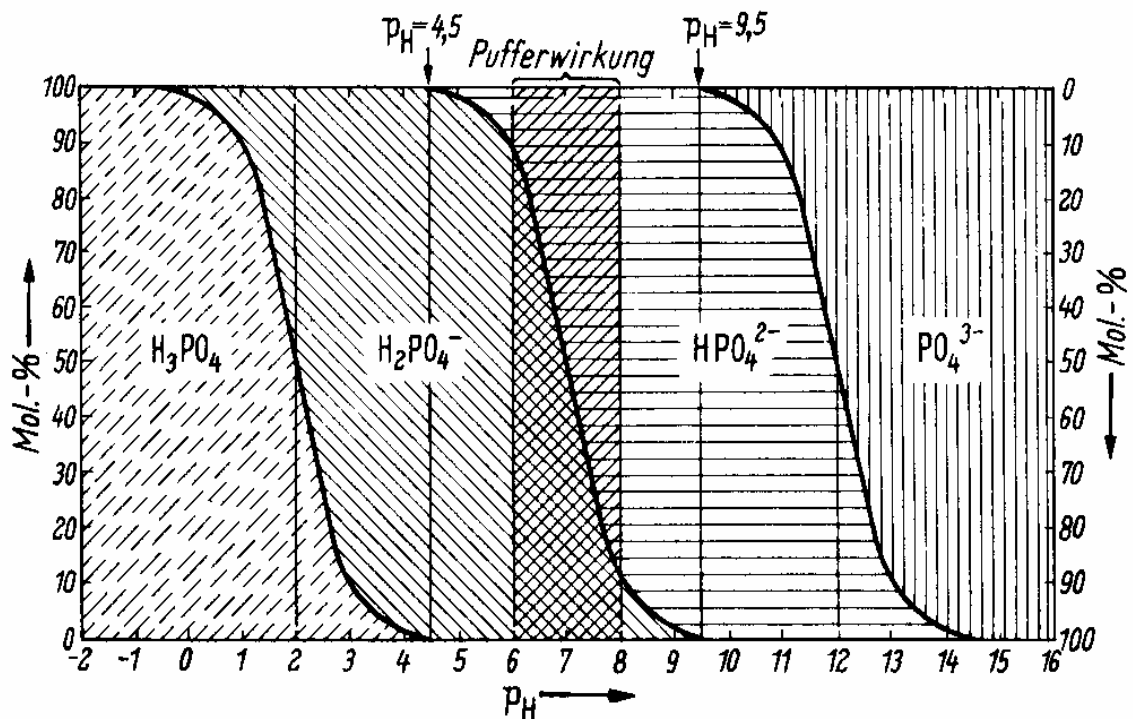
### 2.2.1 Das Orthophosphat-System

Die Orthophosphate leiten sich von der Orthophosphorsäure  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (meist einfach Phosphorsäure genannt) ab, die eine mittelstarke, dreiprotonige Säure ist und somit drei Reihen von Salzen bilden kann. Die  $\text{pK}_s$ -Werte der einzelnen Dissoziationsstufen bei 25 °C sind <sup>[24]</sup>:



Die Dihydrogenphosphate  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  (primäre Phosphate) sind alle wasserlöslich, während die Hydrogenphosphate  $\text{HPO}_4^{2-}$  (sekundäre Phosphate) und die (Ortho)phosphate (tertiäre Phosphate)  $\text{PO}_4^{3-}$  sich nur im Fall von Alkalimetallen als Gegenion in Wasser lösen. Aus den  $\text{pK}_s$ -Werten und Abbildung 10 wird ersichtlich, dass sich Calciumsalze mit  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -Ionen nur im sauren Milieu bilden können. Dagegen bilden sich die Salze mit den Ionen  $\text{HPO}_4^{2-}$  und  $\text{PO}_4^{3-}$ , die auch in der Mineralphase von Knochen und Zähnen vorkommen, im neutralen oder basischen Medium. Zudem ist zu erkennen, dass wässrige Lösungen von Phosphorsäure mittelstark sauer, von Dihydrogenphosphaten schwach sauer, von Hydrogenphosphaten basisch und von Orthophosphaten stark basisch reagieren <sup>[24, 115]</sup>. Da alle diese Anionen der Orthophosphorsäure eine Verbindung mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen eingehen können, entsteht eine Vielzahl bekannter Calciumphosphat-Phasen. Eine Übersicht der verschiedenen Calciumorthophosphate gibt Tabelle 4.





**Abbildung 10:** Abhängigkeit der Ionenkonzentration vom pH-Wert in einer Phosphorsäure/Phosphat-Lösung <sup>[25]</sup>.

**Tabelle 4:** Übersicht der unterschiedlichen Calciumphosphat-Phasen <sup>[27]</sup>.

Verbindung	Formel	Ca:P- Verhältnis	Raum- gruppe	Dichte [g cm <sup>-3</sup> ]
<b>Monocalciumphosphat -Anhydrat (MCPA)</b>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	0,5	triklin <i>P1</i>	2,58
<b>Monocalciumphosphat -Monohydrat (MCPM)</b>	Ca(H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )·H <sub>2</sub> O	0,5	triklin <i>P1</i>	2,23
<b>Dicalciumphosphat- Anhydrat (DCPA)</b>	CaHPO <sub>4</sub>	1,0	triklin <i>P1</i>	2,89
<b>Dicalciumphosphat- Dihydrat (DCPD)</b>	CaHPO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	1,0	monoklin <i>Ia</i>	2,32
<b>Octacalciumphosphat (OCP)</b>	Ca <sub>8</sub> (HPO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> ·5 H <sub>2</sub> O	1,33	triklin <i>P1</i>	2,61
<b>α-Tricalciumphosphat (α-TCP)</b>	α-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,5	monoklin <i>P2<sub>1</sub>/a</i>	2,86
<b>β-Tricalciumphosphat (β-TCP)</b>	β-Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	1,5	rhomboe- drisch <i>R3ch</i>	3,07
<b>Hydroxylapatit (HAP)</b>	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1,67	monoklin <i>P2<sub>1</sub>/b</i> oder hexagonal <i>P6<sub>3</sub>/m</i>	3,16
<b>Carbonatapatit A-Typ</b>	Ca <sub>10+x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH/CO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	-	-
<b>Carbonatapatit B-Typ</b>	Ca <sub>10-x</sub> (PO <sub>4</sub> /CO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	-	-	-
<b>Amorphes Calciumphosphat (ACP)</b>	Ca <sub>x</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>y</sub> ·x H <sub>2</sub> O	1,2-2,5	-	-

Im Folgenden wird genauer auf einige Calciumphosphate eingegangen: Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit, DCPD), Dicalciumphosphat-Anhydrat (Monetit, DCPA), Hydroxylapatit (HAP), Carbonatapatit (CHAP) und Tricalciumphosphat (TCP).

### **Brushit (DCPD) und Monetit (DCPA)**

Dicalciumphosphat-Dihydrat (Brushit, DCPD) kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe *Ia* und hat eine plättchenförmige Morphologie. Es besteht aus  $\text{CaPO}_4$ -Ketten, die parallel zueinander angeordnet sind und zwischen denen die Kristallwassermoleküle eingelagert sind<sup>[117]</sup>. Das Calcium-Ion ist von acht Sauerstoffatomen umgeben, sechs stammen aus Phosphatmolekülen und zwei aus Kristallwassermolekülen. Es kommt oftmals in pathologischen Verkalkungen (z. B. Zahnstein, Blasensteine) vor. Es kann aus wässriger, leicht saurer (pH-Wert 4-5) oder neutraler Lösung ausgefällt werden<sup>[118]</sup>. Während das Erhitzen auf über 80 °C unter Kristallwasserabgabe zur Bildung von wasserfreiem Dicalciumphosphat (Monetit, DCPA) führt, bildet sich beim Erhitzen auf 320-340 °C das Pyrophosphat  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ <sup>[119]</sup>. In einem langsam ablaufenden Auflösungs-Rekristallisationsvorgang führt die Hydrolyse von DCPD zunächst zu OCP, das sich dann weiter zu einem nichtstöchiometrischen Hydroxylapatit umwandelt. Es findet somit keine Festkörper-Umwandlung statt. DCPD wird neben OCP als mögliche Vorstufe bei der HAP-Fällung postuliert. In *in vivo* Studien zur Knochenbildung konnte es bisher noch nicht nachgewiesen werden; es wurde jedoch in pathologischen Calcifizierungen gefunden. Da DCPD eine gute Biokompatibilität, Osteokonduktivität und Bioresorbierbarkeit besitzt, wird es oft als Komponente in Calciumphosphat-Zementen eingesetzt<sup>[17, 115, 120]</sup>.

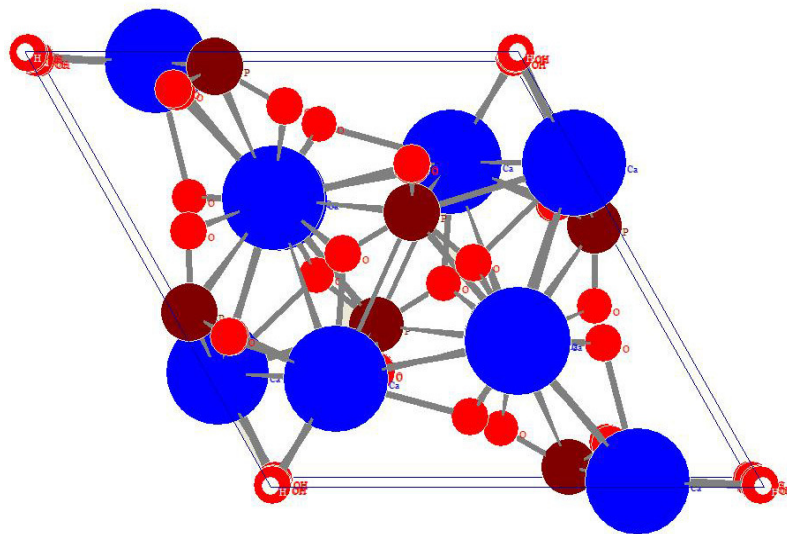
DCPA kristallisiert in der triklinen Raumgruppe *P1*. Es bildet sich bei den gleichen Fällungsbedingungen wie DCPD oberhalb von 80 °C und findet aufgrund seiner Biokompatibilität ebenfalls Anwendung als Biomaterial. Analog

zum DCPD wandelt es sich unter physiologischen Bedingungen in einen Calcium-defizitären HAP um <sup>[17, 115, 120]</sup>.

### **Hydroxylapatit (HAP) und Carbonatapatit (CHAP)**

Thermodynamisch gesehen ist HAP oberhalb eines pH-Werts von 4,5 die stabilste Calciumphosphat-Phase. Reiner, defektfreier Hydroxylapatit ist das am schlechtesten lösliche Calciumorthophosphat. Er kristallisiert in zwei Raumgruppen <sup>[121]</sup>. Die Hochtemperaturmodifikation kristallisiert in der monoklinen Raumgruppe  $P2_1/b$ . Dagegen kristallisiert in Lösung synthetisierter HAP, isomorph zum Fluorapatit, in hexagonaler Form (Raumgruppe  $P6_3/m$ ; Elementarzelle siehe Abbildung 11). Er kann durch Reaktion von wässrigen Calcium- und Phosphatlösungen hergestellt werden. Es ist auch möglich, HAP in Ethanol aus Calciumethanolat und Phosphorsäure zu synthetisieren <sup>[122]</sup>. Aus stark übersättigten Lösungen bei einem pH-Wert über 7 fällt kinetisch kontrolliert als Vorstufe zunächst amorphes Calciumphosphat (ACP) <sup>[123, 124]</sup>, in manchen Fällen auch Octacalciumphosphat aus <sup>[125, 126]</sup>. Posner et al. haben aus ihren Untersuchungen für ACP die Summenformel  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$  abgeleitet <sup>[13, 127]</sup>. In Wasser wandeln sich diese Phasen in den thermodynamisch stabileren, nichtstöchiometrischen, Calcium-defizitären Hydroxylapatit ((CDHA)  $\text{Ca}_{5-x}(\text{HPO}_4)_{2x}(\text{PO}_4)_{3-2x}\text{OH}$ ) um. Mit der Zeit nähert sich seine Stöchiometrie der von defektfreiem HAP an. Dagegen fällt aus Lösungen niedriger Übersättigung sofort HAP aus <sup>[15, 128]</sup>. Da CDHA auch Hydrogenphosphat-Ionen enthält, ist das molare Ca:P-Verhältnis kleiner als 1,67. Es steigt jedoch mit dem Alter des Niederschlags an. Das amorphe Calciumphosphat entsteht bei einer Fällung im pH-Wert-Bereich von 6,6-10,6 und kann in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$  oder  $\text{CO}_3^{2-}$  stabilisiert werden <sup>[129]</sup>. Mittels EXAFS-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei pH=10 gefälltes ACP schon eine dem HAP ähnliche Nahordnung hat. Die ersten drei Koordinationssphären um das Calcium im ACP sind mit denen des HAPs nahezu identisch. Die Umwandlung findet durch die

Ausbildung einer Fernordnung statt, d. h. die lokale Umgebung des Calciums wird nicht verändert. Erste Anzeichen einer Umwandlung im EXAFS-Spektrum zum kristallinen HAP sind nach 22 Stunden zu erkennen, danach ändert sich das EXAFS-Spektrum nicht mehr nennenswert<sup>[130, 131]</sup>. Eine Festkörper-NMR-Studie an nanokristallinem HAP, wie er auch im Knochen vorkommt, kam zu dem Ergebnis, dass diese Nanokristalle aus einem kristallinen Kern und einer ungeordneten, weniger kristallinen Schicht bestehen. Der Kern besteht aus HAP, während die an  $\text{HPO}_4^{2-}$ -Ionen und an Wasser reiche Oberfläche in der Zusammensetzung dem OCP ähnelt. Die Dicke dieser Schicht, die sich grundlegend vom nanokristallinem HAP im Kern unterscheidet, wurde mit 1 nm bestimmt<sup>[132]</sup>.



**Abbildung 11:** Elementarzelle von Hydroxylapatit in der hexagonalen Form; Calcium: blau, Phosphor: braun, Sauerstoff: rot<sup>[53]</sup>.

Das Calcium kann im Hydroxylapatit durch eine Reihe anderer Metallionen, z. B. Natrium, Kalium, Strontium und Magnesium, ersetzt werden. Die Hydroxylgruppe kann ebenfalls durch eine Vielzahl an Ionen substituiert werden, dazu gehören vor allem Halogene ( $\text{F}^-$  und  $\text{Cl}^-$ ). Zudem spielt Carbonat ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) eine wichtige Rolle bei der Substitution im Hydroxylapatit und führt zu zwei Arten von Carbonatapatit. Aus IR-Daten wurde geschlossen, dass die

planare Carbonat-Gruppe die Phosphat-Gruppe im Hydroxylapatit (B-Typ) <sup>[133]</sup>, der bei Fällung oder Hydrolyse in wässriger Lösung entsteht, substituiert. Dagegen ersetzt das Carbonat bei der trockenen Synthese bei hoher Temperatur (ca. 1000 °C) die Hydroxyl-Ionen (A-Typ). Die beiden Typen lassen sich durch IR-Spektroskopie unterscheiden <sup>[134, 135]</sup>. Carbonat baut sich sehr leicht in das HAP-Gitter ein. Man erhält sowohl bei der Fällung in carbonathaltigem Wasser als auch bei der Synthese ohne Schutzgas meist einen Apatit mit ungefähr einem Gew.-% Carbonat.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Pulverdiffraktometrie und der IR-Spektroskopie konnten EXAFS-Untersuchungen an carbonathaltigen HAP-Phasen während der Substitution von Phosphat mit Carbonat deutliche strukturelle Änderungen im HAP-Gitter aufzeigen. Die direkte Sauerstoffumgebung des Calcium ist nicht betroffen, erste Änderungen treten in einem Bereich nach 0,3 nm Abstand vom zentralen  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion auf <sup>[130]</sup>.

Ca-defizitärer HAP (CDHA) ist thermisch instabiler als stöchiometrischer HAP. Im Gegensatz zum defektfreien HAP entsteht beim Erhitzen auf 400-600 °C, aufgrund der im CDHA enthaltenen Hydrogenphosphat-Ionen, Pyrophosphat  $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ . Bei 800 °C findet eine Dehydratation statt und es bildet sich  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  <sup>[15, 136, 137]</sup>. Dies ist neben IR-Spektren ein weiterer Beweis dafür, dass CDHA Hydrogenphosphat enthält.

Eine Reihe biochemischer Substanzen verlangsamen oder inhibieren die HAP-Fällung bzw. die Umwandlung des ACP zu HAP. Magnesium in ausreichend hohen Konzentrationen (Mg:Ca-Molverhältnis größer als 0,2:1) verhindert ebenfalls die Apatitbildung <sup>[138]</sup>. Die nichtstöchiometrische Zusammensetzung der meisten gefällten und auch biologisch vorkommenden Hydroxylapatite und deren kleine Kristallgröße haben zur Folge, dass diese im Vergleich zu stöchiometrischem, gut kristallinem HAP eine bessere Löslichkeit besitzen <sup>[15]</sup>.

HAP ist aufgrund seiner chemischen und strukturellen Ähnlichkeit zu Knochen und seiner Biokompatibilität eines der bedeutendsten Knochenersatzmaterialien. Ein Nachteil ist jedoch, aufgrund seiner hochkristallinen Struktur, die schlechte Resorbierbarkeit. Neben der Anwendung als Knochenersatzmaterial findet er Anwendung zur Beschichtung metallischer Implantate (z. B. Endoprothesen), da somit eine gute Haftung zwischen Knochen und Implantat gewährleistet wird <sup>[17]</sup>.

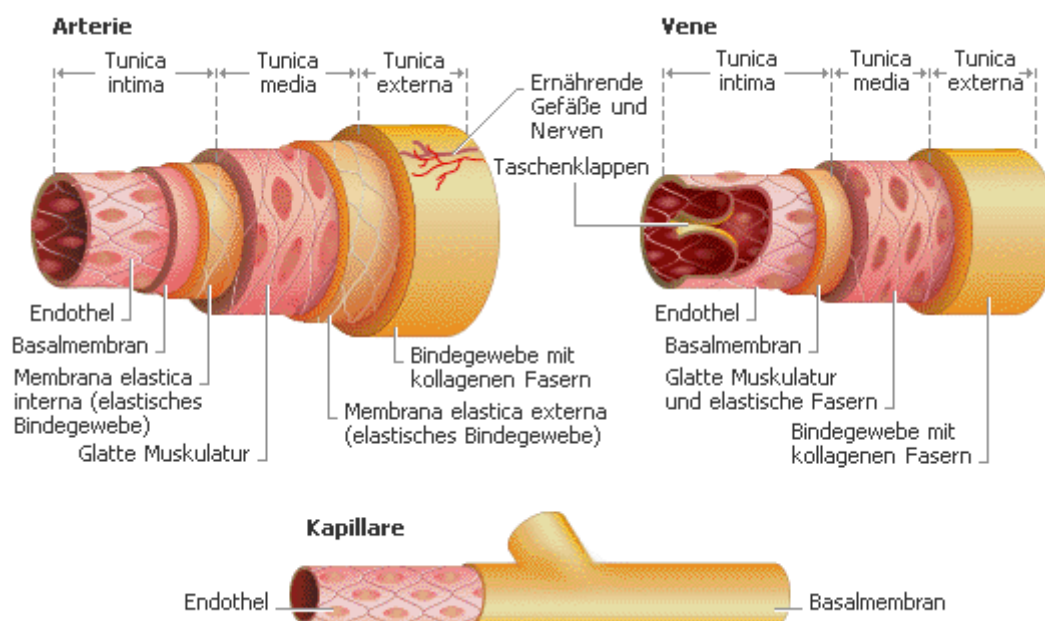
### **Tricalciumphosphat (TCP)**

Tricalciumphosphat hat die stöchiometrische Zusammensetzung  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  und ist formal das „echte“ Calciumphosphat. Es existieren zwei Phasen von TCP, nämlich  $\alpha$ -TCP (Hochtemperaturphase) und  $\beta$ -TCP.  $\beta$ -TCP kann nicht aus Lösung gefällt werden. Es kann nur durch Calcinieren von z. B. calciumdefizitärem HAP oberhalb von 800 °C oder durch kontrolliertes Erhitzen von ACP hergestellt werden.  $\beta$ -Tricalciumphosphat weist eine gute Biokompatibilität und Bioresorbierbarkeit auf. Es findet daher häufig Anwendung als Kompositmaterial in Knochenzementen (siehe Kapitel 2.4.3) und in Form von so genanntem biphasischen Calciumphosphat (BCP), eine Mischung aus  $\beta$ -TCP und HAP <sup>[17, 115]</sup>.

Oberhalb von 1125 °C wandelt es sich in  $\alpha$ -TCP um. Aufgrund der geringeren Stabilität bei Raumtemperatur hat  $\alpha$ -TCP eine höhere Löslichkeit im Vergleich zu  $\beta$ -TCP (siehe Tabelle 4). In wässriger Lösung findet eine schnelle Umwandlung von  $\alpha$ -TCP zu CDHA statt.  $\alpha$ -TCP wird ebenso wie  $\beta$ -TCP in Knochenzementen genutzt <sup>[17, 115]</sup>.

### 2.3 Arteriosklerose und glatte Muskelzellen

Die meisten pathologischen Verkalkungen, z. B. Arteriosklerose (wörtlich: bindegewebige Verhärtung der Schlagadern), Blasensteine<sup>[139]</sup> und Zahnstein<sup>[140]</sup>, basieren auf der Kristallisation von Calciumphosphaten an nicht erwünschten Stellen im Körper. Unsere Blutgefäße sind aus drei Schichten aufgebaut (Abbildung 12): einer Innenschicht (Tunica intima), einer Mittelschicht (Tunica media) und einer Außenschicht (Tunica externa).

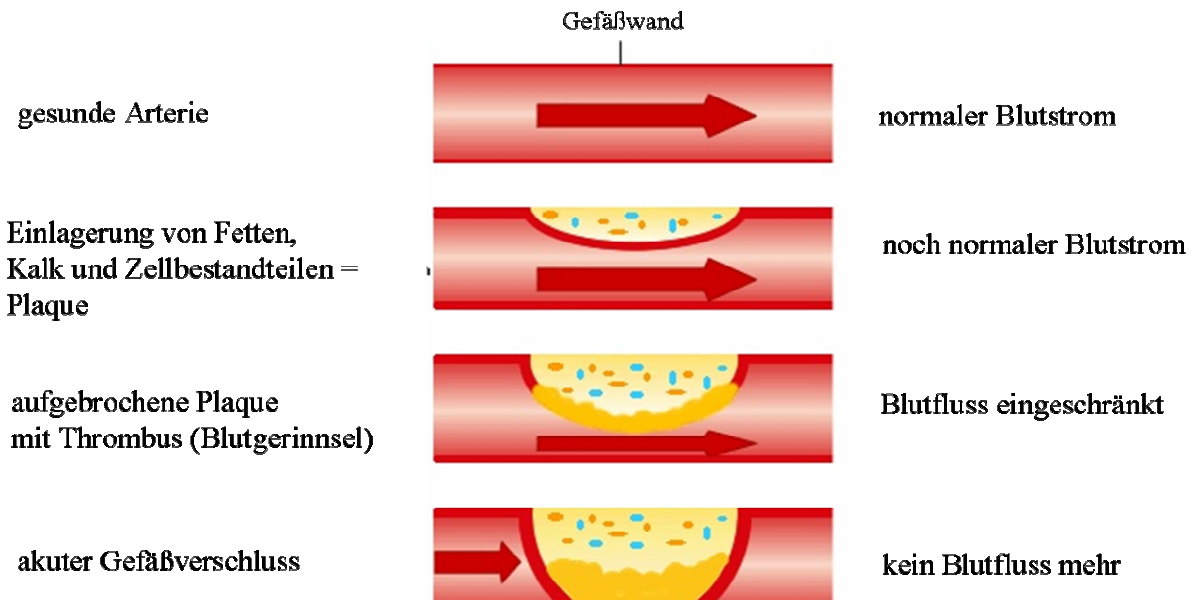


**Abbildung 12:** Schematischer Aufbau der Blutgefäße<sup>[141]</sup>.

Die Innenschicht ist der eigentliche Ort, an dem die Arteriosklerose stattfindet. Wird das Endothel (eine dünne Haut über der Intima), das die Gefäßwand zu einem bestimmten Grad vom Blutfluss abschirmt, beschädigt, dann können Blutbestandteile wie rote und weiße Blutkörperchen sowie Blutplättchen (Thrombozyten) in die Schichten eindringen und sich dort ablagern. Daran können sich weitere Fett- oder Schadstoffsubstanzen anlagern, wodurch die so genannten Plaques (Ablagerungen) wachsen. Durch diese Ablagerungen an der Gefäßwand (Abbildung 13) wird der Blutfluss und somit die Sauerstoffversorgung gehemmt. Die Plaques können sich lösen und vom Blut an



eine andere Stelle transportiert werden, wo sie dann ebenfalls zu einer Gefäßverengung führen (z. B. Lungenembolie) <sup>[22]</sup>.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Entstehung von Ablagerungen (Plaques) bei einer Arteriosklerose <sup>[142]</sup>.

Die verminderte Sauerstoffversorgung von Geweben und die Verengung der Blutgefäße können zu einem Herzinfarkt, der weltweit nach wie vor die häufigste Todesursache ist, führen. Daneben sind Schlaganfall (weltweit die dritthäufigste Todesursache), Niereninsuffizienz, arterielle Verschlusskrankheit der Beine (pAVK) und Angina Pectoris weitere häufig auftretende Folgeerkrankungen einer Arteriosklerose <sup>[22]</sup>.

Es wird zwischen den unbeeinflussbaren (Alter, Geschlecht, Rasse, genetische Veranlagung) und den beeinflussbaren (z. B. Bewegungsmangel, Übergewicht, Bluthochdruck, Diabetes mellitus, Rauchen, hoher Cholesterinspiegel) Risikofaktoren unterschieden. Die Arteriosklerose unterliegt einer schleichenden Entwicklung, d. h. dass sie anfänglich weder Schmerzen noch Beschwerden verursacht. Zu den möglichen Therapien gehört als allererstes ein gesunder Lebensstil. Zusätzlich kommen bei schwereren Fällen blutverdünnende, blutdruck- und blutzuckersenkende Medikamente zum Einsatz. Ist die

Verengung der Arterie stark fortgeschritten, werden Stents oder Bypässe implantiert <sup>[22]</sup>.

Die arteriosklerotischen Plaques bestehen zu 20-30 % aus Lipiden, der Rest (ca. 70 %) ist anorganisches Material, das vor allem Calcium, Phosphat, kleinere Mengen an Carbonat und Spuren an Magnesium, Natrium, Hydroxid, Fluorid und Chlorid enthält. Es konnte gezeigt werden, dass die Calciumphosphat-Phase der des Knochens ähnelt und es sich somit um nanokristallinen Carbonatapatit (der Carbonatgehalt ist in den arteriosklerotischen Ablagerungen höher als im Knochen) handelt. Im Unterschied zu Knochen variieren die Nanokristalle sowohl in ihrer Form als auch in ihrer Größe, was darauf schließen lässt, dass das Ausmaß der Kristallisationskontrolle nicht so ausgeprägt ist wie bei der Knochenbildung <sup>[21, 143, 144]</sup>. Eine Untersuchung von arteriosklerotischen Plaques mehrerer Patienten mit sehr unterschiedlichen Krankheitsursachen kam zu dem Ergebnis, dass das Calciumphosphat in den Ablagerungen keine großen Unterschiede in der Zusammensetzung und Struktur aufweist; dies deutet auf einen gleichen Bildungsmechanismus von Gefäßverkalkungen hin <sup>[21]</sup>.

Der genaue Mechanismus der Mineralabscheidung in Blutgefäßen ist bis heute nicht vollständig geklärt. Da Blut bezüglich einer HAP-Abscheidung übersättigt ist (Löslichkeitsprodukt von HAP  $2,35 \cdot 10^{-59} \text{ M}^9$ , angenommenes Produkt im Blutserum  $9,6 \cdot 10^{-47} \text{ M}^9$ ) <sup>[145]</sup>, es aber nicht zu einer ständigen Ausfällung von HAP kommt, muss es geeignete Substanzen (z. B. Fetuin, Matrix-Gla Proteine) geben, die bei einem gesunden Menschen eine Mineralisation an unerwünschten Orten inhibieren <sup>[146, 147]</sup>. Demnach wäre die vaskuläre Verkalkung ein passiver Vorgang, ebenso wie die Knochenbildung.

Glatte Muskelzellen befinden sich in den Wänden der meisten Hohlorgane (z. B. Magen, Darm, Gallenblase, Harnblase) und in Blutgefäßen (im Endothel) des Menschen. Im Unterschied zur Skelettmuskulatur (quergestreiften Muskulatur) werden die Kontraktionen der glatten Muskulatur unwillkürlich über das vegetative Nervensystem ausgelöst und sind relativ langsam. Die Kontraktion

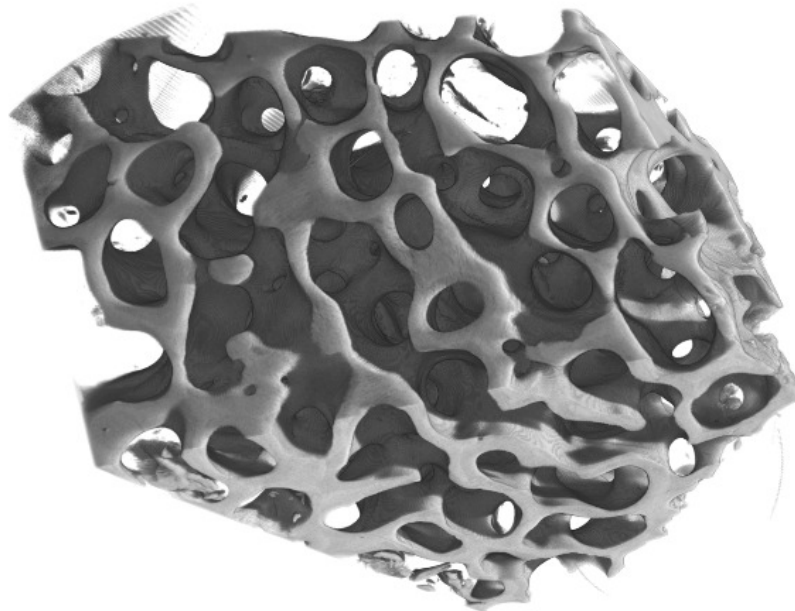
wird durch eine Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ausgelöst. Die glatte Muskulatur kann in einem Spannungszustand verbleiben, was z. B. zum Funktionieren von Venenklappen erforderlich ist. In den oben angeführten Organen reguliert sie zielgerichtet den Transport des jeweiligen Inhalts (Peristaltik im Magen, Blutdruckregulation in den Arterien). Das glatte Muskelgewebe besteht aus länglichen, vorwiegend spindelförmigen Zellen, deren Länge abhängig vom jeweiligen Organ ist (15-20  $\mu\text{m}$  in Blutgefäßen, bis zu 600  $\mu\text{m}$  in der Gebärmutter einer Schwangeren). Ihr Durchmesser liegt durchschnittlich bei 5-8  $\mu\text{m}$ , wobei auch hier der Grad der Kontraktion entscheidend ist (Zellen im kontrahierten Zustand sind dicker als Zellen im erschlafften Zustand). Es gibt Erkenntnisse, dass glatte Muskelzellen die Plaques bei einer Arteriosklerose vor dem Abreißen schützen. Zudem stabilisieren sie instabile, potentiell zum Tode führende Läsionen (Verletzungen) <sup>[22]</sup>.

Da die Effekte von Calciumphosphaten in Blutgefäßen bisher kaum verstanden sind, besteht ein Interesse daran, wie unter anderem glatte Muskelzellen auf die Kristalle reagieren. In vorherigen Untersuchungen mit BCP und Kristallen aus menschlichen Ablagerungen verursachten die Kristalle einen Zelltod in den glatten Muskelzellen. Wenn dies reproduzierbar ist, dann bedeutet es, dass die Calciumphosphat-Kristalle in Ablagerungen sehr schädlich sein können und in Abhängigkeit ihrer Größe zur Apoptose führen. Zudem konnte gezeigt werden, dass Makrophagen (Fresszellen), die in den Ablagerungen vorkommen, durch BCP so stimuliert werden, dass sie durch Ausschüttung von Zytokinen (zuckerhaltige Proteine) entzündungsfördernd wirken, wobei kleinere BCP-Partikel eine größere Auswirkung haben <sup>[148]</sup>.

## 2.4 Knochen

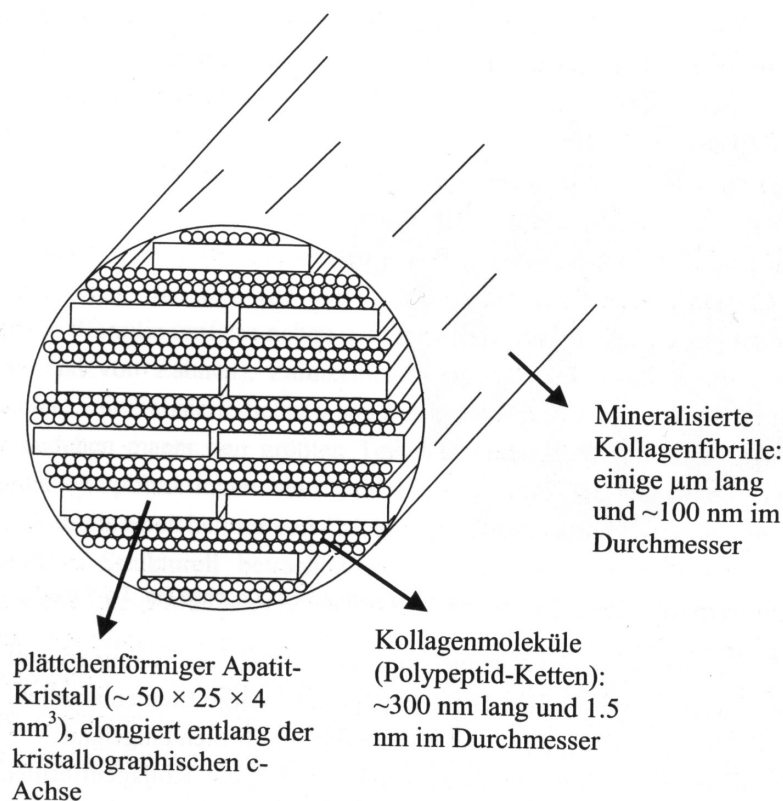
### 2.4.1 Aufbau von Knochen

Knochen ist ein Kompositmaterial bestehend aus einer anorganischen Mineralphase (Calciumphosphate ca. 60-70 %) und organischen Komponenten (ca. 30 %). Die organische Hauptphase von Knochen ist Typ-I-Kollagen (90 %), das die Elastizität des Knochens verursacht, während das HAP für die Härte zuständig ist. Der Rest der organischen Matrix besteht aus nicht-kollagenen Proteinen wie z. B. Osteocalcin und Osteonektin <sup>[15, 27, 136, 149, 150]</sup>. Knochen setzt sich aus zwei Bereichen zusammen. Die äußere dünne Schicht (Kortikalis oder kompakter Knochen, 80 % der Knochenmasse) umgibt einen porösen, schwammartigen Innenraum (Spongiosa, 20 % der Knochenmasse, siehe Abbildung 14), der mit Knochenmark gefüllt ist. Die Porosität spielt beim Stofftransport und für die Zugänglichkeit der Zellen eine wichtige Rolle. Umgeben ist der Knochen von der Knochenhaut, dem so genannten Periost.



**Abbildung 14:** spongiöser Knochen mittels Mikrocomputertomographie aufgenommen <sup>[27]</sup>.

Mikroskopisch betrachtet sind die mineralisierten Kollagenfasern (Fibrillen) die kleinsten Bausteine des Knochens; sie bestehen aus Kollagen-I-Molekülen und nichtstöchiometrischem Hydroxylapatit. Die Apatit-Kristalle sind plättchenförmig (ca. 2,5-5 nm dick) und parallel zur Längsachse der Kollagenfasern in den Fibrillen eingebaut (Abbildung 15).



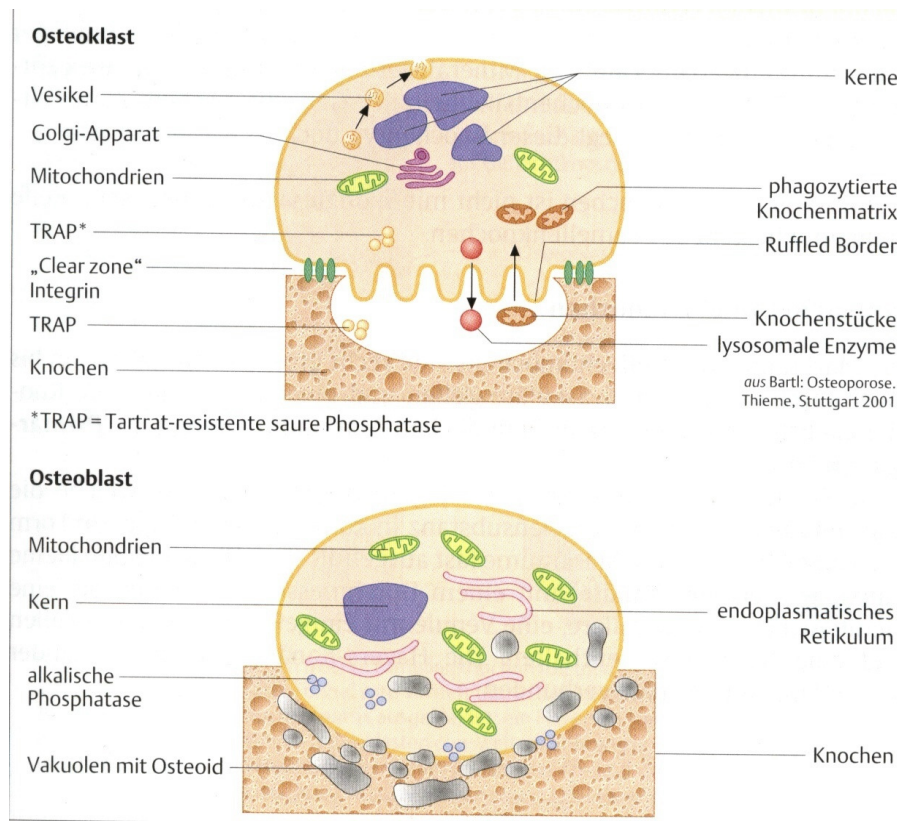
**Abbildung 15:** Schematische Darstellung einer Kollagenfibrille, die Kollagenmoleküle und HAP-Nanokristalle enthält <sup>[27]</sup>.

Betrachtet man die nächste Organisationsstufe des Knochens, so ist zu erkennen, dass sich die Kollagenfibrillen in dreidimensionalen Netzwerken anordnen, die sich je nach der Knochenart (Geflechtknochen oder Lamellenknochen) in ihrer Struktur und Ordnung unterscheiden, um den jeweils vorherrschenden Belastungen standzuhalten. Des Weiteren gelangt man zur Strukturierungsebene, die bereits im Millimeterbereich liegt; hierzu gehören die

für den Knochenaufbau und – abbau verantwortlichen Zellen, die Osteoblasten (Größe von etwa 20 µm) und Osteoklasten (Größe ca. 100 µm). Daneben existiert noch eine dritte Zellart im Knochen, die Osteozyten. Die Knochenzellen machen etwa 2 % der gesamten Knochenmasse aus <sup>[149]</sup>.

Die Osteoblasten, die durch Differenzierung aus Vorläuferzellen (mesenchymale Stammzellen) entstehen, sind für den Knochenaufbau verantwortlich und produzieren Kollagen und Calciumphosphat. Als Vorstufe bildet sich zunächst ein aus überwiegend Kollagen bestehendes unmineralisiertes Gewebe, das auch Osteoid genannt wird. In dessen Hohlräumen erfolgt dann unter Verdrängung des darin befindlichen Wassers die Mineralisierung durch Einlagerung des Calciumphosphats. Ist die Knochenbildung abgeschlossen, so wandeln sich 30-50 % der Osteoblasten, die nun von Knochen umgeben sind, in Osteozyten um, deren Aufgabe vermutlich die Regelung des Gleichgewichts zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau ist <sup>[149]</sup>. Knochen ist demnach einem ständigen Auf- und Abbauprozess (ca. alle 20 Jahre ist das menschliche Skelett komplett erneuert), auch „Remodelling“ genannt, ausgesetzt. Dabei baut die dritte im Knochen befindliche Zellart, die Osteoklasten, den Knochen ab. Dazu setzen sich die Osteoklasten an der Knochenoberfläche fest und bilden zwischen ihrer Unterseite und der Knochenoberfläche saure Kompartimente (pH-Wert um 4,5), die das Knochenmineral auflösen. Zusätzlich wird durch Ausscheidung spezieller Enzyme das Kollagen abgebaut, wodurch Resorptionslakunen (Abbildung 16) entstehen <sup>[19, 151, 152]</sup>. Ist dieses Gleichgewicht gestört, so kommt es zu vermehrtem Knochenabbau, was dann zur Osteoporose führt <sup>[149, 153]</sup>. Osteoporotischer Knochen enthält hauptsächlich älteres Mineral, das eine höhere Kristallinität aufweist. Das Gegenstück zur Osteoporose ist die Osteopetrose (Marmorknochenkrankheit), bei der es aufgrund einer Osteoklasteninsuffizienz zu verminderter Knochenresorption kommt und der Knochen dadurch in Folge einer Dichtezunahme an Elastizität verliert <sup>[19]</sup>. Die gesamten Vorgänge beim Knochenwachstum werden durch biochemische

Faktoren (Hormone, Wachstumsfaktoren, Vitamine) bestimmt. Wachstumsfaktoren wie z. B. die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) setzen die Differenzierung von Vorläuferzellen zu Osteoblasten in Gang und induzieren somit die Knochenbildung <sup>[149]</sup>.



**Abbildung 16:** Darstellung der am Knochenaufbau (Osteoblasten) und Knochenabbau (Osteoklasten) beteiligten Zellen <sup>[149]</sup>.

Die Knochenbildung und die Knochenresorption sind mit verschiedenen Markern korreliert. Marker der Knochenbildung sind das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) und das Protein Osteocalcin. Ein häufig angewandter Marker der Knochenresorption ist die Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) <sup>[149]</sup>. Diese Marker können mittels bestimmter Färbungen sichtbar gemacht werden und sind somit ein Nachweis für die Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität. Es gibt sowohl biologische als auch chemische Faktoren, die die Knochenmineralisierung beeinflussen. Zu den biologischen gehören das

Knochenwachstum, das Remodelling, das Altern und der Knochenumsatz. So führt ein schnelles Remodelling zu einer geringeren Dichte des Knochenminerals (Hypomineralisation), während Altern zu einer höheren Dichte (Hypermineralisation) führt. Chemische Faktoren sind z. B. Fluorid und Strontium, die in das Apatitgitter eingebaut werden. Fluorid stabilisiert das Apatitgitter und verringert somit die Löslichkeit des HAP, wodurch sich die Dichte des Minerals erhöht. Strontium hat einen gegensätzlichen Effekt, da es die Löslichkeit von HAP erhöht <sup>[154]</sup>.

#### 2.4.2 Zusammensetzung des Knochenminerals

Das anorganische Mineral des Knochens besteht aus nanokristallinem Hydroxylapatit (HAP), der wie alle biologischen Apatite Fremdionen enthält. Zu den wichtigsten Fremdionen gehören Magnesium, Natrium, Kalium, Fluorid, Chlorid und Carbonat. Daneben enthält das Knochenmineral noch Spurenelemente wie Barium, Kupfer, Eisen und Zink. Dies führt zu einem nichtstöchiometrischen, Calcium-defizitärem Hydroxylapatit, auch Dahllit genannt, mit der allgemeinen Summenformel  $\text{Ca}_{5-x}(\text{PO}_4)_{3-x}(\text{CO}_3)_x\text{OH}$  (Tabelle 5) <sup>[17]</sup>. Der Carbonatgehalt liegt bei ungefähr 4-6 Gew.-% <sup>[136, 149, 155]</sup>. Ein Großteil des Carbonats, das dem Knochenmineral eine höhere Reaktivität im Vergleich zu reinem HAP verleiht, befindet sich auf der Oberfläche <sup>[15]</sup>. Posner et al. nahmen ebenfalls an, dass das Carbonat im Knochenmineral anders eingelagert ist als in synthetischem HAP <sup>[127]</sup>. Die Kristalle sind plättchenförmig und unregelmäßig ausgebildet. Die durchschnittliche Kristallgröße steigt mit dem Alter an; unreifes (kindliches) Knochenmineral weist eine kleinere Kristallgröße auf und ist stärker Ca-defizitär als voll entwickeltes Knochenmineral <sup>[15]</sup>. Mit der Reifung werden die Knochenkristalle zwar weniger Ca-defizitär, erreichen aber nie die stöchiometrische HAP-Zusammensetzung <sup>[156]</sup>. Aufgrund der Nanokristallinität und des Carbonatgehalts ist das Knochenmineral besser löslich als kristalliner



stöchiometrischer Hydroxylapatit. Das Ca:P-Verhältnis, das mit steigendem Alter zunimmt (1,3 bis ca. 1,66), und die Kristallinität werden durch den Carbonatgehalt, der sich mit zunehmendem Alter erhöht, reguliert <sup>[154]</sup>.

**Tabelle 5:** Zusammensetzung menschlichen Knochenminerals <sup>[157]</sup>.

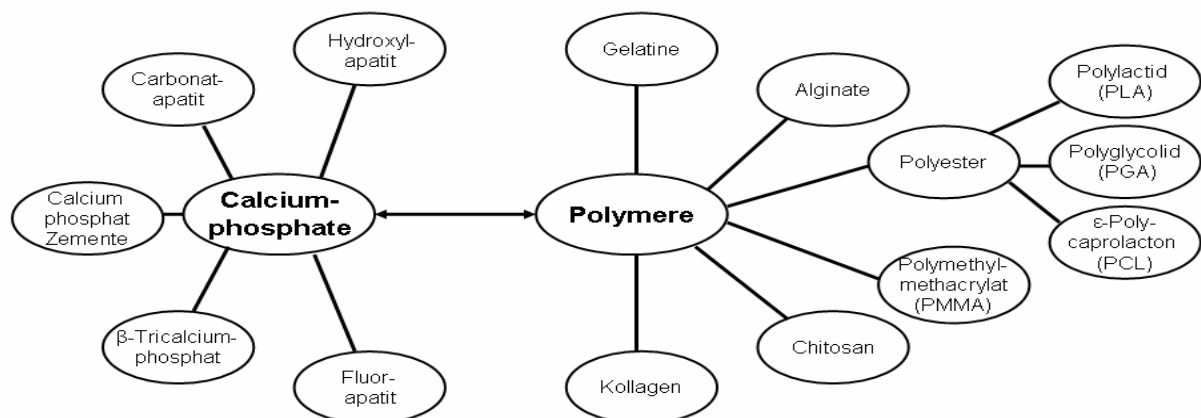
Bestandteil	Anteil in Gew.-%
Calcium	34,8
Phosphor	15,2
Natrium	0,9
Magnesium	0,72
Kalium	0,03
Carbonat	4-6
Fluorid	0,03
Chlorid	0,13

Es wird angenommen, dass sowohl amorphes Calciumphosphat (ACP) als auch DCPD als Vorstufe des Knochenminerals fungieren, jedoch konnte diese Annahme bis heute nicht bestätigt werden <sup>[136]</sup>. Auch Octacalciumphosphat  $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  wurde als Vorstufe der Knochenmineralisierung postuliert <sup>[14]</sup>, konnte jedoch nicht mittels Beugungsmethoden in der frühen Knochenbildung nachgewiesen werden. Das Knochenmineral erfüllt zwei Aufgaben: erstens führt es zur Stabilität des Skelettes und zweitens agiert es als Speicher unterschiedlicher Ionen (z. B. Calcium, Magnesium, Carbonat), die wichtig für den Stoffwechsel sind <sup>[136]</sup>.

### 2.4.3 Knochenersatzmaterialien

Knochenersatzmaterialien kommen zum Einsatz, wenn ein Knochendefekt, hervorgerufen durch einen Knochenbruch, eine Entzündung oder einen Tumor, mit einem Material aufgefüllt werden muss, so dass das spätere Einwachsen von neuem Knochen ermöglicht wird. Es gibt einen hohen Bedarf an synthetischen Knochenersatzmaterialien aufgrund der Nachteile, die mit biologischen Knochenimplantaten verbunden sind. So besteht bei körperfremden Implantaten (Xenografts), z. B. von Tieren, die Gefahr von Infektionen und immunologischen Problemen, da trotz Sterilisation unerwünschte aktive Biomoleküle zurückbleiben können. Diese Gefahr kann auch bei allogenen (artgleichen) Materialien auftreten. Implantate, die aus dem eigenen Körper gewonnen werden (Autografts), sind nach wie vor der Standard für den Knochenersatz, da sie eine perfekte Biokompatibilität besitzen. Jedoch ist die verfügbare Menge limitiert und es muss zur Entfernung des Implantats eine zweite Operation durchgeführt werden. Als Konsequenz all dieser aufgezeigten Probleme ist die Herstellung synthetischer Knochenersatzmaterialien ein weit verbreitetes Forschungsfeld. Diese sollten idealerweise sowohl osteoinduktiv (Fähigkeit zur Umwandlung undifferenzierter mesenchymaler Vorläuferzellen zu Osteoblasten), osteokonduktiv (Fähigkeit, das Einwachsen von Kapillaren, Gewebe und Knochenzellen in den Defektraum zu ermöglichen) als auch biokompatibel (gut vom Körper aufnehmbar und keine Fremdkörperreaktionen zeigend) sein. Weiterhin sollten die synthetischen Knochenersatzmaterialien bioabbaubar sein, damit sie durch den neu gebildeten, eigenen Knochen ersetzt werden können. Zudem sind poröse Materialien von Vorteil, wodurch ein besserer Knocheneinwuchs möglich ist. Sie müssen jedoch weiterhin eine ausreichende mechanische Stabilität aufweisen. Für die Lebensdauer eines Implantats ist vor allem die Knochenresorption durch Osteoklasten ausschlaggebend <sup>[19]</sup>.

Die meisten Knochenersatzmaterialien werden auf der Basis von Calciumphosphaten hergestellt, da das anorganische Material des Knochens und auch anderer Hartgewebe, wie z. B. von Zähnen, aus Calciumphosphat besteht. Zudem weisen Calciumphosphate eine hohe Biokompatibilität auf. Es sind verschiedene Calciumphosphate mit unterschiedlicher Zusammensetzung auf dem Markt, wobei die wichtigsten Hydroxylapatit  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  und Tricalciumphosphat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sind. Der Nachteil der rein keramischen Materialien ist deren geringe Elastizität und hohe Sprödigkeit. Eine mögliche Lösung dieses Problems ist die Kombination von Calciumphosphaten mit Polymeren zu einem geeigneten Kompositmaterial (Abbildung 17), das eine hohe Elastizität aufweist und zugleich eine gute Biokompatibilität besitzt. Als biokompatible Polymere kommen sowohl synthetische Polymere wie Polyester als auch Polymere biologischen Ursprungs wie Kollagen, Gelatine oder Alginate in Frage.



**Abbildung 17:** Einige mögliche Kombinationen von Calciumphosphaten und Polymeren zur Herstellung von Knochenersatzmaterialien.

Im Folgenden werden einige Beispiele für bereits entwickelte Kompositmaterialien auf Hydroxylapatit-Basis gegeben.

Kikuchi et al. <sup>[158]</sup> haben ein Kollagen/HAP-Komposit entwickelt, dessen mechanische Eigenschaften noch durch eine Verlinkung der Kollagen-Fasern mit Glutaraldehyd verbessert wurden. Dieses Material wurde *in vivo* getestet und zeigte ein gutes biologisches Verhalten. Eine weitere Studie zeigt, dass mit Silizium substituierte Kollagen/HAP-Komposite eine höhere Biokompatibilität aufweisen und somit den Knochenersatz verbessern <sup>[159]</sup>. Biodegradierbare Polyester auf der Basis von Polyglykolsäure und Polymilchsäure werden häufig als Bestandteile von Kompositmaterialien eingesetzt. Ein Nachteil dieser Polyester ist jedoch, dass sie zu sauren Produkten abgebaut werden, was zur Acidose und im Kontakt mit Knochen zur Knochenauflösung (Osteolyse) führen kann. Dies kann durch Carbonat im Hydroxylapatit verhindert werden <sup>[160, 161]</sup>. Die mechanischen Eigenschaften von Hydroxylapatit können durch Polylactid verbessert werden <sup>[162]</sup>. Neben den Materialien aus Hydroxylapatit gibt es noch eine Reihe weiterer Knochenersatzmaterialien auf Basis anderer Calciumphosphate. Dazu gehören  $\beta$ -TCP <sup>[163, 164]</sup> und die biphasischen Calciumphosphate (BCP), ein Gemisch aus HAP und  $\beta$ -TCP <sup>[165, 166]</sup>. Ein Vorteil von  $\beta$ -TCP im Vergleich zu HAP ist seine höhere Löslichkeit und damit bessere Biodegradierbarkeit <sup>[17]</sup>.

Weitere Knochenersatzmaterialien sind Knochenzemente auf Calciumphosphat-Basis, die erstmals 1995 von Constantz et al. eingeführt wurden <sup>[167]</sup>. Sie werden als Paste in den Defekt eingebracht und härten erst dort aus, wodurch eine gute Anpassung an den jeweiligen Defekt möglich ist <sup>[167-169]</sup>. Da die Abbindezeit oftmals noch für den klinischen Gebrauch unzureichend ist, wurden auch hier Zementkomposite, z. B. mit Gelatine hergestellt <sup>[170]</sup>. Zudem wurden Knochenersatzmaterialien mit Fluorapatit (OH-Gruppen im Hydroxylapatit werden durch Fluorid ersetzt) als grundlegende Substanz entwickelt. Er hat im Vergleich zu HAP eine geringere Löslichkeit, eine höhere mechanische

Stabilität, und es konnte gezeigt werden, dass Fluorid einen stimulierenden Effekt auf Osteoblasten *in vitro* ausübt <sup>[171, 172]</sup>.

Mit speziellen Techniken (z. B. Gefriertrocknung) ist es zudem möglich, poröse Kompositmaterialien auf Basis der verschiedenen Calciumphosphate herzustellen, wodurch die Zellen und Gewebe besser in das Implantat einwachsen können <sup>[146-150]</sup>. Ein Nachteil dieser Materialien ist jedoch häufig die geringere mechanische Festigkeit.

Eine Übersicht zur Untersuchung unterschiedlicher Knochenersatzmaterialien liefert der Artikel von Tadic et al. <sup>[20]</sup>. Dabei wurden die Zusammensetzung, Kristallinität, Morphologie, mechanische Stabilität und die Biodegradierbarkeit analysiert.

Ein weiteres Gebiet der Biomaterialien ist die Beschichtung von metallischen Implantaten (z. B. Endoprothesen) mit Calciumphosphaten, wodurch eine bessere Verbindung zwischen Knochen und dem Implantat erreicht wird <sup>[27]</sup>.

### **3. Verwendete Analysemethoden**

#### **3.1 Rasterelektronenmikroskopie (REM) mit energiedispersiver Röntgenspektroskopie (EDX)**

Mittels eines Rasterelektronenmikroskops ist es möglich, eine Oberfläche mit einem Elektronenstrahl, der sehr fein gebündelt wird, abzutasten. Im Gegensatz zur Vergrößerung eines Auflichtmikroskops (maximal ca. 1000fach), kann mit Hilfe des Rasterelektronenmikroskops eine bis zu 500000fache Vergrößerung erreicht werden; die Auflösung liegt bei einigen Nanometern. Durch einen Elektronenstrahl, der Punkt für Punkt und Zeile für Zeile über die Oberfläche einer Probe geführt wird, entsteht ein Bild. Da in der Rasterelektronenmikroskopie nur elektrisch leitende Oberflächen dargestellt werden können, müssen die Proben meist speziell präpariert werden. Nichtleitende Proben (Isolatoren) würden bei Elektronenbeschuss Bereiche mit hoher negativer Ladung erhalten. Das dadurch aufgebaute elektrische Feld würde den primären Elektronenstrahl unkontrolliert ablenken und defokussieren. Daher müssen diese Proben mit einem leitfähigen Überzug aus Kohlenstoff oder einem Metall (z. B. Gold) beschichtet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Schicht nicht zu dick aufgedampft wird, da ansonsten die feinen Strukturen der Substanz abgedeckt werden können. Die Abtastung mit dem Elektronenstrahl findet im Hochvakuum statt, damit eine eventuelle Wechselwirkung des Elektronenstrahls mit den Molekülen der Luft verhindert wird.

Trifft der Elektronenstrahl auf eine Probenfläche, so werden die Elektronen abgebremst, wobei sie kinetische Energie an die Probe abgeben. Dadurch werden Sekundärelektronen aus der Probenfläche herausgelöst, die vom Sekundärelektronendetektor registriert werden. Die Sekundärelektronenausbeute hängt von der Primärstrahlenergie, der Neigung der Probenoberfläche zum Elektronenstrahl und vom Probenmaterial ab. Da der Austritt von

Sekundärelektronen an Objektkanten erleichtert ist, ergibt sich ein kontrastreiches und dreidimensional wirkendes Bild.

Neuere Geräte der Rasterelektronenmikroskopie erlauben das Arbeiten in drei verschiedenen Druckbereichen. Neben Hoch- und Niedervakuum besteht auch die Möglichkeit, Proben im ESEM-Modus (*Environmental Scanning Electron Microscope*) bei Drücken bis 40 mbar zu untersuchen, was jedoch zu Lasten der Auflösung geht.

Neben frei werdenden Sekundär- oder gebeugten Primärelektronen entstehen beim Auftreffen des Elektronenstrahls auf die Probe auch Röntgenstrahlen. Diese Röntgenstrahlung ist abhängig von der Ordnungszahl des jeweiligen Elements und somit charakteristisch für die in der Probe vorhandenen Elemente (Moseley'sches Gesetz). Die Kopplung von Elektronenmikroskopen mit energiedispersiven Röntgendetektoren (EDX) ermöglicht daher die lokale Analyse der Elementarzusammensetzung der Probenoberfläche. Der Nachweis beschränkt sich allerdings auf qualitative Analysen und ist nur in Maßen quantitativ auswertbar.

Die REM-Bilder in dieser Arbeit wurden mit einem ESEM Quanta 400 FEG von FEI aufgenommen. Schlechtleitende Proben wurden zuvor mit einer Gold/Palladium-Legierung für 1-2 Minuten bedampft. Die Arbeitsspannung lag je nach Probe bei 5-20 kV.

### **3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)** <sup>[173, 174]</sup>

Das Transmissionselektronenmikroskop funktioniert wie ein herkömmliches Durchlichtmikroskop mit dem Unterschied, dass beim TEM die zu untersuchende Probe mit einem Elektronenstrahl anstatt sichtbarem Licht „durchleuchtet“ wird. Der Elektronenstrahl wird aus einer Glüh- oder Feldemissions-Kathode emittiert und beschleunigt; typische Beschleunigungsspannungen liegen bei 80-200 kV. Aufgrund der verwendeten Wellenlänge beschleunigter Elektronen ist eine Auflösung möglich, die bis in

den atomaren Bereich geht. Die Abbildung der Probe erfolgt, nachdem der mittels eines elektromagnetischen Linsensystems im Hochvakuum fokussierte Elektronenstrahl die Probe durchdrungen hat, durch das Auftreffen des Strahls auf einen Detektorschirm. Die erreichbare Auflösung wird neben Linsenfehlern auch von der Probendicke beeinflusst, da mit höherer Dicke die unelastische Streuung im Vergleich zur bildgebenden elastischen Streuung zunimmt. Somit sind für Bilder hoher Auflösung extrem dünne Schnitte der Proben notwendig.

Als Probenträger dient ein Netz, das im Allgemeinen aus Kupfer besteht und mit Kohlenstoff beschichtet ist.

In dieser Arbeit wurde ein Transmissionselektronenmikroskop CM 200 der Firma Philips benutzt. Die untersuchten Proben wurden in ein Kunstharz eingebettet und nach dem Aushärten mit einem Diamantmesser 100 nm dünne Schnitte angefertigt. Die Beschleunigungsspannung betrug 200 kV.

### **3.3 IR-Spektroskopie (IR)**

Moleküle werden durch Absorption von Infrarotstrahlung (Wellenlängenbereich von 760 nm bis 0,5 mm) zu Schwingungen angeregt; ein N-atomiges Molekül besitzt  $3N-6$  Normalschwingungen, ein lineares Molekül hat dagegen nur  $3N-5$  Normalschwingungen. Damit eine Schwingung IR-aktiv ist, muss sich während der Schwingung das Dipolmoment der Verbindung ändern. Welche Schwingungen einer Substanz IR-aktiv sind, kann nach Feststellung der Symmetrie des Moleküls in den Charaktertafeln der Gruppentheorie nachgeschlagen werden.

Die Lage der Absorptionsbanden hängt von der Art der im Molekül vorkommenden funktionellen Gruppen ab. Die Absorptionsbanden werden meistens durch die Wellenzahl (Einheit:  $\text{cm}^{-1}$ ), den reziproken Wert der Wellenlänge, charakterisiert. Ein typisches IR-Spektrum umfasst einen Bereich von  $600-4000 \text{ cm}^{-1}$ , die Energie der Strahlung reicht von 4 bis  $42 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Ein



IR-Spektrum ist wie ein „Fingerabdruck“ für ein bestimmtes Molekül charakteristisch.

Die Frequenz, mit der die Atome schwingen, hängt von der Bindungsstärke und von ihrer Atommasse ab. Valenzschwingungen starker Bindungen und leichter Atome haben relativ hohe Frequenzen, d. h. sie absorbieren bei höheren Wellenzahlen. Dagegen liegen die Valenzschwingungsbanden schwacher Bindungen mit schweren Atomen bei niedrigeren Wellenzahlen. Es gibt eine Vielzahl möglicher Schwingungen, dazu gehören die Valenzschwingung (Änderung der Bindungslänge während der Schwingung) und die Deformationsschwingung (Änderung des eingeschlossenen Winkels während der Schwingung). Diese Fülle macht eine Interpretation eines IR-Spektrums nicht immer leicht, dennoch ist die IR-Spektroskopie von großem Nutzen, da die Schwingungsbanden einer Reihe funktioneller Gruppen bei charakteristischen Wellenzahlen erscheinen. Ähnliche Moleküle unterscheiden sich besonders im Bereich von  $600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ , dem so genannten fingerprint-Bereich.

Ein Teil der IR-Spektren in dieser Arbeit wurden mit einem Spektrometer BIO-RAD FFS 175, ein anderer Teil mit einem Spektrometer Vertex 70 der Firma Bruker, aufgenommen. Dazu wurde KBr mit der zu vermessenden Substanz vermischt, gut gemörsert und ein KBr-Pressling angefertigt. Als Referenz diente ein reiner KBr-Pressling (beim Vertex 70 war dies nicht notwendig). Der Messbereich lag zwischen  $500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.4 Thermogravimetrie (TG)**

Die Thermogravimetrie gehört zu den thermischen Analysemethoden. Bei der Thermogravimetrie wird die Massenänderung einer Substanz im Verlauf eines vorgegebenen Temperatur-Zeit-Programms gemessen. Im Allgemeinen sind Heizraten von 1 bis 20 K min<sup>-1</sup> üblich, je nach gewünschter Auflösung. Messgröße ist die durch Reaktion oder Zerfall hervorgerufene Änderung der Probenmasse als Funktion von Temperatur und / oder Zeit. Eine Massenänderung ist dann zu beobachten, wenn bei der thermischen Behandlung der Substanz flüchtige Stoffe entstehen; dies kann z. B. Wasser (in Form von Wasserdampf) oder Kohlendioxid sein. In Abhängigkeit von der Atmosphäre - es kann unter Stickstoff, Sauerstoff oder Formiergas (Gemisch aus 70-90 % N<sub>2</sub> und 10-30 % H<sub>2</sub>) gemessen werden - können neben Zersetzungen auch Oxidationen oder Reduktionen stattfinden. Die Analysesubstanz befindet sich in einem Tiegel, der mit einer Thermowaage verbunden ist. Jede Stufe im Diagramm entspricht einer bestimmten Reaktion und kann somit dem Auftreten eines bestimmten Stoffes zugeordnet werden, der mittels eines weiteren Analysegerätes (IR-Spektrometer oder Massenspektrometer) genauer und einfacher identifiziert werden kann. Treppenkurven zeigen das Vorhandensein von zwei oder mehrerer stabilen Formen an. Ein ungleichmäßiger Verlauf weist auf eine thermisch instabile Substanz hin. Reaktionen mit der gewählten Atmosphäre sind oftmals an einem deutlichen Anstieg der TG-Kurve zu erkennen.

Die thermogravimetrischen Messungen wurden mit einem STA 409 PC der Firma Netzsch durchgeführt, das mit einem IR-Gerät Bruker Vertex 70 verbunden ist. Die Probe wurde in einen Tiegel aus Aluminiumoxid gefüllt. Die Messungen wurden, bis auf die Analyse von Apatos und Gen-Os (unter Sauerstoffatmosphäre), alle unter Stickstoffatmosphäre (Durchfluss: 50 ml min<sup>-1</sup>) durchgeführt. Die Heizrate betrug 2-5 K min<sup>-1</sup>. Die Probenmenge variierte zwischen 20 und 50 mg.

### **3.5 Dynamische Differenz-Kalorimetrie (DSC)**

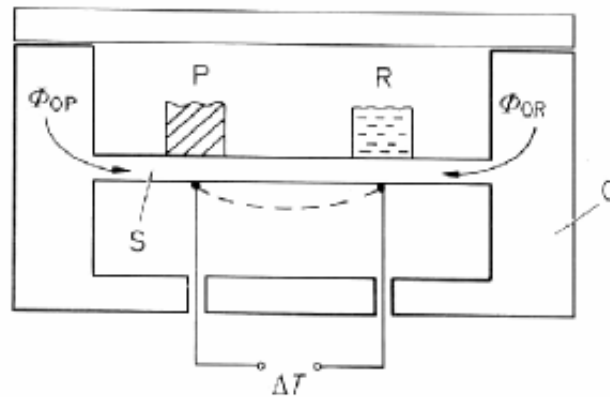
Die DSC gehört ebenfalls zu den thermischen Analysemethoden. Bei ihr werden die Probe und eine Referenzsubstanz, die im zu untersuchenden Temperaturbereich keine thermodynamische Umwandlung eingeht, einer Temperaturänderung mit konstanter Heiz- bzw. Abkühlungsrate unterworfen. Dabei wird die Differenz der Wärmeströme  $\Phi$  von der Probe und der Vergleichssubstanz (Gleichung 8) als Funktion der Temperatur oder der Zeit gemessen.

$$\Phi = \Phi(\text{Probe}) - \Phi(\text{Vergleichsprobe}) \quad [8]$$

Finden in einem bestimmten Temperaturbereich in der Probe physikalische oder chemische Prozesse statt, so verursachen diese im zeitlichen Temperaturverlauf der Probe Abweichungen von der Linearität. Bedingt durch das Material und den Aufbau der Messkammer, die eine sehr gute Wärmedämmung aufweist, kann der Temperaturunterschied sehr exakt gemessen werden. Daher ist das Messergebnis im Vergleich zur Thermogravimetrie nicht nur genauer, es sind auch quantitative Auswertungen möglich. So eignet sich die DSC vor allem zur Untersuchung exothermer (Peak nach unten) bzw. endothermer (Peak nach oben) Vorgänge und der Berechnung der entsprechenden Reaktionsenthalpien. Als Probenbehälter dienen Aluminiumtiegel, wodurch zwar im Vergleich zur TG-Analyse eine bessere Wärmeleitung erreicht wird zugleich aber auch die maximale Heiztemperatur auf 600 °C beschränkt ist.

Die DSC-Messungen wurden mit einem DSC 204 (schematische Darstellung siehe Abbildung 18) mit angeschlossener flüssig-N<sub>2</sub>-Kühleinheit der Firma Netzsch durchgeführt. Es handelt sich hierbei um ein kalibriertes Wärmestrom-DSC. Es wurden wenige Milligramm (maximal 10 mg) Substanz in einen Aluminiumtiegel eingewogen. Als Referenz diente ein leerer

Aluminiumtiegel. Der Aluminiumtiegel, in dem sich die Probe befand, wurde mit einem Loch versehen, damit sich kein Druck im Tiegel aufbauen konnte. Die Heizrate betrug  $5 \text{ K min}^{-1}$ .



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung eines dynamischen Wärmestrom-Differenz-Kalorimeters (Scheibenmesssystem); P Probe, R Vergleichsprobe, O Ofen, S Scheibe (Metall, Keramik),  $\Phi_{OP}$  Wärmestrom vom Ofen zur Probe,  $\Phi_{OR}$  Wärmestrom vom Ofen zur Vergleichsprobe,  $\Delta T$  Temperaturdifferenz.

### 3.6 Röntgenpulverdiffraktometrie (XRD) <sup>[175, 176]</sup>

Röntgenstrahlen werden an den Elektronenhüllen der in den Netzebenen  $hkl$  eines Kristallgitters liegenden Atome bzw. Ionen gebeugt, da ihre Wellenlänge im Größenbereich der Atomabstände im Kristallgitter liegt. Die Netzebenen eines Kristalls werden durch Größe und Form der Elementarzelle bestimmt; sie können mit den Atomschichten zusammenfallen, müssen dies aber nicht. An jeder einzelnen Netzebene wird ein Teil der Strahlung reflektiert. Diese reflektierten Wellen können nur dann in Phase schwingen und zu konstruktiver Interferenz führen, wenn der Weglängenunterschied unterschiedlicher Strahlen ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge ist.

Dieser Zusammenhang wird durch die Bragg-Gleichung beschrieben:

$$n \lambda = 2 d(hkl) \sin \theta \quad [9]$$

( $n$ : Ordnung der Beugungsmaxima;  $\lambda$ : Wellenlänge der einfallenden Strahlung;  $d(hkl)$ : Netzebenenabstand;  $\theta$ : Streuwinkel).

Man beobachtet die Röntgenintensität in einem Winkel  $2\theta$  von der Ebene des einfallenden Primärstrahls. Das erhaltene Diffraktogramm ist eine Auftragung der Intensität der gebeugten Strahlung gegen den Winkel  $2\theta$ .

Die Röntgenpulverdiffraktometrie kann zur Identifizierung von Substanzen herangezogen werden, da jede kristalline Substanz ein charakteristisches Diffraktogramm besitzt. Des Weiteren liefert sie Informationen über den Gittertyp und den Kristallisationszustand der Substanz. Je kristalliner eine Substanz ist, desto schmaler sind die Reflexe. Amorphe Stoffe, die eine definierte Nahordnung, aber keine Fernordnung und damit keine Netzebenenordnung besitzen, zeigen keine definierten Beugungsbilder. Anhand von Datenbanken wie der des ICDD (*International Centre for Diffraction Data*) können die Diffraktogramme einer bestimmten Substanz zugeordnet werden.

Bei der Pulverdiffraktometrie sollten die Proben vorher gut gemörsert werden, da ansonsten aufgrund von Vorzugsorientierung schwierig zu interpretierende Ergebnisse auftreten können. Dadurch verändern sich zwar nicht die Reflexlagen, jedoch die relativen Reflexintensitäten, was zur Folge hat, dass eine genaue Identifizierung der Substanz erschwert wird oder nicht mehr möglich ist.

Die Pulverdiffraktogramme wurden mit einem Röntgendiffraktometer D 500 der Firma Siemens aufgenommen. Dabei wurde die Substanz jeweils als Flachprobe auf einen Probenträger aus Glas aufgetragen. Zur besseren Haftung der Probe

wurde vorher etwas Vaseline auf das Glas aufgetragen. Die Messungen wurden mit Cu-K $\alpha$ -Strahlung durchgeführt. Als Detektor wurde ein Szintillations-Zähler verwendet.

### 3.7 Kernresonanzspektroskopie (NMR) <sup>[177, 178]</sup>

Die NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*) ist ein häufig angewendetes Verfahren zur Aufklärung von Molekülstrukturen. Es wird die Wechselwirkung von Stoffen, die einem starken, homogenen Magnetfeld ausgesetzt sind, mit elektromagnetischer Strahlung im Radiofrequenzbereich untersucht. Diese Wechselwirkung ist auf den Kernspin (Eigendrehimpuls) von Atomen zurückzuführen, der bei ungerader Protonenzahl und/oder ungerader Neutronenzahl auftritt. Durch diesen Kernspin entsteht ein magnetisches Moment, wodurch sich der Kern näherungsweise wie ein kleiner Magnet verhält. Der Spin und damit das magnetische Moment kann  $2I+1$  Orientierungen ( $I$ : Kernspinquantenzahl) bezüglich einer willkürlich gewählten Achse annehmen. Zu den Kernen mit der Kernspinquantenzahl  $I=1/2$  gehören unter anderem  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  und  $^{31}\text{P}$ , die somit zwei Orientierungen, die mit  $\alpha$  ( $m_I = +1/2$ ;  $m_I = I, I-1, \dots, -I$ ) und  $\beta$  ( $m_I = -1/2$ ) bezeichnet werden, aufweisen können. Einige wichtige Kerne wie z. B.  $^{16}\text{O}$  haben dagegen keinen Kernspin und sind daher mit magnetischen Resonanzspektren nicht nachzuweisen. Jeder Wert von  $m_I$  spiegelt eine Orientierung des Kernspins und damit des magnetischen Moments wider, die in einem äußeren Magnetfeld unterschiedliche Energien besitzen (Zeeman-Aufspaltung). Sind die Resonanzbedingungen erfüllt, so tritt eine Kopplung zwischen den Kernspins und der Strahlung ein, und es gehen Kerne vom energieärmeren  $\alpha$ - in den  $\beta$ -Zustand über. Das äußere Magnetfeld induziert einen elektronischen Bahndrehimpuls, der ein kleines zusätzliches Magnetfeld an den Kernen erzeugt. Das so genannte lokale Magnetfeld kann sich vom angelegten Feld unterscheiden. Daher ist die Aufspaltung der Energieniveaus abhängig von der elektronischen Struktur des Moleküls in der Nähe des Kerns. Dies führt dazu, dass die Resonanzbedingung für verschiedene Kerne (auch des

gleichen Elements) bei unterschiedlichen Frequenzen erfüllt ist. Dieses Phänomen wird chemische Verschiebung genannt. Sie wird relativ zu einer Standardsubstanz (z. B. Tetramethylsilan) in ppm der Resonanzfrequenz angegeben. Da die Elektronendichte von der chemischen Struktur der Verbindung abhängt, ist die chemische Verschiebung eines Kerns ein Indiz dafür, zu welcher funktionellen Gruppe eines Moleküls sie gehört und welche Gruppen benachbart sind.

Ein Effekt, der eine Aufspaltung der Resonanzlinien zur Folge hat, ist die so genannte Spin-Spin-Kopplung (skalare Kopplung) mit der Kopplungskonstante  $J$ . Sie resultiert aus dem Einfluss benachbarter Kerne mit magnetischem Moment auf die Flußdichte am betrachteten Kern und wird über die Bindungselektronen übertragen. Sie führt dazu, dass die Resonanzlinie eines Kerns gegenüber der Position, an der sie ohne Spin-Spin-Kopplung auftreten würde, verschoben ist. Da das Atom, mit dem der betrachtete Kern koppelt sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -Spin haben kann, wird die Resonanzlinie einmal um  $+1/2J$  und einmal um  $-1/2J$  verschoben. Dadurch wird ein Dublett von Linien im Abstand  $J$  erhalten.

Neben der herkömmlichen NMR-Spektroskopie in Lösung, können auch Festkörper mittels NMR-Spektroskopie untersucht werden. Die Festkörper-NMR-Spektroskopie ist eine wichtige Methode zur Strukturaufklärung, da sie Informationen liefert, die mittels Röntgenbeugungsmethoden nicht zu erhalten sind. So können mit Festkörper-NMR-Spektroskopie auch amorphe Stoffe untersucht werden und anhand der chemischen Verschiebung Informationen über die Bindungen und folglich die elektronische Struktur erhalten werden. In Festkörpern dominieren die orientierungsabhängigen Spinwechselwirkungen und das Relaxationsverhalten der Spinsysteme die NMR-Spektren. Die unvollständige Ausmittlung dieser Wechselwirkungen aufgrund anisotroper Molekülbewegungen führt zu Spektren, die auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen,

Anisotropien der chemischen Verschiebung und auf Quadrupolwechselwirkungen basieren. Dies hat in kristallinen und amorphen Substanzen Spektren mit Linienbreiten von mehreren kHz zur Folge. Ein weiterer Nachteil der Festkörper-NMR-Spektroskopie, insbesondere bei der Messung von  $^{13}\text{C}$ -Kernen, ist die hohe longitudinale Relaxationszeit  $T_1$ , die ein Maß für die Effizienz ist, mit der ein angeregter Kernspin durch Energieaustausch mit seiner Umgebung in seinen Grundzustand zurückkehrt. Dadurch bedingt entstehen lange Wartezeiten, bis das Spinsystem wieder in sein thermisches Gleichgewicht zurückkehrt ist.

Die wohl wichtigste Methode, um das Problem der Linienbreite zu minimieren, ist das *Magic-Angle-Spinning* (MAS). Dazu wird die Probe mit hoher Geschwindigkeit um den magischen Winkel von  $54,74^\circ$  zum angelegten Feld rotiert. Dadurch werden sowohl die Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (dipolare Kopplung bei  $^1\text{H}$ -NMR) zwischen den Kernen, als auch die Anisotropie (Orientierungsabhängigkeit) der chemischen Verschiebung zu null gemittelt. Im Idealfall bestehen die MAS-Spektren somit aus schmalen Resonanzlinien bei ihren isotropen chemischen Verschiebungen mit den isotropen J-Kopplungen. Zusätzlich sind noch Rotationsseitenbanden im Abstand der Rotationsfrequenz zu erkennen.

Vor allem Kerne wie  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  und  $^{31}\text{P}$  können mittels Festkörper-NMR ohne größere Schwierigkeiten gemessen werden, da sie, aufgrund ihres geringen natürlichen Vorkommens ( $^{13}\text{C}$ ), oder wie beim  $^{31}\text{P}$  die Verbindung oftmals nur einen der interessierenden Kerne enthalten, "verdünnt" vorkommen. Dadurch kann, wie es bei  $^1\text{H}$  oder  $^{19}\text{F}$  der Fall ist, keine homonukleare Kopplung stattfinden, die zur Verschlechterung der Messung führen würde. Zur Verbesserung der Signalintensitäten von unempfindlichen Kernen in Festkörper-NMR-Spektren, wie z. B.  $^{13}\text{C}$ , wurde die Kreuzpolarisation (CP) nach Hartmann-Hahn eingeführt. Dabei wird die starke dipolare Kopplung zwischen den Kernen mit niedriger natürlicher Häufigkeit und den Protonen



ausgenutzt, d. h. die  $^1\text{H}$ -Magnetisierung wird auf den unempfindlichen Kern übertragen. Die Kreuzpolarisation wird in der Festkörper-NMR-Spektroskopie häufig mit der MAS-Technik kombiniert.

Die Messungen wurden im Arbeitskreis von Prof. Mayer mit einem Bruker ASX 400 Spektrometer durchgeführt. Die Resonanzfrequenz betrug 400,132 MHz für Protonen bzw. 100,623 MHz für Kohlenstoffkerne. Für alle Spektren wurde die MAS-Technik angewandt, bei einer Frequenz von 4 kHz in einem 7 mm Rotor für die  $^{13}\text{C}$ -Spektren und 15 kHz in einem 4 mm Rotor für die  $^1\text{H}$ -Spektren.

Im Fall der  $^{13}\text{C}$ -MAS NMR-Spektren wurden die  $^{13}\text{C}$ -Kerne durch einen einzelnen  $30^\circ$ -Puls mit einer Dauer von 5,75  $\mu\text{s}$  angeregt. Um ein Linienspektrum zu erhalten, wurde der freie Induktionszerfall (engl.: *free induction decay, FID*) über 172 bis 600 Scans akkumuliert und anschließend Fourier-transformiert. Zwischen den einzelnen Anregungen wurden 180 s abgewartet, um eine vollständige Spin-Gitter-Relaxation zu ermöglichen.

Für die  $^{13}\text{C}$ -CPMAS NMR-Spektren wurde die  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  Kreuzpolarisation durch eine vollständige Polarisation der Protonen und durch Einstellen der Hartmann-Hahn-Bedingungen über eine Kontaktzeit von 4 ms erzeugt. In diesem Fall wurde der FID über 8800 Scans akkumuliert.

Im Fall der  $^1\text{H}$ -MAS NMR-Spektren wurden die Protonen durch einen  $90^\circ$ -Puls direkt angeregt. Typischerweise wurde der vollständig entkoppelte FID über 128-256 Scans akkumuliert und anschließend Fourier-transformiert, um ein Linienspektrum zu erhalten. Es wurde zwischen den Anregungen 5 s abgewartet, um eine vollständige Spin-Gitter-Relaxation zu ermöglichen.

Bis auf die Messungen an Ikait wurden alle Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Messung von Ikait fand bei  $-20^\circ\text{C}$  statt.

### **3.8 Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) und Elementaranalyse (EA)**

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) gehört zu den quantitativen analytischen Methoden (es können bis zu 70 Elemente nachgewiesen werden) und beruht darauf, dass Atome Energie in Form von Licht absorbieren können. Die zu messende Probe wird zunächst atomisiert, wozu vor allem Flammen und Graphitrohröfen eingesetzt werden. Die Elektronen in den nun freien Atomen werden dann durch Licht verschiedener Wellenlängen mit bestimmter Intensität angeregt. Da dieser angeregte Zustand nicht stabil ist, kehren die Elektronen wieder in den ursprünglichen Zustand zurück und geben dabei Energie einer bestimmten Wellenlänge ab. Ein Detektor misst den Intensitätsunterschied zwischen ein- und ausgetretenem Licht. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz kann nun die Konzentration bestimmt werden, da die Schwächung des eintretenden Lichts proportional zur Konzentration des zu analysierenden Elements ist. Die AAS ist ein relatives Messverfahren, d. h. es wird eine Kalibrierung mit Standards bekannter Konzentration vorgenommen und dann die Probe mit unbekannter Konzentration gegen diese Kalibrierkurve aufgenommen. Ein Vorteil der AAS gegenüber anderen Verfahren ist die Verwendung von Lichtquellen, die ein für das zu untersuchende Element charakteristisches Spektrum emittieren.

Die Metallanalysen wurden mit einem Atomabsorptionsspektrometer der Firma Thermo Electron Corporation M-Serie durchgeführt.

Mittels Verbrennungsanalyse kann der Gehalt an Kohlenstoff, Stickstoff, Wasserstoff, Sauerstoff und Schwefel bestimmt werden. Dazu muss die Probe vorher exakt eingewogen werden. Anschließend wird sie in einem Oxidationsreaktor unter reinem Sauerstoff bei hohen Temperaturen (800-900 °C) verbrannt. Kohlenstoff wird dabei zu CO oder CO<sub>2</sub> oxidiert, Wasserstoff reagiert zu Wasser und Stickstoff zu Stickoxiden oder molekularem Stickstoff. Diese Verbrennungsprodukte werden mit Hilfe eines Trägergases

über einen heißen Kupferoxidkontakt geleitet, wodurch die Stickoxide vollständig zu  $N_2$  reduziert werden. Anschließend werden die Verbrennungsgase ( $CO_2$ ,  $H_2O$ ,  $N_2$ ) gaschromatographisch getrennt, einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor zugeführt und dort quantitativ bestimmt.

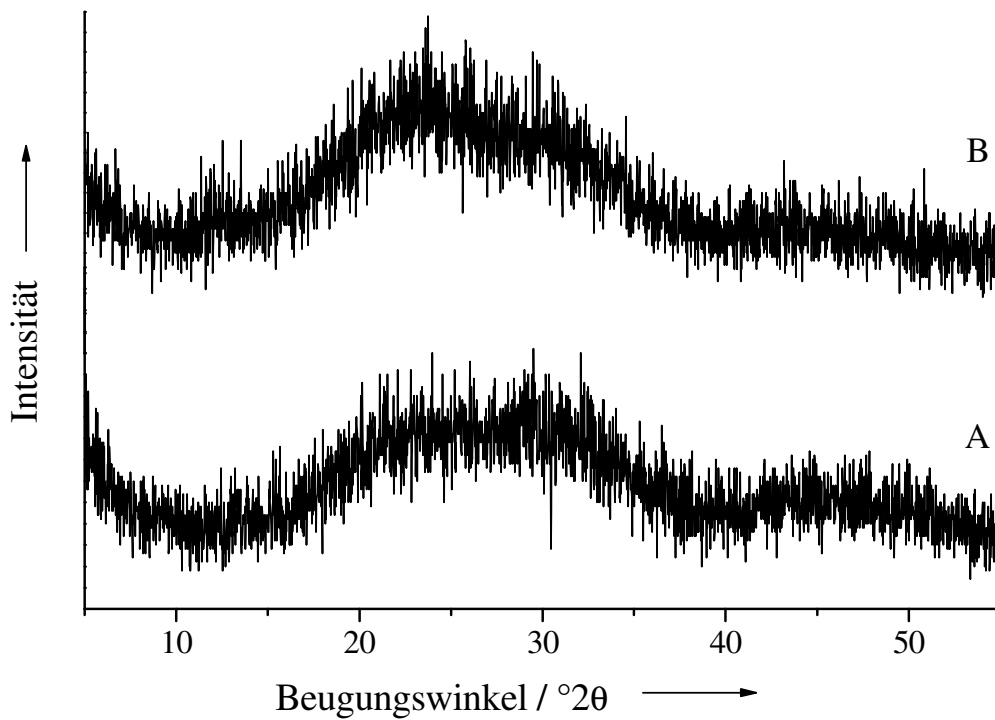
Die CHNS-Analysen wurden mit einem Analysator EA 1110 der Firma CE Instruments durchgeführt.

## **4. Ergebnisse und Diskussion**

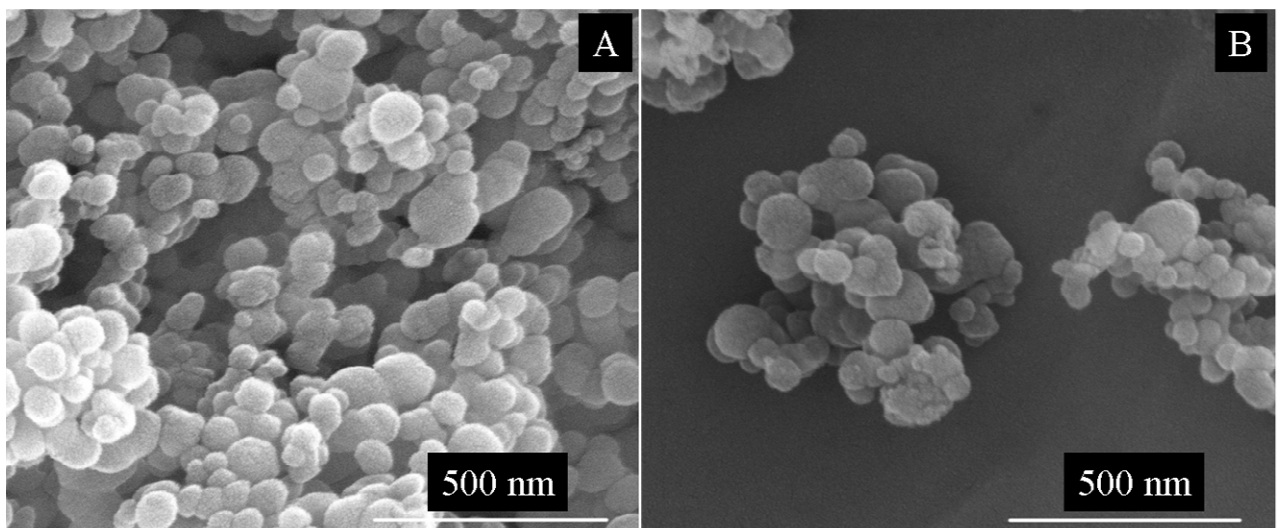
### **4.1 Calciumcarbonate**

#### **4.1.1 ACC**

Amorphes Calciumcarbonat wurde nach der Methode von Günther et al. <sup>[9]</sup>, bei der keine Additive im Unterschied zu anderen ACC-Synthesen <sup>[7, 96, 101, 179, 180]</sup> verwendet wurden, hergestellt. Nach dem Trocknen wurde es bei Raumtemperatur gelagert und in unregelmäßigen Abständen ein Pulverdiffraktogramm aufgenommen, um die Stabilität zu überprüfen. Es hat sich gezeigt, dass ACC unter Luftfeuchtheitsausschluss bei Raumtemperatur über mehrere Wochen stabil ist. Eine Lagerung bei tiefen Temperaturen ist daher nicht notwendig. Es wurde eine Probe an Luft (auf dem Probenträger zur Pulverdiffraktometrie) gelagert, um zu untersuchen, nach welchem Zeitraum sich das ACC umwandelt. Von dieser Probe wurde zunächst in stündlichen dann in täglichen Abständen ein Pulverdiffraktogramm aufgenommen. Nach einer Woche waren erste Reflexe von Calcit zu erkennen. Anfangs wurde die Substanz bei Raumtemperatur unter Vakuum getrocknet, da eine schonende Trocknung als vorteilhaft für die Stabilität von ACC angesehen wird. Es stellte sich jedoch heraus, dass eine Trocknung im Trockenschrank bei 70 °C ebenso geeignet ist. Durch die Trocknung bei 70 °C wird der Gehalt an Strukturwasser des ACC nicht beeinflusst. Es enthält, sowohl im Vakuum als auch bei 70 °C getrocknet, jeweils 7-8 Gew.-% Wasser. In Abbildung 19 sind Pulverdiffraktogramme von ACC, das bei 70 °C getrocknet wurde, direkt nach der Fällung und nach sieben Wochen, zu sehen. Die Morphologie und der Grad der Agglomeration der ACC-Partikel werden von der Trocknungsmethode nicht beeinflusst; es sind kugelförmige Partikel mit einem Durchmesser von 80-120 nm (Abbildung 20)



**Abbildung 19:** Pulverdiffraktogramme vom ACC nach unterschiedlichen Zeiträumen nach der Fällung: A) direkt nach der Fällung, B) nach 7 Wochen.

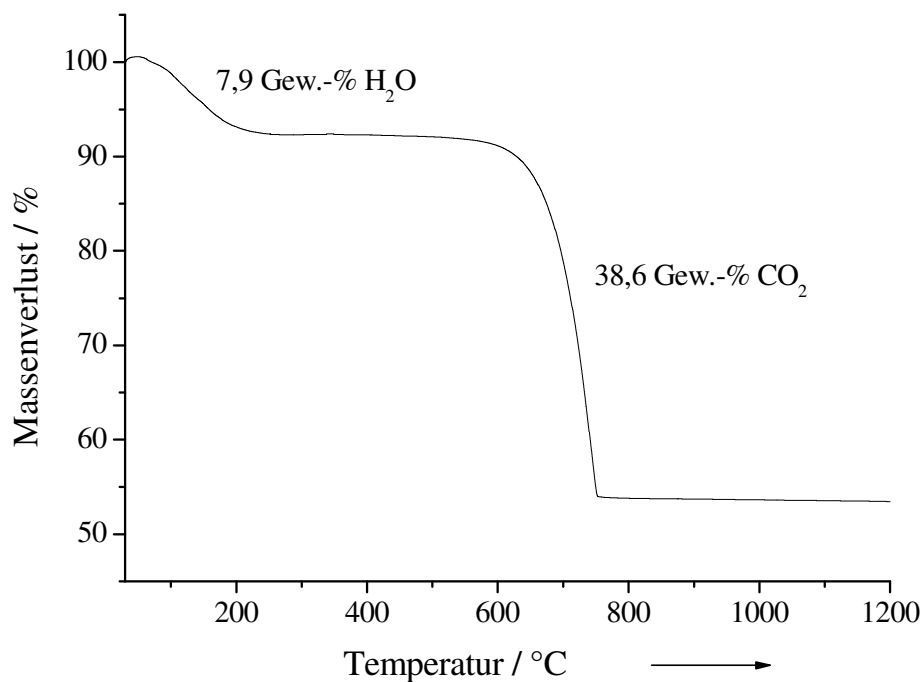


**Abbildung 20:** REM-Bilder von amorphen Calciumcarbonats (ACC); A) im Vakuum getrocknet; B) im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet; die ACC-Partikel haben eine kugelförmige Morphologie mit einem Durchmesser von 80-120 nm.

Das ACC wurde mittels Thermogravimetrie analysiert. Das Thermogramm zeigt zwei definierte Stufen. Die erste Stufe (7,9 Gew.-%) von 60-250 °C entspricht der Abgabe des enthaltenen Strukturwassers; die zweite Stufe von 570-760 °C (38,6 Gew.-%) zeigt die CO<sub>2</sub>-Abgabe durch Zersetzung des Carbonats zu Kohlendioxid und Calciumoxid an. Aus den Ergebnissen der Elementaranalyse (Ca, C, H) und der thermogravimetrischen Analyse (siehe Tabelle 6; Thermogramm in Abbildung 21) wurde für das ACC eine Zusammensetzung von Ca(CO<sub>3</sub>)<sub>1,002</sub>·0,472 H<sub>2</sub>O ermittelt. Dies stimmt gut mit den Ergebnissen von Faatz et al. überein, die ein amorphes Calciumcarbonat hergestellt haben, das einen Wassergehalt von 0,5 Mol hat <sup>[101]</sup>, während Günther et al. <sup>[9]</sup> ein Wassermolekül pro Calciumcarbonat für ACC gefunden haben. Hier zeigt sich analog zu den amorphen Calciumcarbonat-Phasen in der Biomineralisation, dass das Strukturwasser zur Stabilität des ACC beiträgt. In der Biomineralisation wird daher zwischen transientem ACC und stabilem ACC unterschieden. Addadi et al. haben ACC-Phasen aus unterschiedlichen Biomineralien untersucht. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass das transiente ACC, das als Vorläufer-Phase der kristallinen Calciumcarbonat-Phasen fungiert, kein oder nur wenig Wasser enthält <sup>[7]</sup>, während das stabile ACC ein Mol Wasser pro Mol Calciumcarbonat aufweist <sup>[5, 6]</sup>.

**Tabelle 6:** Ergebnisse der Elementaranalyse und der TG-Analyse von ACC.

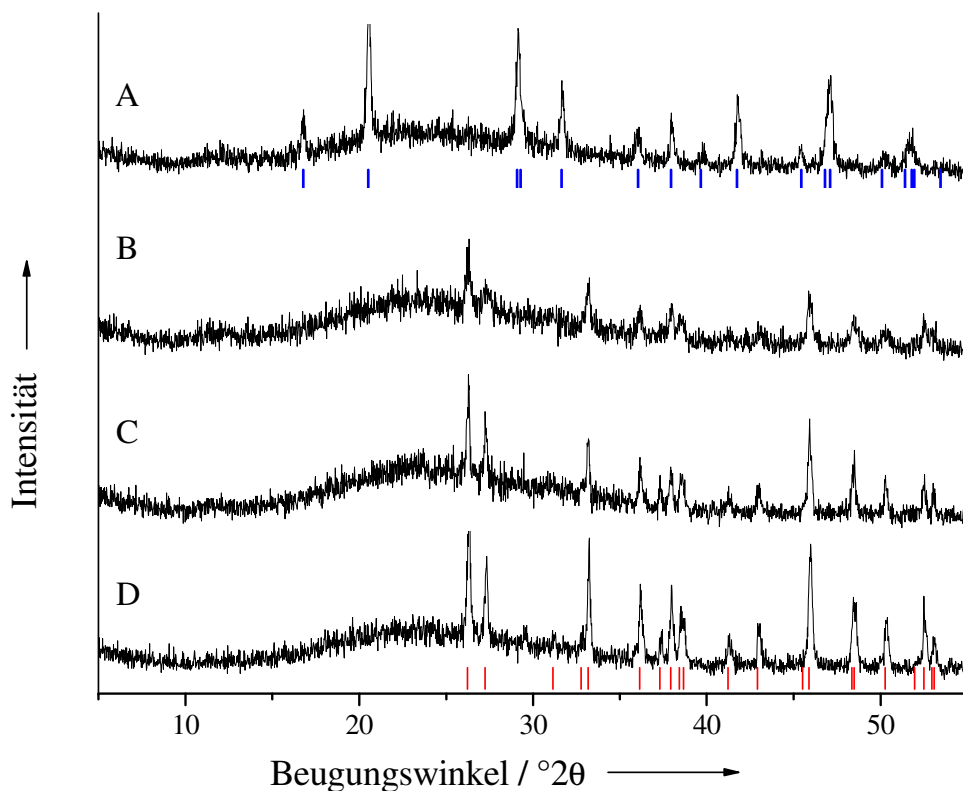
Calcium / Gew.-% (AAS)	35,35
Kohlenstoff / Gew.-% (Verbrennungsanalyse)	10,79
Wasserstoff / Gew.-% (Verbrennungsanalyse)	1,62
Wassergehalt / Gew.-% (TGA)	7,9
CO <sub>2</sub> -Abgabe / Gew.-% (TGA)	38,6
berechnete Formel (basierend auf der Elementaranalyse)	Ca(CO <sub>3</sub> ) <sub>1,002</sub> ·0,472 H <sub>2</sub> O



**Abbildung 21:** Thermogramm von ACC (von 30 °C-1200 °C bei einer Heizrate von 2 K min<sup>-1</sup>).

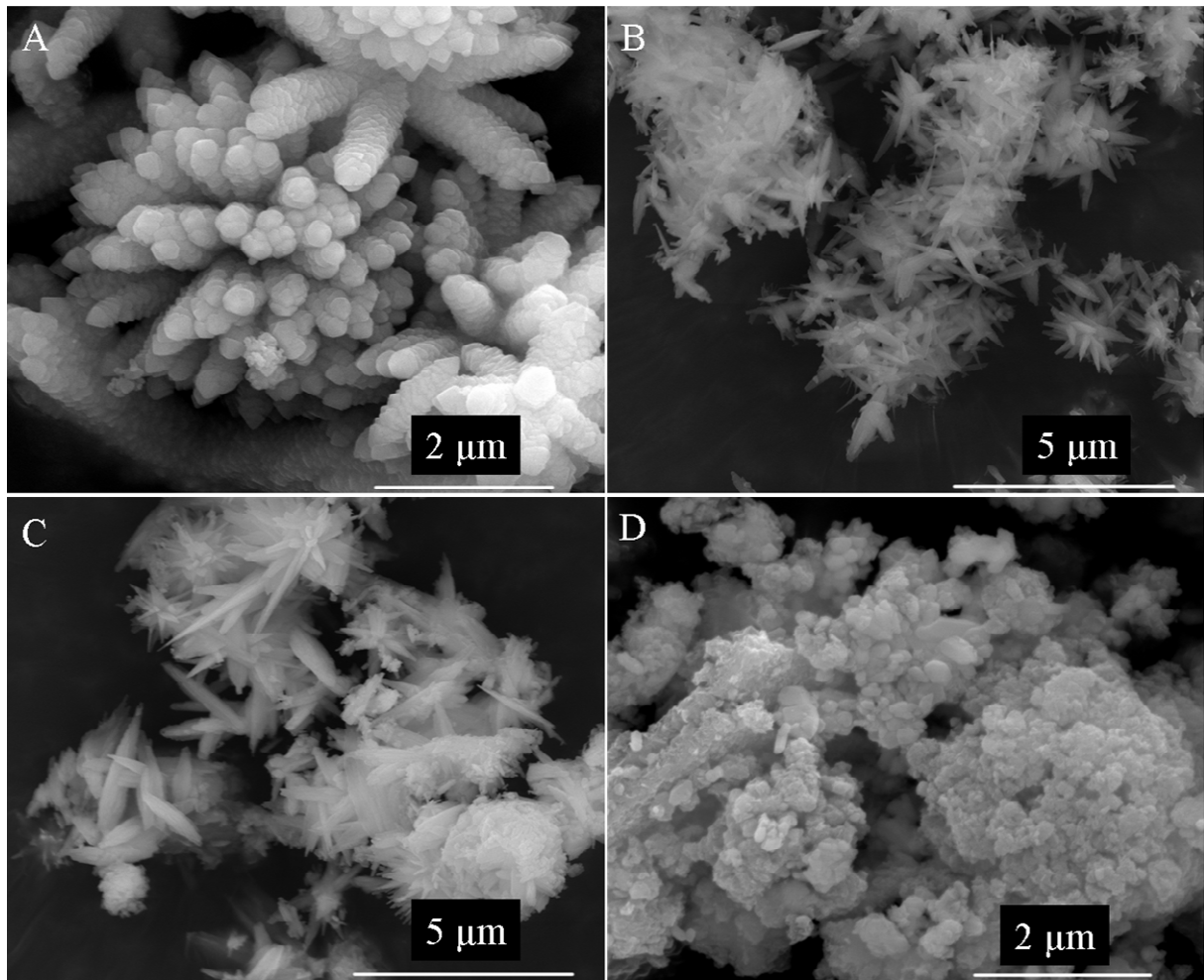
Des Weiteren wurden Versuche zur Umwandlung von ACC in wässrigen Lösungen verschiedener divalenter Kationen durchgeführt. Diese Versuche führten zu dem Ergebnis, dass die Stabilität bzw. Umwandlung abhängig vom verwendeten Kation, von der Konzentration des jeweiligen Kations und vom Zeitraum des Versuches ist. Es wurden dazu Versuche in Magnesium- und Zinklösungen durchgeführt, da bekannt ist, dass diese beiden Ionen die Calciumcarbonatkristallisation beeinflussen. In einer 0,019 molaren Magnesiumnitrat-Lösung wandelt sich das ACC bei Raumtemperatur (RT) zunächst über die Zwischenstufe Monohydrocalcit (nach einem Tag) in Aragonit (nach 5 Tagen) um. Kamiya et al. <sup>[181]</sup> beschreiben ebenfalls Monohydrocalcit als Zwischenstufe bei der Aragonitbildung in Gegenwart von Mg<sup>2+</sup>-Ionen. Wird bei gleicher Mg<sup>2+</sup>-Konzentration die Temperatur auf 50 °C erhöht, so bildet sich schon nach einem Tag Aragonit, der jedoch eine geringere Kristallinität aufweist als der bei Raumtemperatur entstandene Aragonit (Abbildung 22). Dies zeigt,

dass bei höheren Temperaturen die Bildung von Aragonit begünstigt ist. Die Temperatur ist nun der entscheidende Faktor bei der Umwandlung und nicht das Magnesium, das jedoch nach wie vor die Calcitkristallisation inhibiert. REM-Bilder zeigen eine für MHC charakteristische Plättchenform der Partikel, die sternförmige Aggregate bilden und eine für Aragonit typische nadelförmige Morphologie. Der bei 50 °C entstandene Aragonit weist dagegen eine plättchenförmige Morphologie auf (Abbildung 23). Vermutlich findet die Rekristallisation so schnell statt, dass sich die typischen Aragonitnadeln nicht ausbilden können.



**Abbildung 22:** XRD der Umwandlungsprodukte von ACC in einer 0,019 molaren Magnesiumnitrat-Lösung: A) MHC nach einem Tag bei RT, die blauen Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr.84-0049); B) Aragonit nach einem Tag bei 50 °C; C) Aragonit nach 5 Tagen bei RT; D) Aragonit nach 12 Tagen bei RT, die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr.76-0606).

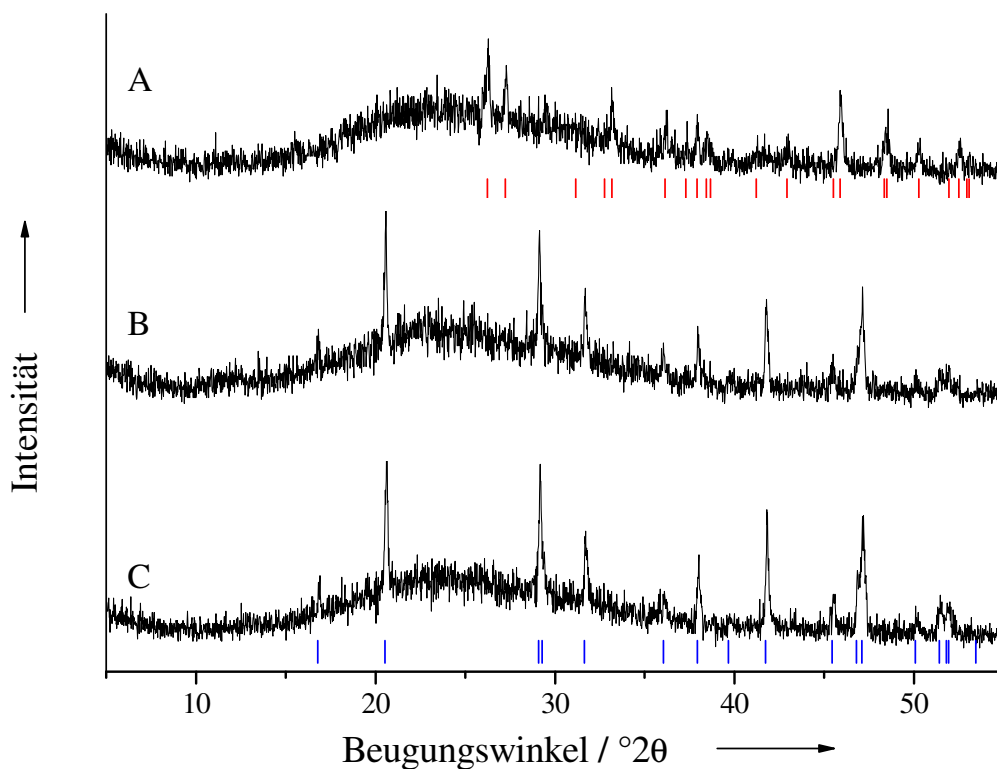




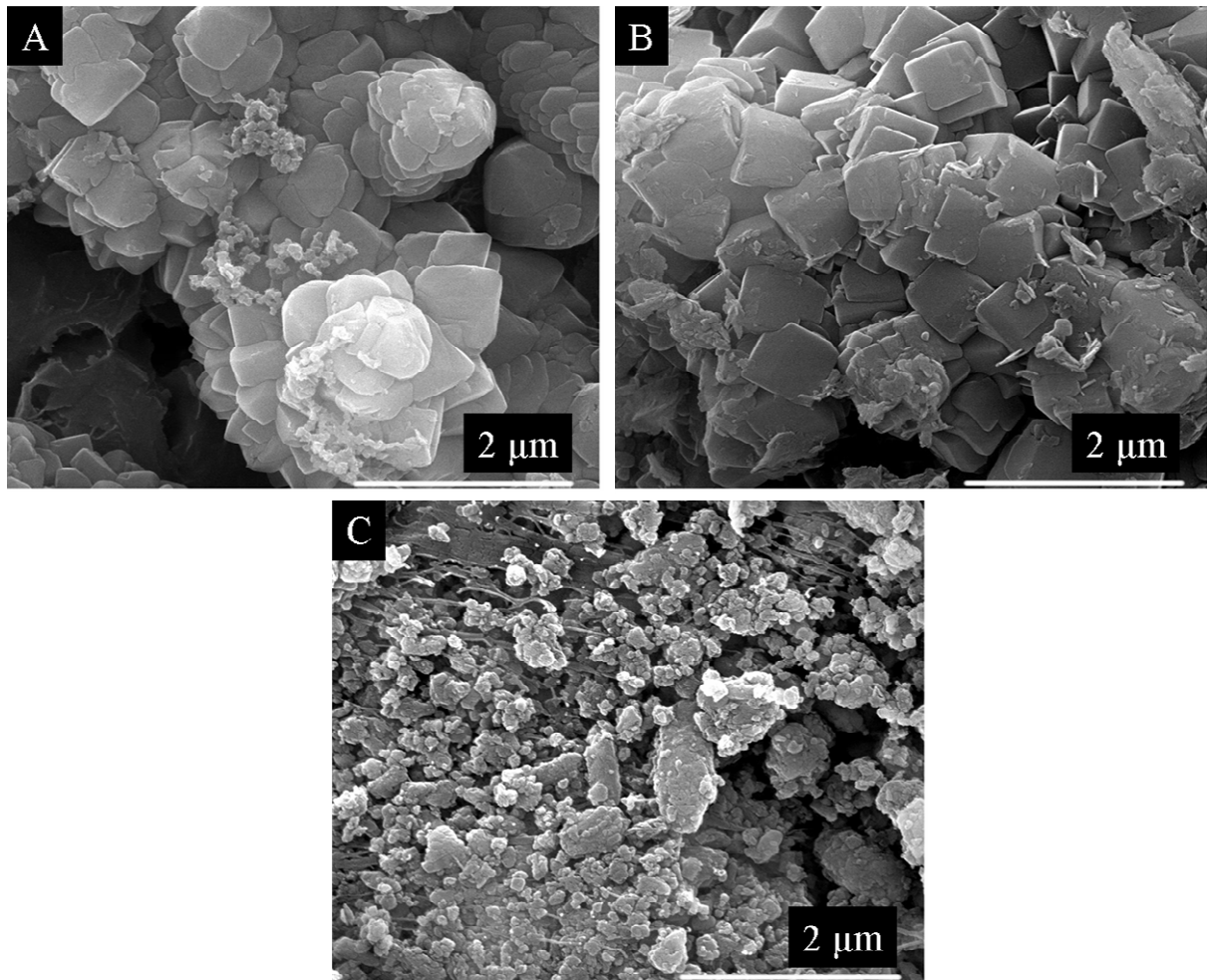
**Abbildung 23:** REM-Bilder der Umwandlungsprodukte von ACC in einer 0,019 molaren Magnesiumnitrat-Lösung: A) MHC nach einem Tag bei RT; B) Aragonit nach 5 Tagen bei RT; C) Aragonit nach 12 Tagen bei RT; D) Aragonit nach 5 Tagen bei 50 °C.

Wird die Magnesiumkonzentration auf  $0,039 \text{ mol l}^{-1}$  erhöht, so ist anfangs zu beobachten, dass sich das ACC völlig löst und auch nach einem Tag eine klare Lösung vorliegt. Da der pH-Wert mit zunehmender Konzentration der Magnesiumlösung steigt, kann dieser als Ursache für die Auflösung des ACC ausgeschlossen werden. Es ist zu vermuten, dass sich aufgrund der höheren Mg-Konzentration zunächst Magnesium-Calcit bildet, der eine hohe Löslichkeit hat und dieser sich dann weiter umwandelt. Nach 5 Tagen hat sich ein Niederschlag gebildet, wobei es sich um MHC handelt. Die höhere  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration stabilisiert somit die im Vergleich zu Aragonit instabilere

Modifikation MHC über einen längeren Zeitraum; auch nach 12 Tagen bleibt MHC hier die stabile Phase. Bei 50 °C bildet sich jedoch genau wie bei der niedrigeren Magnesiumkonzentration schon nach einem Tag Aragonit (Abbildung 24). Die Partikel zeigen die für MHC typische plättchenförmige Morphologie, während beim Aragonit die typischen Nadeln nicht zu erkennen sind. Dies bestätigt die Annahme, dass bei 50 °C die Umwandlung so schnell erfolgt, dass sich die Nadeln nicht ausbilden können (Abbildung 25).



**Abbildung 24:** XRD der Umwandlungsprodukte von ACC in einer 0,039 molaren Magnesiumnitrat-Lösung: A) Aragonit nach einem Tag bei 50 °C, die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr.76-0606); B) MHC nach 5 Tagen bei RT; C) MHC nach 12 Tagen bei RT, die blauen Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr.84-0049).



**Abbildung 25:** REM-Bilder der Umwandlungsprodukte von ACC in einer 0,039 molaren Magnesiumnitrat-Lösung: A) MHC nach 5 Tagen bei RT; B) MHC nach 12 Tagen bei RT; C) Aragonit nach einem Tag bei 50 °C.

Es kann festgehalten werden, dass in keinem der Versuche Calcit entstanden ist, so dass dies ein weiterer Beleg dafür ist, dass schon geringste Mengen an  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen die Calcitbildung inhibieren. Als Ursache für die MHC- bzw. Aragonitbildung wird die höhere Löslichkeit von Magnesium-Calcit angenommen<sup>[182]</sup>. Zur Umwandlung des ACC reicht aufgrund der guten Löslichkeit des ACC eine geringe Menge an Wasser aus, damit der Rekristallisierungsprozess erfolgt. Aizenberg et al.<sup>[180]</sup> haben die Umwandlung von ACC, das Magnesium enthält, untersucht. Dabei haben sie Bedingungen gewählt, die bei additiv-freiem ACC zu Calcit geführt haben. Es hat sich gezeigt, dass ebenfalls Calcit mit jedoch unterschiedlichen Morphologien

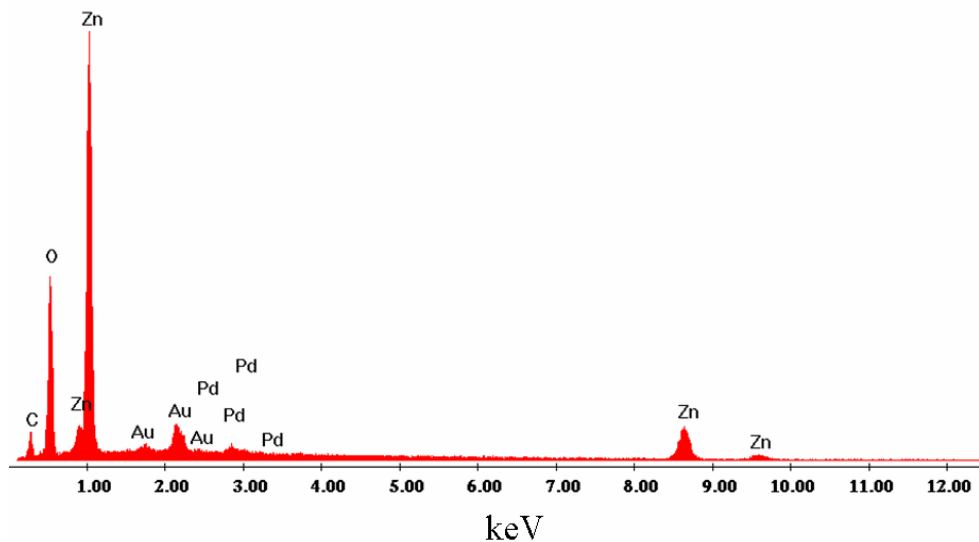
entstanden ist. Dies lässt vermuten, dass die sich bildende Calciumcarbonat-Phase abhängig davon ist, ob das Magnesium in Lösung vorliegt oder schon in der Vorläufer-Phase mit eingebaut ist. In Tabelle 7 sind alle Ergebnisse zur Umwandlung von ACC in Magnesiumlösungen zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Umwandlung von ACC in Magnesiumnitrat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Versuchsbedingungen	entstandene Calciumcarbonat-Phase
0,019 molar 1 Tag RT	Monohydrocalcit
0,019 molar 5 Tage RT	Aragonit
0,019 molar 12 Tage RT	Aragonit
0,019 molar 1 Tag 50 °C	Aragonit
0,019 molar 5 Tage 50 °C	Aragonit
0,039 molar 1 Tag RT	kein Niederschlag
0,039 molar 5 Tage RT	Monohydrocalcit
0,039 molar 12 Tage RT	Monohydrocalcit
0,039 molar 1 Tag 50 °C	Aragonit
0,039 molar 5 Tage 50 °C	Aragonit

In der Literatur wird beschrieben, dass bei der Fällung von Calciumcarbonat in Gegenwart von Zinkionen als Hauptphase immer Calcit, in manchen Fällen zusätzlich Hydrozinkit  $Zn_5(CO_3)_2(OH)_6$  entsteht <sup>[183]</sup>. Um das Verhalten von ACC in Gegenwart von Zinkionen zu untersuchen, wurden weitere Versuche mit ACC in Zinknitrat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (0,007 bzw. 0,017 molar) durchgeführt. EDX-Messungen (Abbildung 26) zeigen, dass es sich bei den entstandenen Substanzen um eine Zinkverbindung handelt, da kein Calcium detektiert werden kann. Im Unterschied zum Magnesium bildet sich

somit aus dem ACC keine kristalline Calciumcarbonat-Phase in Gegenwart von Zinkionen.

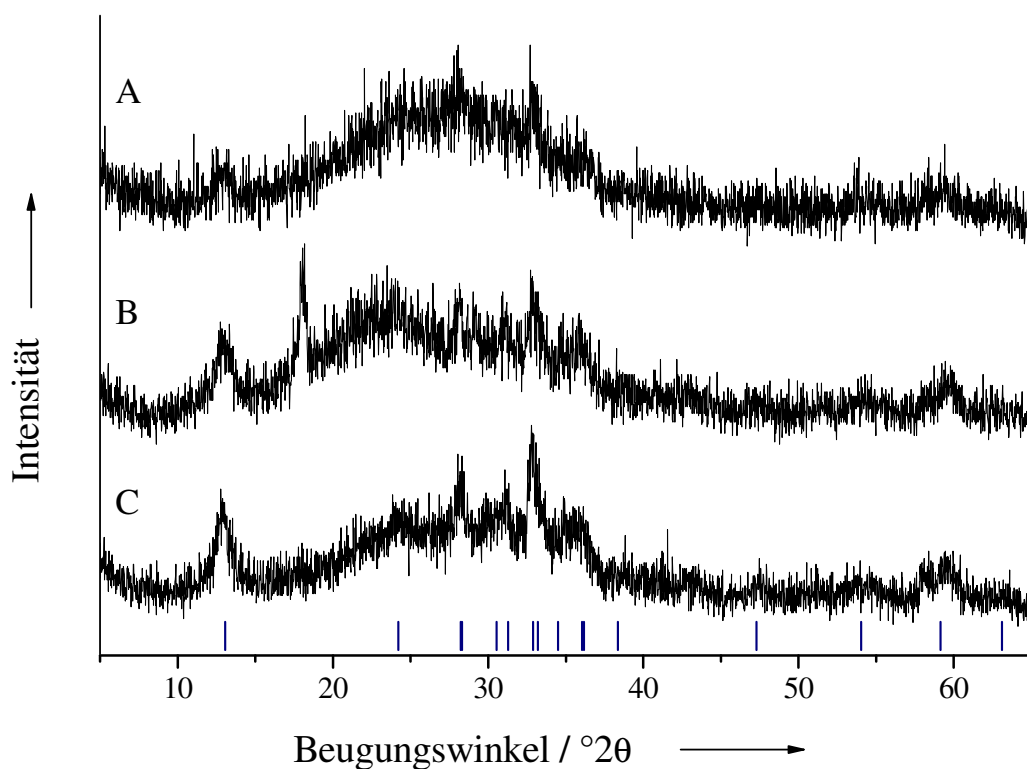


**Abbildung 26:** EDX-Spektrum des Produktes von ACC in einer 0,007 molaren Zinknitrat-Lösung nach einem Tag bei RT (exemplarisch für alle Produkte von ACC in Zinklösungen).

Ob es sich bei den Substanzen um Zinkcarbonat oder Hydrozinkit handelt, wurde mittels Pulverdiffraktometrie untersucht. Die Pulverdiffraktogramme zeigen Reflexe, die dem Hydrozinkit zugeordnet werden können (Abbildung 27). Hydrozinkit besitzt im Vergleich zu allen Calciumcarbonat-Phasen eine geringere Löslichkeit und fällt daher vor den Calciumcarbonaten aus. Das Löslichkeitsprodukt hat den Wert  $K_L = 1,26 \cdot 10^{-15} (\text{mol l}^{-1})^{13}$  <sup>[184]</sup> (zum Vergleich: Calcit  $K_L = 3,31 \cdot 10^{-9} \text{ mol}^2 \text{ l}^{-2}$ ). Das sich Hydrozinkit und nicht Zinkcarbonat gebildet hat, ist in guter Übereinstimmung mit der Literatur. Dort wird angegeben, dass die Herstellung von Zinkcarbonat unter normalen Bedingungen unmöglich ist und immer der Hydrozinkit entsteht <sup>[185, 186]</sup>.

Da die Reflexe nur eine geringe Intensität haben, ist davon auszugehen, dass der Hydrozinkit in nanokristalliner oder amorpher Form vorliegt. Mit der höheren

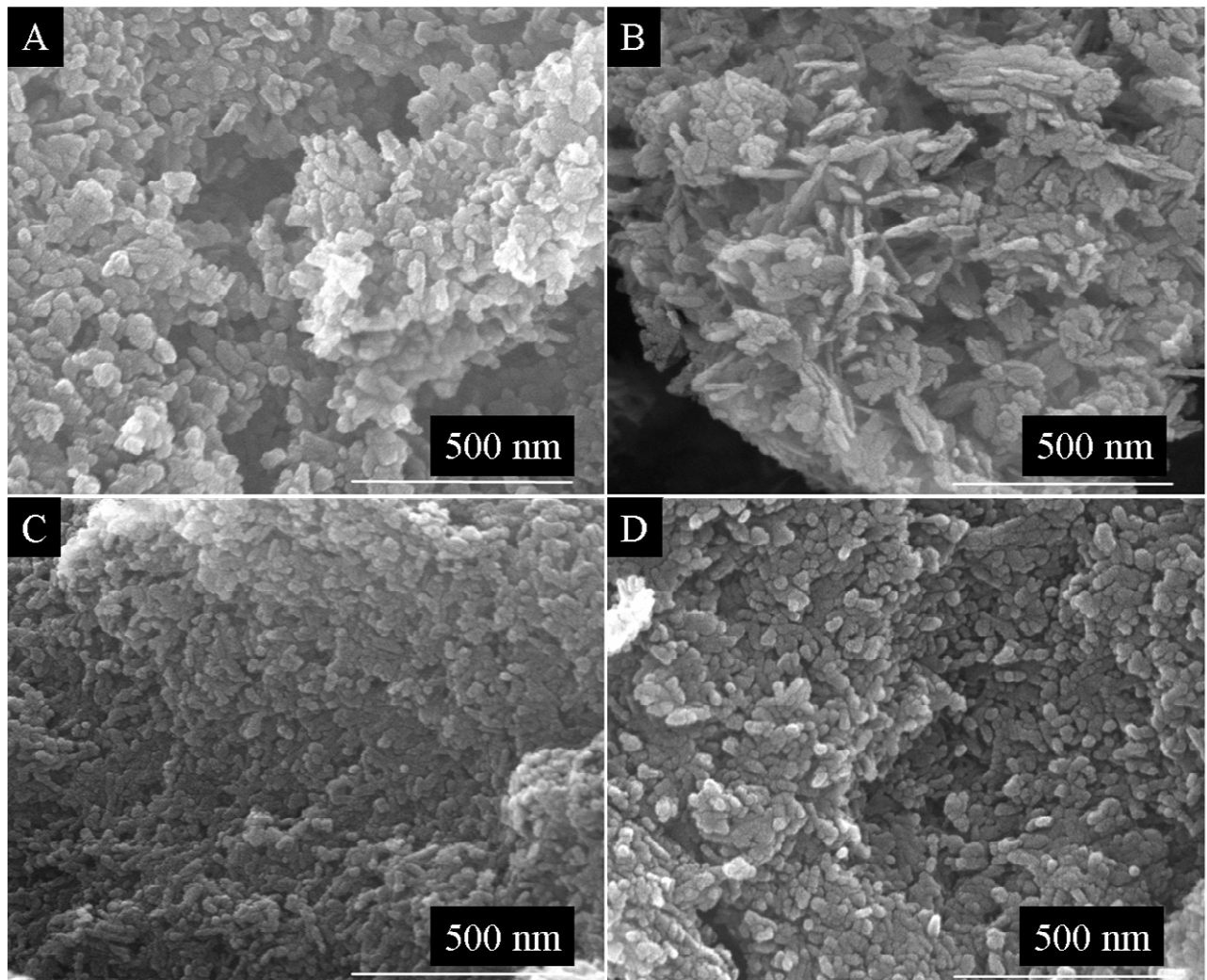
Zinkkonzentration nimmt die Kristallinität ab. In einigen Fällen ist ein Reflex bei  $18,1^\circ 2\theta$  zu sehen. Dieser Peak (Abbildung 27B) taucht bei den Proben auf, die 5 Tage oder länger, sowohl bei Raumtemperatur als auch bei  $50^\circ\text{C}$  gerührt wurden. Dieser Reflex kann keiner Phase sicher zugeordnet werden. REM-Aufnahmen bestätigen die Ergebnisse der Röntgenpulverdiffraktometrie, dass es sich um Nanopartikel handelt.



**Abbildung 27:** Pulverdiffraktogramme von den Substanzen nach Rühren von ACC in Zinknitrat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration: A) nach einem Tag in einer  $0,017$  molaren Zinknitrat-Lösung bei RT; B) 5 Tage in einer  $0,007$  molaren Zinknitrat-Lösung bei RT; C) ein Tag in einer  $0,007$  molaren Zinknitrat-Lösung bei RT, die blauen Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr. 72-1100).

Die Partikel haben eine Größe von ca. 40-60 nm und weisen eine kugel- bis stäbchenförmige Morphologie auf, wobei die Stäbchen bei 50 °C überwiegen (Abbildung 28). Die Konzentration der Zink<sup>2+</sup>-Ionen hat keine Auswirkung auf die Morphologie der Partikel.

In Tabelle 8 sind alle Ergebnisse zur Umwandlung von ACC in Zinklösungen zusammengefasst.



**Abbildung 28:** REM-Bilder der Substanzen, die durch Rühren von ACC in Zinklösungen entstanden sind: A) ein Tag in einer 0,007 molaren Zinknitrat-Lösung bei RT; B) 5 Tage in einer 0,007 molaren Zinknitrat-Lösung bei 50 °C; C) ein Tag in einer 0,017 molaren Zinknitrat-Lösung bei RT; D) 12 Tage in einer 0,017 molaren Zinknitrat-Lösung bei RT.

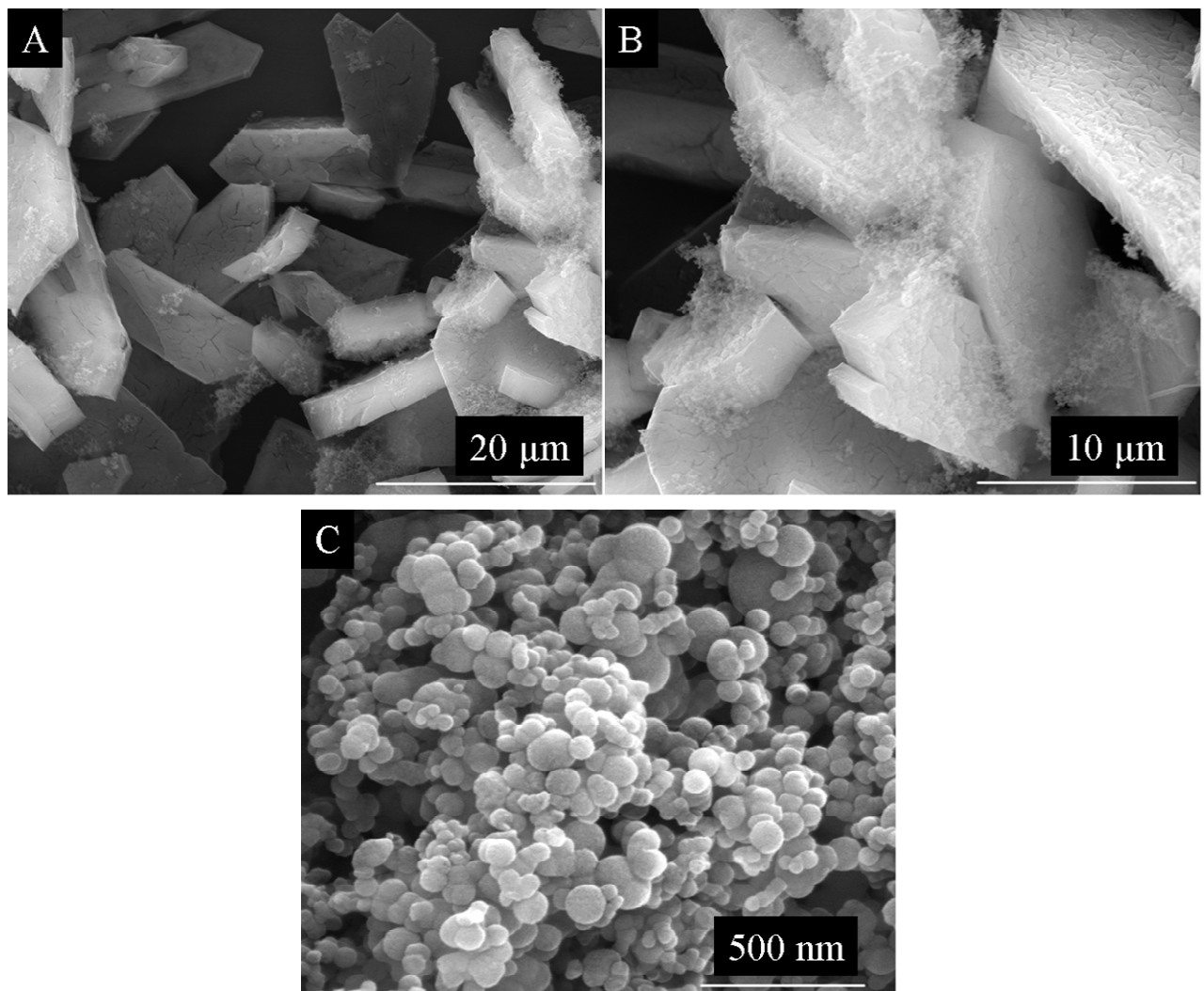
**Tabelle 8:** Zusammenfassung der Ergebnisse zur Umwandlung von ACC in Zinknitrat-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

Versuchsbedingungen	entstandene Calciumcarbonat-Phase
0,007 molar 1 Tag RT	Hydrozinkit
0,007 molar 5 Tage RT	Hydrozinkit + Reflex bei 18,04 °20
0,007 molar 12 Tage RT	Hydrozinkit + Reflex bei 18,12 °20
0,007 molar 1 Tag 50 °C	Hydrozinkit
0,007 molar 5 Tage 50 °C	Reflex bei 18,14 °20 + wenig Hydrozinkit
0,017 molar 1 Tag RT	Hydrozinkit
0,017 molar 5 Tage RT	Hydrozinkit
0,017 molar 12 Tage RT	Hydrozinkit + Reflex bei 18,14 °20
0,017 molar 1 Tag 50 °C	Hydrozinkit
0,017 molar 5 Tage 50 °C	Hydrozinkit + Reflex bei 18,02 °20
0,017 molar 12 Tage 50 °C	Hydrozinkit



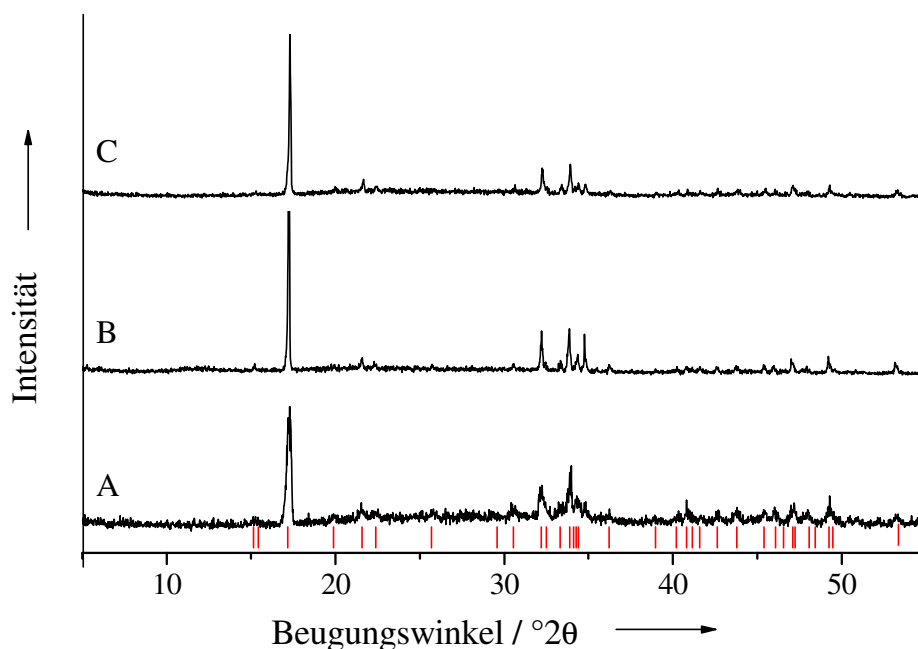
### 4.1.2 Ikait

Ikait wurde analog der Versuchsvorschrift von ACC nach Günther et al. <sup>[9]</sup> mit dem Unterschied hergestellt, dass der Niederschlag nicht getrocknet, sondern nach dem Abfiltrieren und Waschen mit Aceton feucht im Gefrierschrank aufbewahrt wurde. Ikait hat sich bei  $-18\text{ °C}$  aus dem amorphen Calciumcarbonat gebildet. REM-Bilder haben dies bestätigt, da die Ikaitproben auch noch etwas ACC (kugelförmige Partikel) enthalten haben. Die Ikaitpartikel sind plättchenförmig mit einer Länge von  $15\text{-}18\text{ }\mu\text{m}$  und einer Dicke von  $2\text{-}4\text{ }\mu\text{m}$  (Abbildung 29).



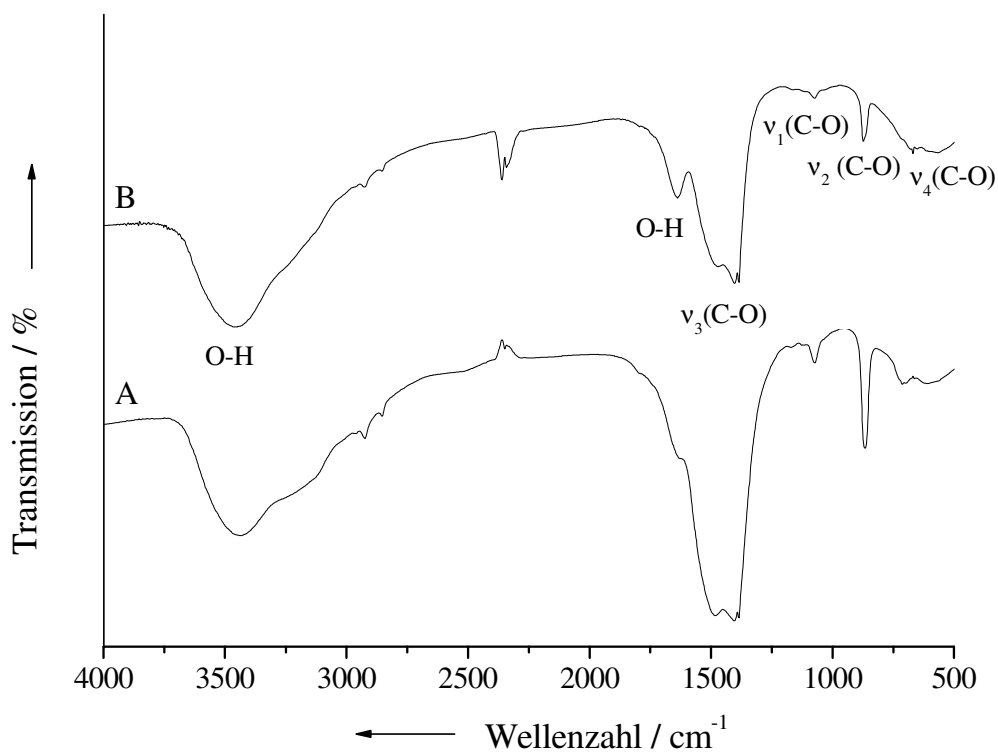
**Abbildung 29:** REM-Bilder von Ikaitkristallen bei unterschiedlichen Vergrößerungen (A und B) und kugelförmigen ACC-Partikel, die noch in der Ikaitprobe enthalten sind (C).

Brooks et al. <sup>[39]</sup> stellten fest, dass Ikait sich nie aus klaren Lösungen gebildet hat und kamen so zu der Annahme, dass er das Produkt der Kristallisation von ACC oder gel-ähnlichem Calciumcarbonat sein muss. Dies deckt sich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit. Es wurden in unterschiedlichen zeitlichen Abständen Röntgenpulverdiffraktogramme aufgenommen, um die Stabilität von Ikait zu untersuchen. Selbst eine Messung 9 Monate nach der Fällung zeigt, dass Ikait bei einer Lagerung von  $-18\text{ °C}$  über einen langen Zeitraum stabil ist (Abbildung 30). Bei Raumtemperatur ist er für mehrere Stunden stabil, wandelt sich dann aber in Calcit um. In Wasser hat sich bei Raumtemperatur dagegen nach einem Tag Calcit gebildet, während Ikait sich durch Erwärmen des Feststoffs auf  $40\text{ °C}$  bereits nach 30 Minuten in Calcit umgewandelt hat. Dies stimmt gut mit Untersuchungen zu der Stabilität von Ikait überein, die zu dem Ergebnis kamen, dass er sich innerhalb kurzer Zeit (wenige Stunden bis zu einem Tag) vollständig zu Calcit oder Vaterit umgewandelt hat <sup>[12, 39, 80]</sup>.



**Abbildung 30:** Röntgenpulverdiffraktogramme von Ikait: A) direkt nach der Fällung; B) nach 8 Wochen bei  $-18\text{ °C}$  in einem Schnappdeckelglas gelagert; C) nach 9 Monaten bei  $-18\text{ °C}$  in einem Schnappdeckelglas gelagert. Die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr. 75-1733).

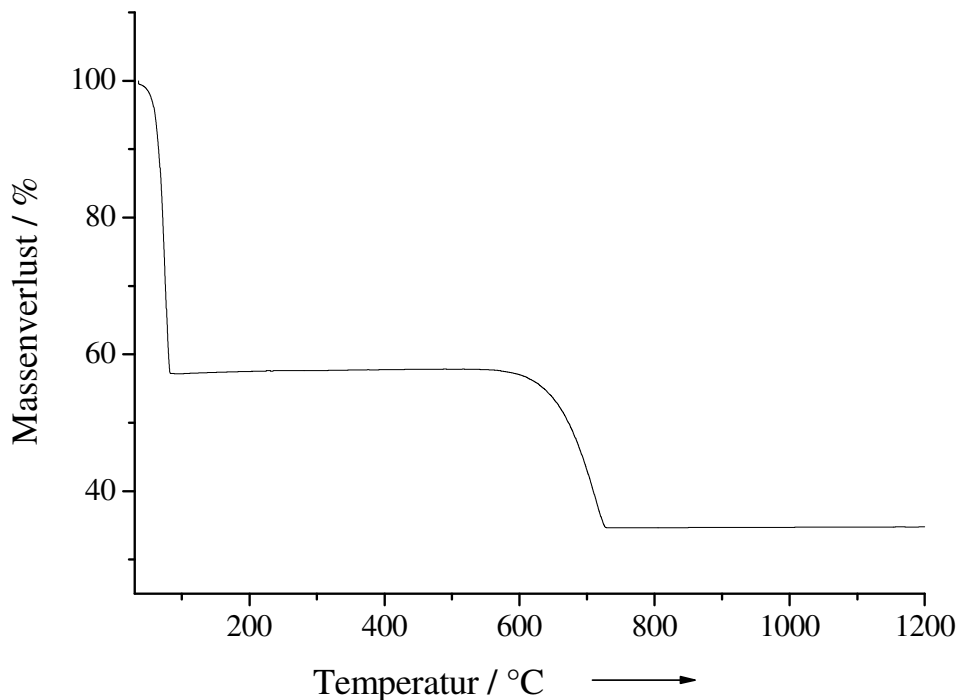
Der Ikait wurde mit IR-Spektroskopie charakterisiert. Das IR-Spektrum (Abbildung 31) zeigt die typischen Schwingungsbanden von Calciumcarbonaten. Die symmetrische C-O Streckschwingung ( $\nu_1$ -Bande), die im Calcit verboten ist, tritt beim Ikait als schwache Schwingungsbande auf. Zudem sind die Wasserbanden deutlich zu erkennen. Verglichen mit dem ACC ist bei dem Ikait vor allem die H-O-H-Deformationsschwingung bei einer Wellenzahl von  $1637\text{ cm}^{-1}$  intensiver; ein Hinweis auf den höheren Wassergehalt des Ikaites.



**Abbildung 31:** Vergleich der IR-Spektren von A) ACC und B) Ikait.

Weiterhin wurde der Ikait mittels Thermogravimetrie untersucht. Die Ergebnisse der TG-Analyse (exemplarisches Thermogramm in Abbildung 32) von Ikait weichen für den Wasserverlust vom theoretischen Wert ab. Der durchschnittlich ermittelte Wert von  $44,6\text{ Gew.-% H}_2\text{O}$  weicht um ca.  $7\text{ Gew.-%}$  vom theoretischen Wert für Ikait ab (siehe Tabelle 9). Dies liegt daran, dass sich Ikait

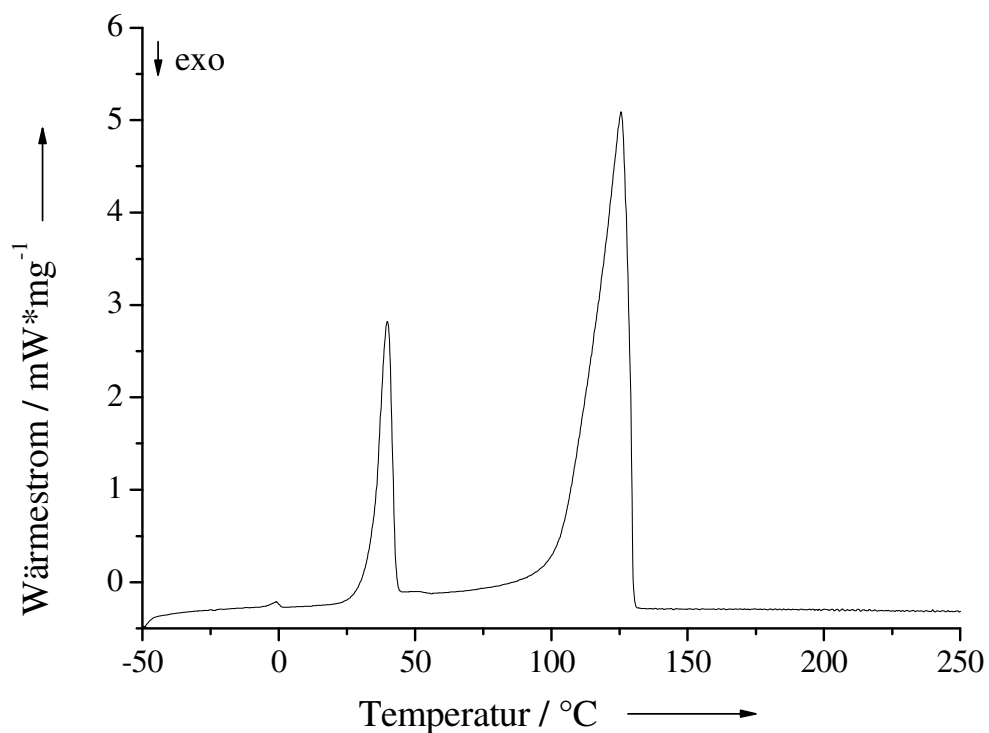
aufgrund seiner Instabilität bereits vor dem Beginn der Messung zum Teil zersetzt und einen Teil seines Kristallwassers abgegeben hat. Die im Vergleich zum ACC geringere Dehydratationstemperatur zeigt deutlich, dass Ikait instabiler ist.



**Abbildung 32:** Thermogramm von Ikait (von 30-1200 °C bei einer Heizrate von 2 K min<sup>-1</sup>); die erste Stufe von 30-85 °C zeigt die Wasserabgabe an, während die zweite Stufe von 550-740 °C dem CO<sub>2</sub>-Verlust aus dem Carbonat zuzuordnen ist.

Zusätzlich zur thermogravimetrischen Analyse wurden DSC-Messungen durchgeführt. Die DSC-Kurve (Abbildung 33) zeigt zwei Peaks, die jeweils endothermen Vorgängen zuzuordnen sind. Der erste Peak liegt im Bereich von 34-43 °C, der zweite Peak von 107-130 °C. Die Peakflächen entsprechen 1,21 kJ g<sup>-1</sup>, woraus über die molare Verdampfungsenthalpie von Wasser (40,66 kJ mol<sup>-1</sup>) ein Wassergehalt von 53,6 Gew.-% berechnet wurde. Dieser Wert stimmt recht gut mit dem theoretischen Wert von 51,9 Gew.-% überein. Dabei entspricht der erste Peak ungefähr der Abgabe eines Wassermoleküls,

während der intensivere zweite Peak die Abgabe von fünf Wassermolekülen angibt. Dies bedeutet, dass Ikait sich in zwei Stufen zersetzt und ein Calciumcarbonat-Pentahydrat als Zwischenstufe auftritt. In der Literatur wird die Abgabe des Strukturwassers ebenfalls in zwei Stufen beschrieben, wobei sich MHC als Zwischenstufe bildet, das dann bei ca. 200 °C sein Kristallwasser abgibt und sich zu Calcit umwandelt <sup>[54]</sup>.



**Abbildung 33:** DSC-Messung von Ikait (Messbereich: -50-250 °C; Heizrate: 5 K min<sup>-1</sup>).

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der TG-Analyse (Mittelwerte aus vier unterschiedlichen Proben) und Calciumbestimmung von Ikait.

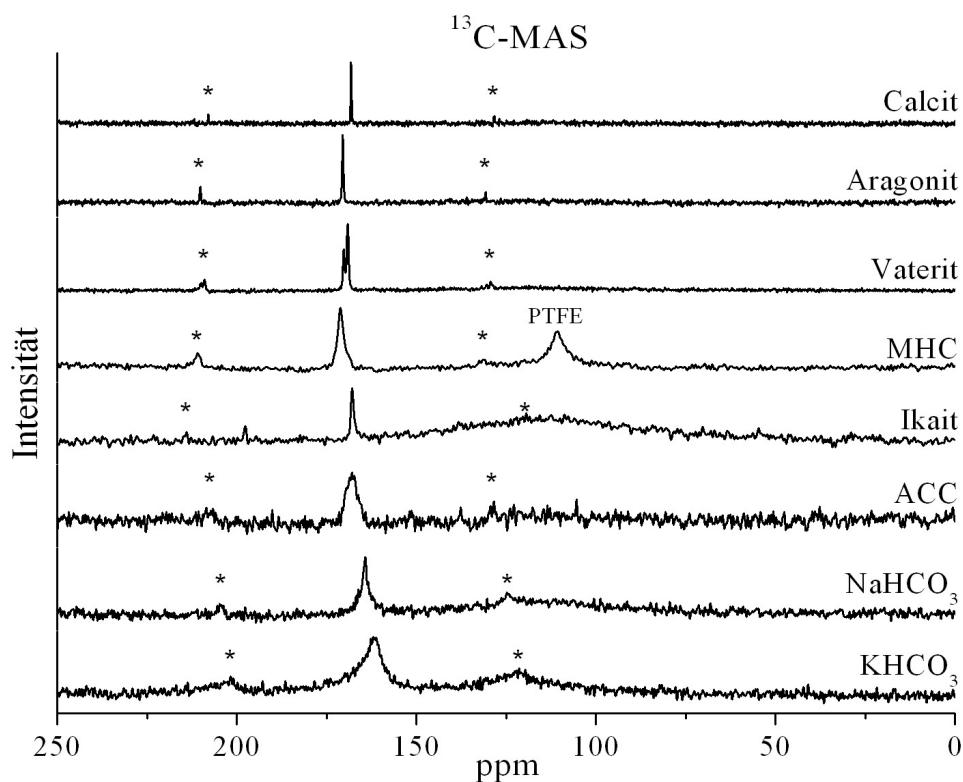
	experimenteller Wert	theoretischer Wert
Calcium / Gew.-% (AAS)	25,4	19,3
Wassergehalt / Gew.-% (TGA)	44,6	51,9
CO <sub>2</sub> -Abgabe / Gew.-% (TGA)	21,6	21,4

### 4.1.3 Festkörper-NMR-Spektroskopie an Calciumcarbonat-Phasen

Die fünf kristallinen Calciumcarbonat-Phasen Calcit, Aragonit, Vaterit, Monohydrocalcit, Ikait und das ACC wurden mit Festkörper-NMR-Spektroskopie untersucht. Ziel war es Informationen über die Struktur des ACC zu erhalten, da hier Beugungsmethoden nicht anwendbar sind und Festkörper-NMR-Spektroskopie eine geeignete Methode ist, um die Struktur röntgenamorpher Substanzen zu analysieren. Die drei wasserfreien polymorphen Phasen wurden von Herrn Holger Nebel synthetisiert. Als Vergleichssubstanzen dienten Natrium- und Kaliumhydrogencarbonat sowie Calciumhydroxid.

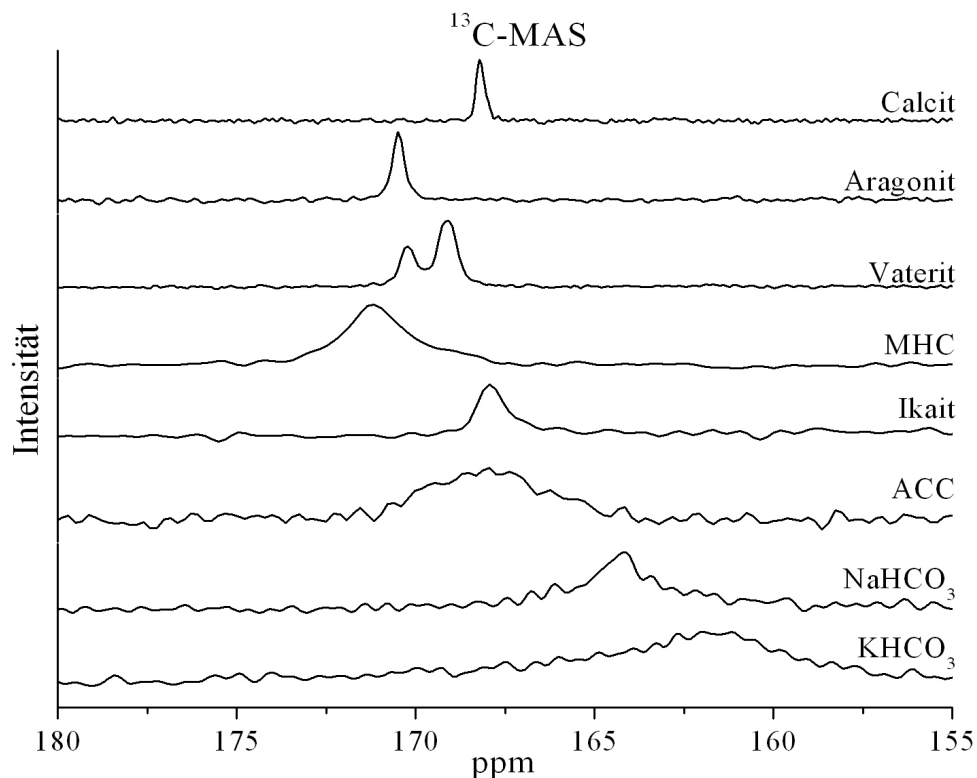
Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aller Proben zeigen nur Peaks im Bereich einer chemischen Verschiebung von 162-171 ppm, die Carbonat oder Hydrogencarbonat zugeordnet werden können (Abbildungen 34 und 35). Während die Peaks der wasserfreien Phasen sehr schmal sind, sind die der wasserhaltigen Phasen deutlich breiter. Die geringe Peakbreite bei den drei wasserfreien kristallinen Phasen ist auf die geringen Unterschiede in der chemischen Umgebung des Carbonats zurückzuführen. Die große Linienbreite beim ACC (3,5 ppm) ist dagegen eine Folge seiner amorphen Eigenschaften, wodurch das Carbonat statistisch verteilt in unterschiedlich chemischen Umgebungen auftritt. Aufgrund der Tatsache, dass es eine klare Unterteilung der Peakregionen für Carbonat (166-174 ppm) und für Hydrogencarbonat (unter 166 ppm) gibt und der Peak von ACC bei 167,98 ppm liegt, kann angenommen werden, dass der Kohlenstoff im ACC als Carbonat vorliegt. Die Lage der Peaks von ACC und Ikait stimmt gut überein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die chemische Umgebung um das Carbonat in beiden Substanzen ähnlich ist und sich somit das ACC bei tiefen Temperaturen in Ikait umwandelt. Die große Peakbreite beim MHC (2,1 ppm) im Vergleich zu den anderen kristallinen Phasen kann auf das enthaltene Magnesium (0,32 Gew.-%) zurückgeführt werden, da bekannt ist, dass die Linienbreite linear mit

steigendem Magnesiumgehalt zunimmt<sup>[187]</sup>. Die Unterschiede in der chemischen Verschiebung im  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR sind im Fall von Carbonaten entweder auf das jeweilige Kation, das sich in unmittelbarer Nähe des Kohlenstoffs befindet, oder auf eine Änderung der Kristallstruktur zurückzuführen. Die chemische Verschiebung nimmt mit steigendem Kationenradius leicht zu (z. B. 168,4 ppm für  $\text{Li}_2\text{CO}_3$  und 169,8 ppm für  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Die unterschiedlichen Kristallstrukturen und die geringen Unterschiede der durchschnittlichen C-O-Bindungslängen in den verschiedenen Calciumcarbonat-Phasen haben nur einen geringen Effekt auf die paramagnetische Entschirmung. Folglich liegen die Werte der chemischen Verschiebung in einem so engen ppm-Bereich<sup>[187]</sup>.



**Abbildung 34:**  $^{13}\text{C}$ -MAS-Spektren der fünf kristallinen Calciumcarbonatphasen und von ACC, ebenfalls zum Vergleich von Natrium- und Kaliumhydrogencarbonat; \* kennzeichnet Rotationsseitenbanden; PTFE= Peak von Polytetrafluorethylen (Teflon), das als Füllmaterial benutzt wurde.



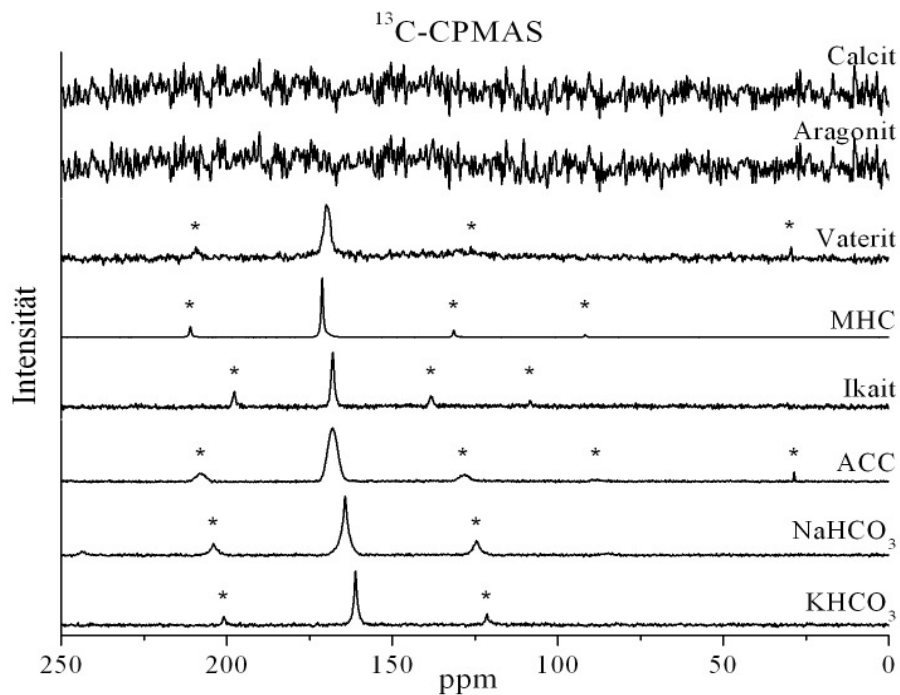


**Abbildung 35:** Vergrößerung der Carbonatregion der  $^{13}\text{C}$ -MAS-NMR Spektren.

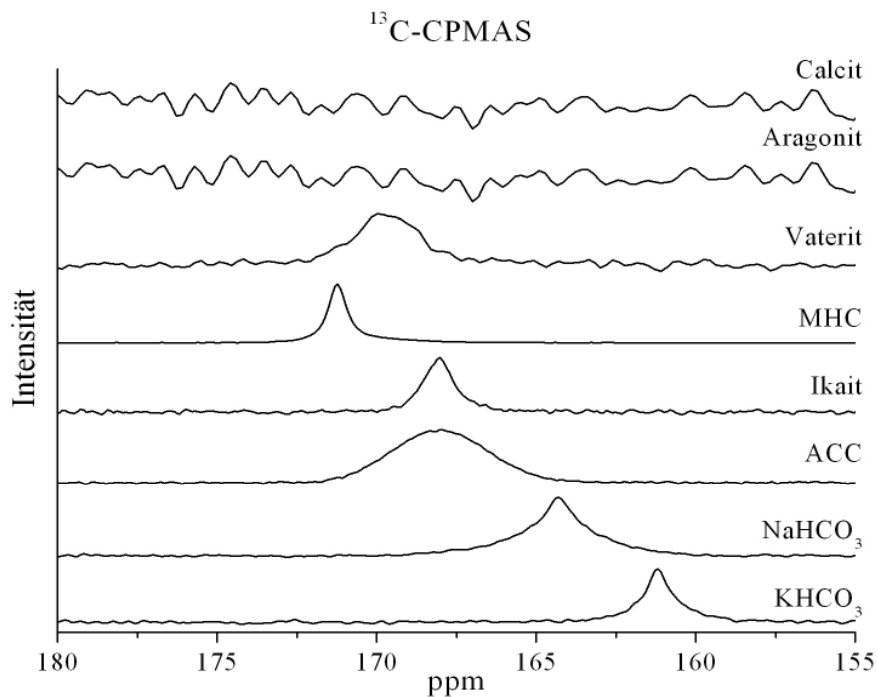
Zusätzlich wurden  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren mit Kreuzpolarisation (CP) aufgenommen. Die  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-Spektren (Abbildungen 36 und 37) zeigen nur Kohlenstoffatome an, die sich in der Nähe von Protonen befinden. Die Peaks dieser Kohlenstoffatome sind durch die Kopplung mit den Protonen intensiver im Vergleich zu den  $^{13}\text{C}$ -MAS-Spektren. Die beiden wasserfreien Phasen Calcit und Vaterit weisen wie erwartet kein Signal auf. Dies steht jedoch im Widerspruch zu Untersuchungen an synthetischem Calcit von Feng et al., die im  $^{13}\text{C}$ -CPMAS ein Signal bei 168,7 ppm gefunden haben und es Spuren an Hydrogencarbonat zugeordnet haben <sup>[188]</sup>. Dagegen zeigen die anderen Phasen, die entweder Wasser oder Hydrogencarbonat enthalten, definierte Peaks. Der Peak im  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-Spektrum bei 168 ppm für ACC im Vergleich zu 164 ppm für  $\text{NaHCO}_3$  bzw. 161 ppm für  $\text{KHCO}_3$  deutet daraufhin, dass ACC ausschließlich Wasser als Protonenquelle enthält und kein Hydrogencarbonat. Erneut liegt der Peak vom ACC im Bereich der chemischen Verschiebung vom

Ikait. Dies unterstreicht, dass das ACC eine dem Ikait ähnliche chemische Umgebung aufweisen muss. Die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren aller Phasen stimmen gut mit der Literatur überein. So haben Papenguth et al. <sup>[187]</sup> an einer Reihe natürlich vorkommender und synthetischer Calciumcarbonate Untersuchungen mit Festkörper-NMR-Spektroskopie durchgeführt. Sie haben für reinen Aragonit einen Peak bei 169,9 ppm, für reinen Calcit eine durchschnittliche chemische Verschiebung im Bereich von 167,6 ppm und für Vaterit mit 9 % Calcit einen Wert von 168,7 ppm gefunden.

Eine  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Studie an Perlmutter von *Haliotis laevigata* <sup>[189]</sup> zeigte, dass zusätzlich zu dem Peak von Aragonit bei 171 ppm ein weiterer Peak bei ungefähr 170,5 ppm auftrat. Dieser Peak konnte, da er eine große Linienbreite aufwies und somit von ungeordneten Carbonatgruppen stammte, amorphem Calciumcarbonat, das sich in Form einer dünnen Schicht auf den Aragonitplättchen befand, zugeordnet werden.



**Abbildung 36:**  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-Spektren der fünf kristallinen Calciumcarbonatphasen und von ACC, ebenfalls zum Vergleich von Natrium- und Kaliumhydrogencarbonat; \* kennzeichnet Rotationsseitenbanden.



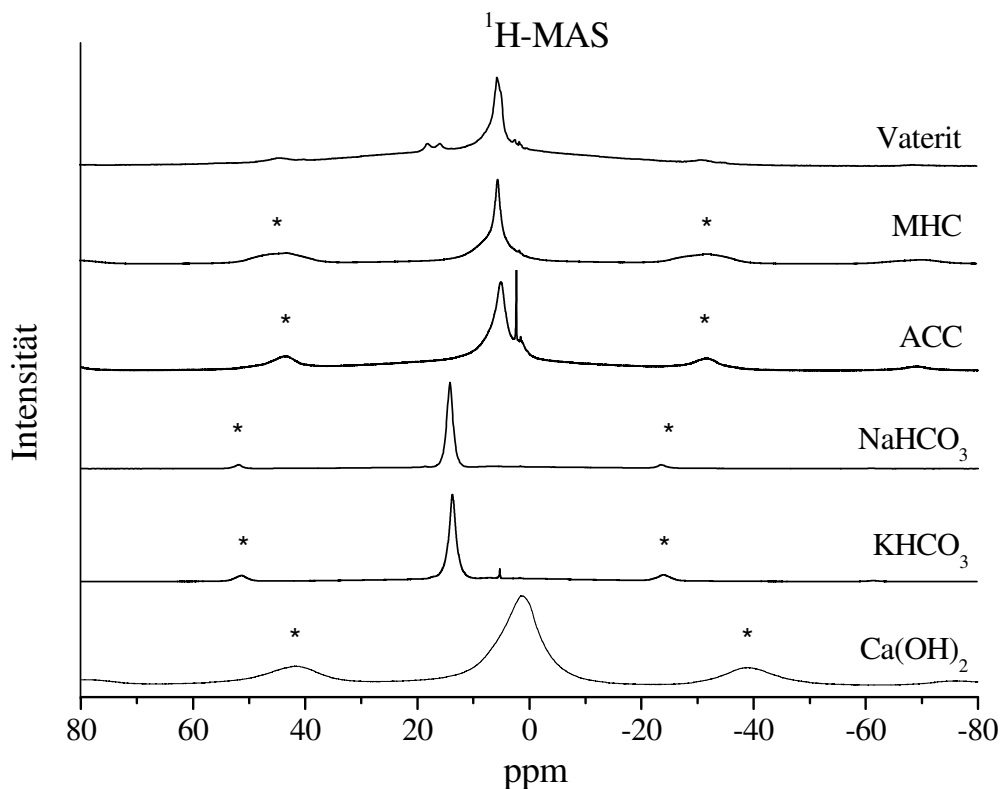
**Abbildung 37:** Vergrößerung der Carbonatregion der  $^{13}\text{C}$ -CPMAS-NMR Spektren.

Mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie kann geklärt werden, ob die im Kristall enthaltenen Protonen von Wasser oder von Hydrogencarbonat stammen. Hydrogencarbonat erscheint bei über 13 ppm, während Wasser bei ungefähr 5 ppm liegt. Es wird das Ergebnis der  $^{13}\text{C}$ -Spektren bestätigt, dass ACC nur eingeschlossenes Strukturwasser (Peak bei 5 ppm) enthält und kein Hydrogencarbonat, da im Bereich der Hydrogencarbonate, 14,1 ppm für  $\text{NaHCO}_3$  und 13,6 ppm für  $\text{KHCO}_3$ , kein Peak beim ACC zu erkennen ist (Abbildungen 38 und 39). Das Vorkommen von Strukturwasser bestätigt das Modell der wasserhaltigen Übergangsphase in der Biomineralisation, die biologisch in die kristallinen Calciumcarbonatphasen umgewandelt werden kann.

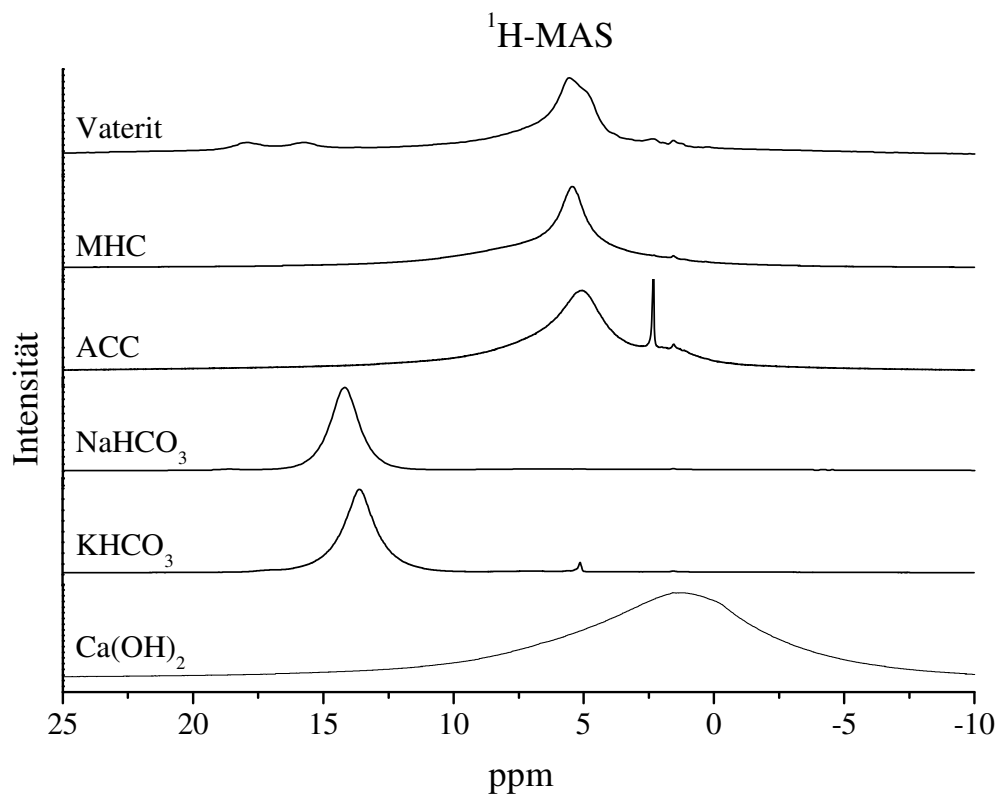
Die gemessenen chemischen Verschiebungen stimmen gut mit denen in der Literatur überein. Nassif et al. <sup>[189]</sup> haben bei ihren NMR-Studien an Perlmutter Wasser bei 5,5 ppm und einen Peak bei 14,4 ppm gefunden, der noch nicht einwandfrei einer Protonenspezies (es wird Hydrogencarbonat angenommen) zugeordnet werden konnte. Feng et al. <sup>[188]</sup> haben in ihrer Studie an synthetischem Calcit Wasser im Bereich von 4,8-6 ppm und Hydrogencarbonat bei 7,6 ppm detektiert; aus den Daten haben sie einen Gehalt von ca. 1 % an Hydrogencarbonat berechnet.

Es kann somit festgehalten werden, dass sowohl Vaterit als auch MHC und ACC Wasser als Hauptkomponente für Wasserstoff enthalten. Dass die Peaks eine große Linienbreite haben, weist auf eine geringe Mobilität des Wassers hin, d. h. das Wasser ist in die jeweilige Struktur eingebunden. Durch die geringe Mobilität des Wassers haben die Protonen eine anisotrope Umgebung, wodurch sich eine breite Verteilung der chemischen Verschiebung ergibt. Die Peaks im Bereich von 1,5-2,3 ppm werden durch Spuren an mobilem Wasser, das Hydroxid enthält, hervorgerufen. Dies wird anhand der Vergleichssubstanz Calciumhydroxid (1,57 ppm) unterstrichen und stimmt mit Werten aus der Literatur gut überein <sup>[190, 191]</sup>. Weiter wurde diese Annahme durch ein statisches

NMR-Experiment bestätigt. Die Intensität des schmalen Peaks nimmt bei einer Gradientenstärke von nur  $100 \text{ G cm}^{-1}$  schon nach 15 ms deutlich ab. Daraus kann geschlossen werden, dass die zugehörige Komponente eine sehr kleine Molmasse besitzen muss. Dazu muss die Substanz in gelöster Form vorliegen, um diesen freien Diffusionsprozess in der Probe zu ermöglichen. Eine Übersicht aller NMR-Daten zeigt Tabelle 10.



**Abbildung 38:**  $^1\text{H}$ -MAS-Spektren der wasserhaltigen Calciumcarbonatphasen; als Vergleichssubstanzen wurden Natrium- und Kaliumhydrogencarbonat und Calciumhydroxid gewählt. Der schmale Peak bei 2,32 ppm im Fall von ACC wird vermutlich von einer geringen Menge an mobilem Wasser, das gelöstes Hydroxid enthält, hervorgerufen.



**Abbildung 39:** Vergrößerung der  $^1\text{H}$ -MAS Spektren.

**Tabelle 10:** NMR-Daten aller untersuchten Phasen; alle Werte sind in ppm angegeben; die Linienbreite ist als Halbwertsbreite in ppm angegeben.

Phase	Calcit	Aragonit	Vaterit	Monohydrocalcit	Ikait	Amorphes Calciumcarbonat (ACC)	NaHCO <sub>3</sub>	KHCO <sub>3</sub>	Ca(OH) <sub>2</sub>
<sup>13</sup> C MAS / chemische Verschiebung	168,21	170,49	170,12 169,07	171,10	167,98	167,98	164,47	161,94	-
<sup>13</sup> C MAS / Linienbreite	0,25	0,36	0,73 0,63	2,08	0,89	3,53	2,25	5,67	-
<sup>13</sup> C CPMAS / chemische Verschiebung	-	-	169,70	171,19	167,83	167,99	164,32	161,15	-
<sup>13</sup> C CPMAS / Linienbreite	-	-	2,13	0,7	1,05	3,01	2,13	1,10	-
<sup>1</sup> H MAS / chemische Verschiebung	-	-	5,56 2,34 1,56	5,43 1,55	-	5,01 2,32 1,53	14,16 1,57	13,56 5,13 1,54	1,57
<sup>1</sup> H MAS / Linienbreite	-	-	1,79 - 0,22	1,65 0,11	-	1,80 0,05 0,12	1,22 0,20	1,42 0,13 0,14	7,8

## **4.2 Knochenersatzmaterialien**

### **4.2.1 Zelltests an synthetischem Knochenersatzmaterial**

Es wurden nanokristalliner Hydroxylapatit (HAP) bzw. Carbonatapatit (CHAP), die in ihrer chemischen Zusammensetzung dem menschlichen Knochenmineral<sup>[14, 155]</sup> sehr ähnlich sind, hergestellt. Vom Carbonatapatit wurden Proben mit unterschiedlichem Carbonatgehalt synthetisiert; die genaue Zusammensetzung der untersuchten Proben ist in Tabelle 11 zusammengefasst. Das Pulver wurde zu Presslingen verarbeitet. Zudem wurden poröse Proben hergestellt. Die Poren wurden durch das Mischen von CHAP-Pulver mit Natriumchlorid und Polyvinylalkohol-Fäden (PVA) und anschließendem Herauswaschen dieser beiden Substanzen in die Presslinge eingebracht.

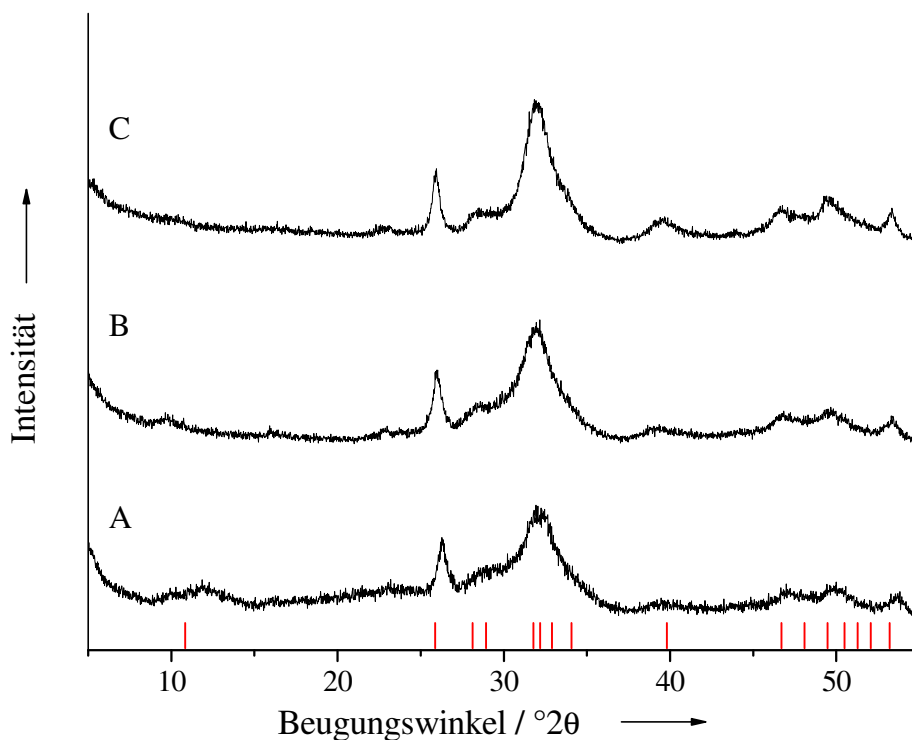
Das biologische Verhalten synthetischer Materialien hängt von einer Reihe an Faktoren ab, dies sind die chemische Zusammensetzung, die Morphologie und die Biodegradierbarkeit. Um die Biokompatibilität des Materials zu untersuchen, wurden Osteoblastentests an kompakten und porösen Proben (in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Manuela Wülling vom Zentrum für Medizinische Biotechnologie (ZMB) in Essen) durchgeführt. Zudem wurde das Material mittels Osteoklastentests (in Zusammenarbeit mit Herrn Rainer Detsch vom Friedrich-Baur-Institut für Biomaterialien (FBI) in Bayreuth) auf seine Resorbierbarkeit hin überprüft. Für die Zelltests wurden Presslinge angefertigt (Durchmesser: 13 mm; Dicke: ca. 1 mm), die zuvor zur Sterilisation autoklaviert werden mussten. Um ausschließen zu können, dass sich die Kristallinität der Proben durch das Autoklavieren (bei 134 °C 30 Minuten lang) veränderte, wurden vorher und nachher Pulverdiffraktogramme (Abbildung 40) sowie IR-Spektren (Abbildung 41) aufgenommen. Die Materialien sind auch nach dem Autoklavieren weiterhin nanokristallin und bestehen aus sphärischen Partikeln, die zum Teil agglomeriert sind (Abbildung 42). Mittels IR-Spektroskopie wurde das Ergebnis der Pulverdiffraktometrie bestätigt. Zudem konnte festgestellt werden, dass die porösen Proben kein Polyvinylalkohol (PVA) mehr enthalten,



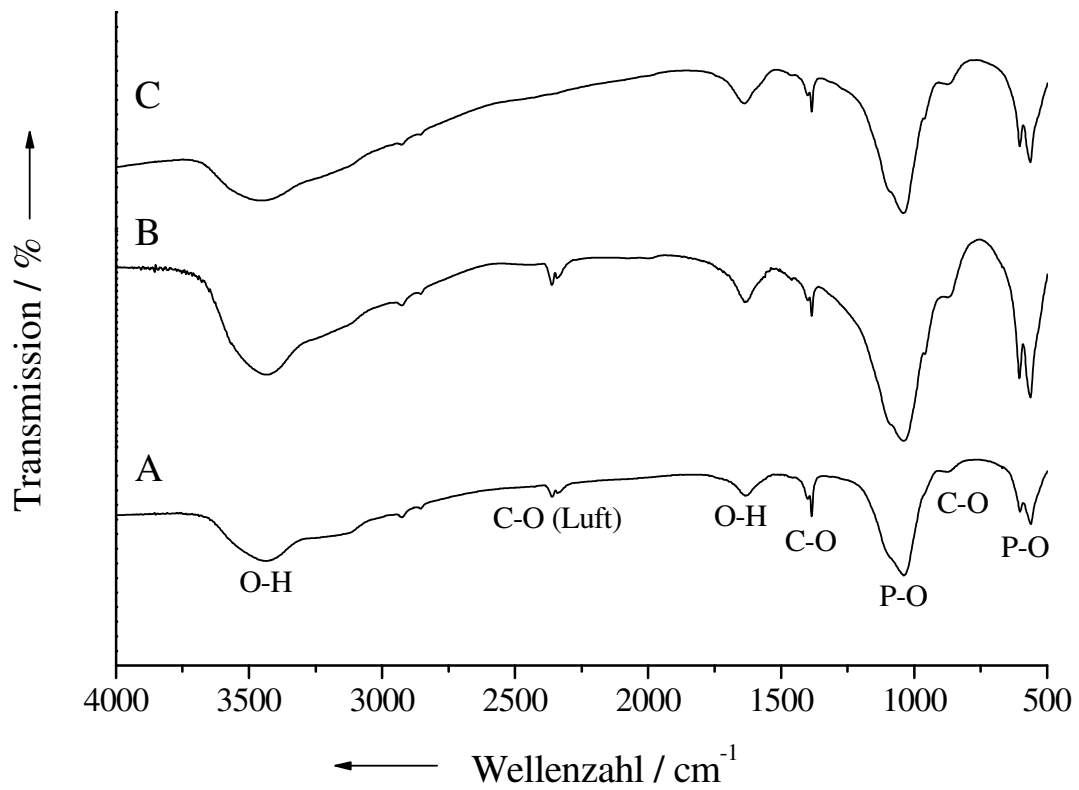
da ausschließlich Phosphat-, Carbonat- und Wasserbanden im IR-Spektrum zu sehen sind (Abbildung 41).

**Tabelle 11:** Zusammensetzung der Apatit-Phasen für die Osteoblasten- und Osteoklastentests.

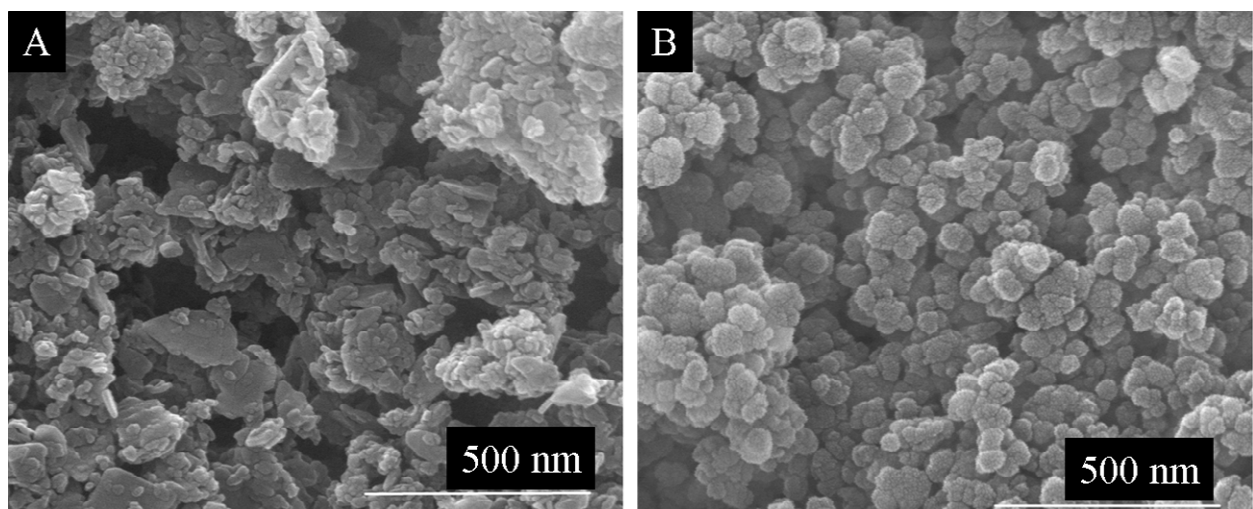
	HAP 08	CHAP 17	CHAP 22	CHAP 23
Calcium / Gew.-% (AAS)	33,0	32,3	32,7	32,6
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> / Gew.-% (UV)	53,2	55,0	56,6	54,4
Ca:PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -Verhältnis (n:n)	1,47	1,39	1,37	1,42
Wassergehalt / Gew.-% (TGA)	11,2	8,3	9,5	9,0
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> -Gehalt / Gew.-% (TGA)	0,52	1,5	1,0	0,7



**Abbildung 40:** Pulverdiffraktogramme von A) nanokristallinem HAP (HAP08); B) nanokristallinem Carbonatapatit (CHAP 23) vor dem Autoklavieren; C) nanokristallinem Carbonatapatit (CHAP 23) nach dem Autoklavieren. Es ist zu erkennen, dass sich die Kristallinität durch das Autoklavieren nicht verändert hat. Die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr. 76-0694).



**Abbildung 41:** IR-Spektren von Carbonatapatit (CHAP 23) vor (A) und nach (B: kompakt und C: porös) dem Autoklavieren.



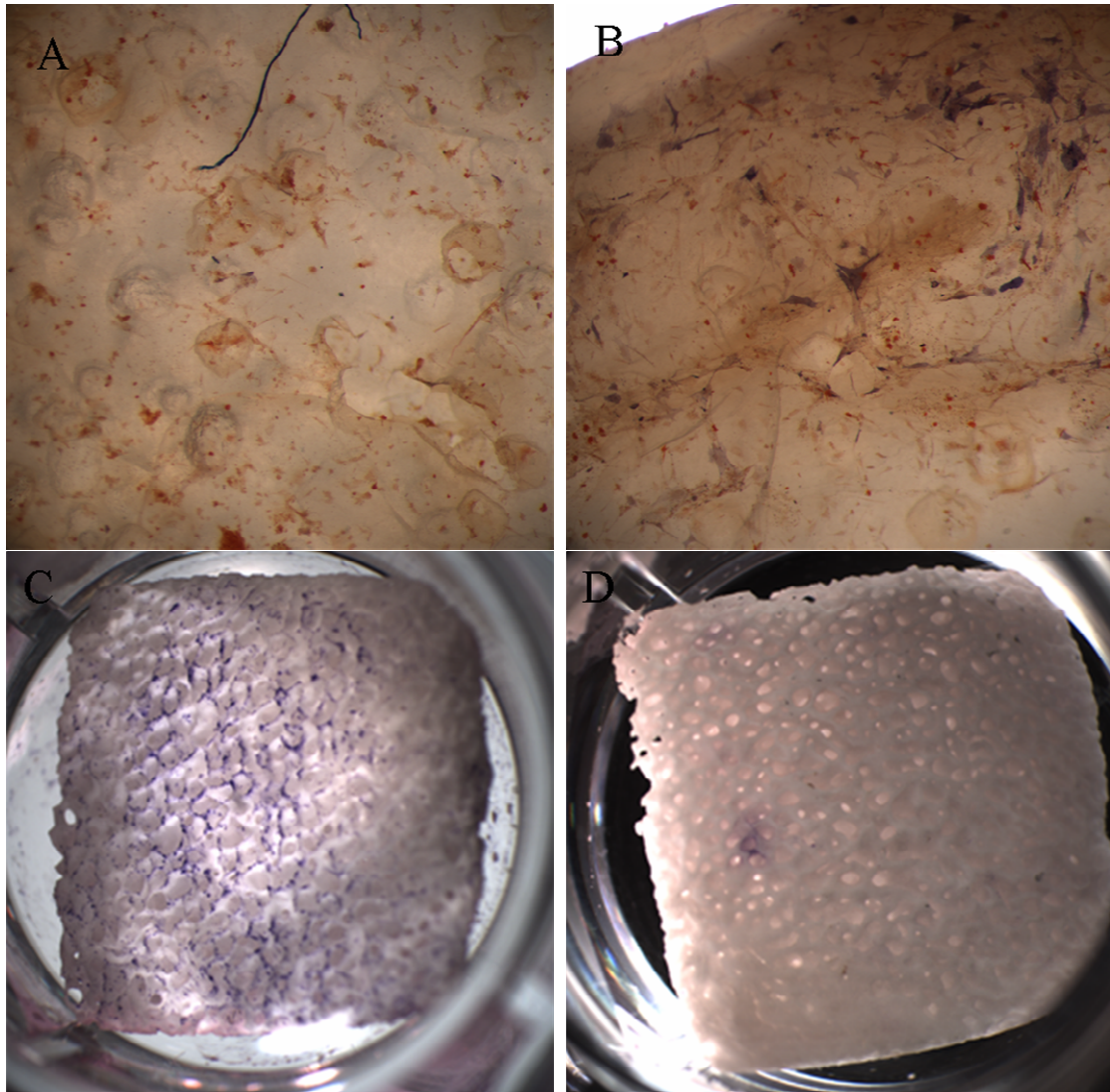
**Abbildung 42:** REM-Bilder von A) nanokristallinem Hydroxylapatit (HAP08) und B) amorphem Carbonatapatit (CHAP27).

### **Osteoblastentests**

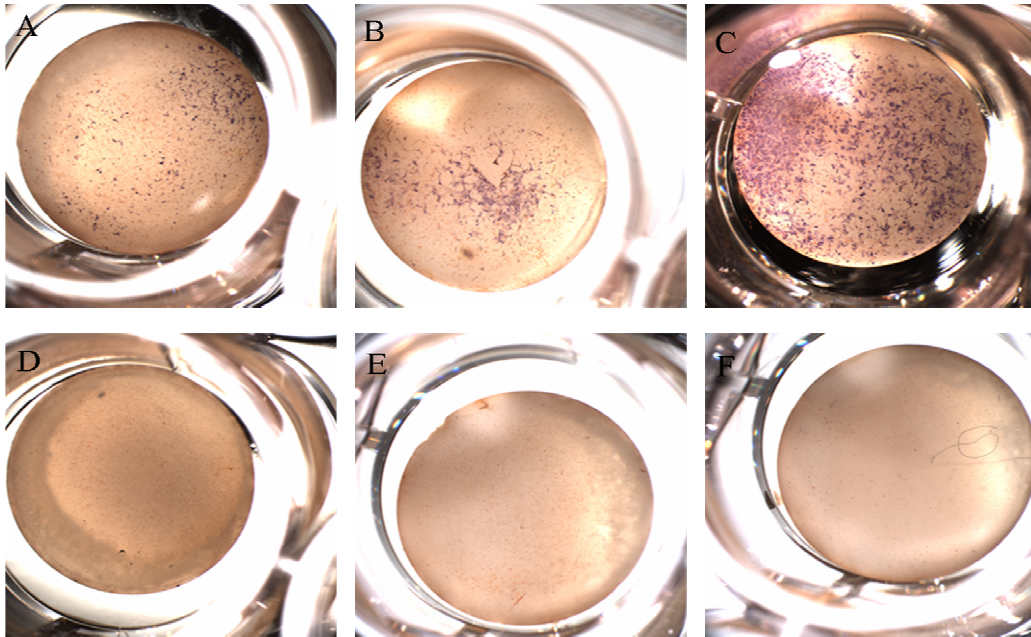
Um zu überprüfen, ob die Materialien biokompatibel sind, d. h. das Material zum körpereigenen Gewebe verträglich ist, wurden Osteoblastentests sowohl an kompakten als auch porösen Proben durchgeführt. Zum Vergleich wurden die Tests zudem mit Cerabone<sup>®</sup> (eine Hydroxylapatit-Keramik aus Rinderknochen) gemacht<sup>[20]</sup>. Für die Zelltests wurden mesenchymale Zellen aus Mäusen gewonnen. Diese wurden sowohl undifferenziert für die Tests verwendet als auch gezielt zu Osteoblasten differenziert.

Es zeigt sich, dass auf den Carbonatapatit-Materialien (CHAP) die undifferenzierten Zellen nur langsam zu Osteoblasten differenzieren. Die differenzierten Zellen dagegen wachsen und proliferieren sehr gut auf den Materialien CHAP 22 und CHAP 23 (Abbildungen 44 und 45 zeigen die Alkalische Phosphatase-Färbung). Auf der Probe CHAP 17 proliferieren die differenzierten Zellen schlechter. Da der einzige Unterschied im Vergleich zu den anderen beiden Proben der höhere Carbonatgehalt ist, muss dieser für die schlechtere Proliferation verantwortlich sein. Redey et al.<sup>[193]</sup> stellten in ihren Untersuchungen zum Verhalten von Osteoblasten auf HAP und Carbonatapatit fest, dass die Zellen auf dem Carbonatapatit weniger gut haften blieben, jedoch konnten sie keine schlechtere Proliferation der Osteoblasten auf dem Carbonatapatit beobachten. Auch auf den porösen Proben wachsen und proliferieren die Zellen gut. Auf der Oberfläche sind weniger Zellen im Vergleich zu den kompakten Proben zu sehen. Es ist jedoch zu erkennen, dass ein Teil der Osteoblasten durch die Poren in das Material eingedrungen ist (Abbildung 43). Dies ist im Hinblick darauf, dass eine poröse Struktur das Einwachsen von Gewebe ermöglicht und damit eine schnellere Knochenregeneration nach sich zieht, ein vielversprechendes Ergebnis<sup>[194-196]</sup>. Auf dem Cerabone<sup>®</sup> (Abbildung 43), das aus gesintertem Hydroxylapatit bovinen Ursprungs besteht, differenzieren die Osteoblasten im Vergleich zu den

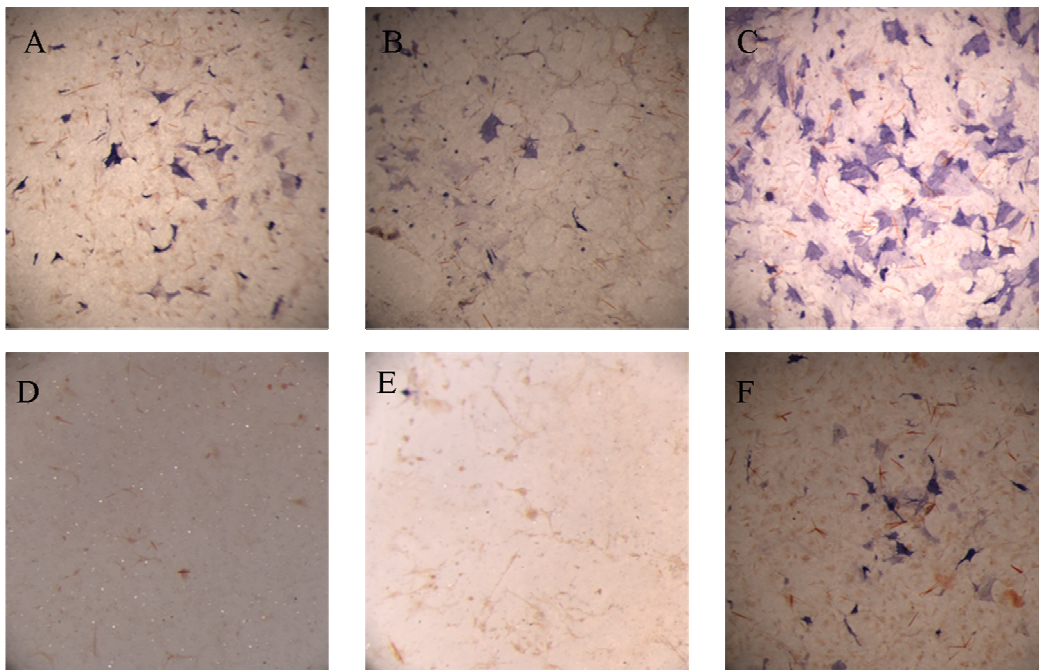
CHAP-Materialien auch ohne Differenzierungsmedium gut; sie proliferieren darauf jedoch schlechter.



**Abbildung 43:** AP-Färbung differenzierter Osteoblasten auf nanokristallinem, porösem Carbonatapatit (CHAP 17, 50fache Vergrößerung): A) nach einer Woche; B) nach 3 Wochen (Quelle: Dr. M. Wüiling ZMB Essen). Zudem ist die AP-Färbung von Osteoblasten auf Cerabone® zu sehen (10fache Vergrößerung): C) Zellen in Differenzierungsmedium nach 3 Wochen; D) Zellen ohne Differenzierungsmedium nach 3 Wochen (Quelle: Dr. M. Wüiling ZMB Essen).



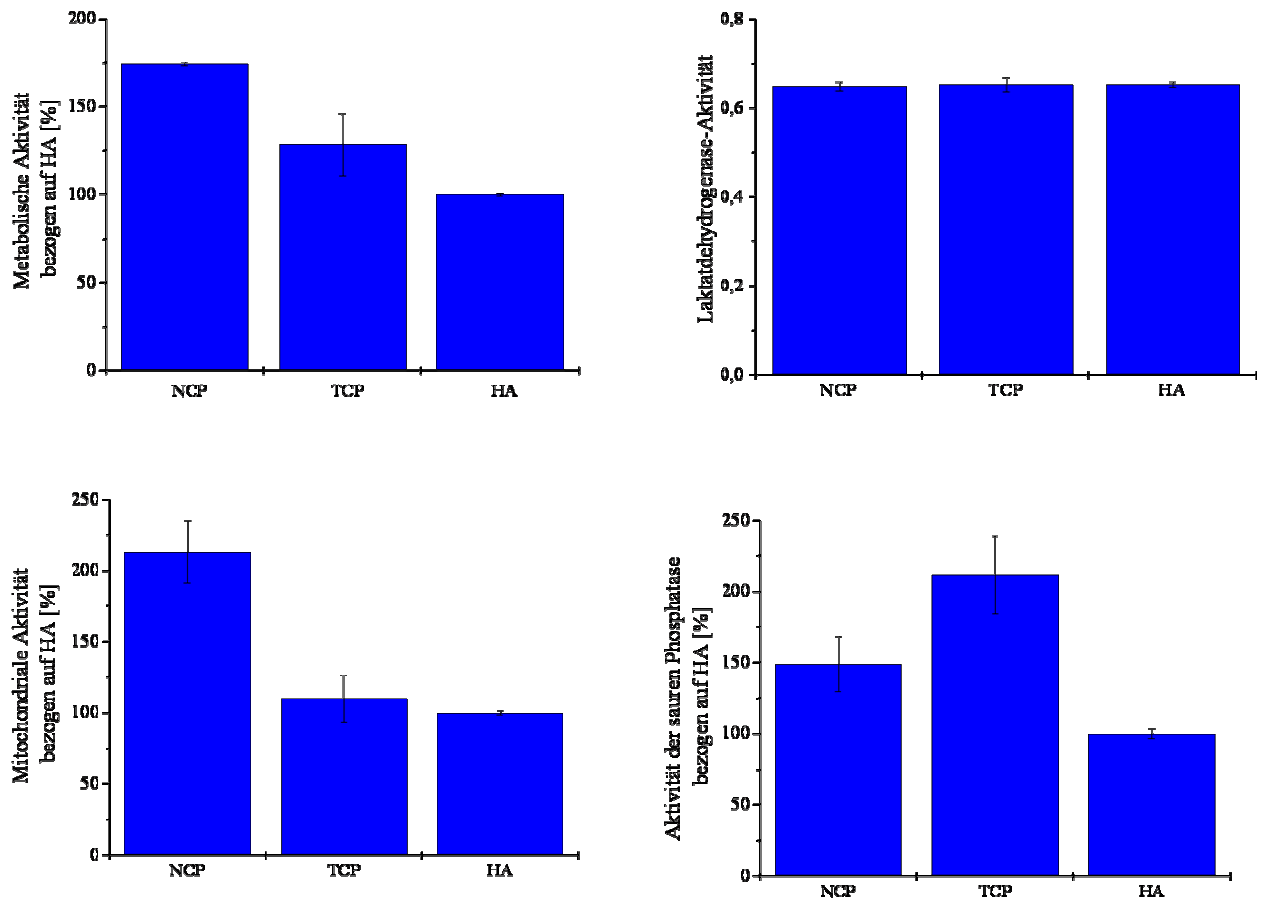
**Abbildung 44:** AP-Färbung der Osteoblasten auf nanokristallinem Carbonatapatit (CHAP23, 10fache Vergrößerung): Zellen in Differenzierungsmedium nach einer Woche (A), 2 Wochen (B) und 3 Wochen (C); Zellen ohne Differenzierungsmedium nach einer Woche (D), 2 Wochen (E) und 3 Wochen (F) (Quelle: Dr. M. Wülling ZMB Essen)



**Abbildung 45:** AP-Färbung der Osteoblasten auf nanokristallinem Carbonatapatit (CHAP23, 100fache Vergrößerung): Zellen in Differenzierungsmedium nach einer Woche (A), 2 Wochen (B) und 3 Wochen (C); Zellen ohne Differenzierungsmedium nach einer Woche (D), 2 Wochen (E) und 3 Wochen (F) (Quelle: Dr. M. Wülling ZMB Essen)

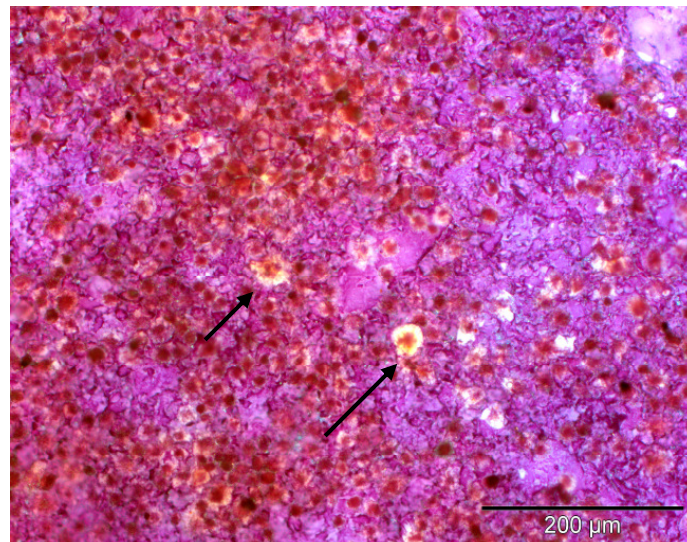
### **Osteoklastentests**

Ideale Knochenersatzmaterialien müssen resorbierbar sein, damit sich mit der Zeit das implantierte Material wieder abbaut und sich neuer autologer Knochen bilden kann. Die zelluläre Resorption, die essentiell für ein gesteuertes Remodelling ist, wurde *in vitro* untersucht. Für die Resorptionsuntersuchungen wurde das Material (nanokristalliner Carbonatapatit, HAP08) mit einer Monozyten-Zelllinie (Durchführung der Zelltests durch Herrn Detsch) über 14 Tage inkubiert. Die Zellzahl auf dem Material, die durch die Laktatdehydrogenase-Aktivität ermittelt wurde, unterschied sich nicht von der Zellzahl auf unterschiedlichen Referenzmaterialien ( $\beta$ -TCP, mikrokristalliner Hydroxylapatit (HA)). Es konnte weiter gezeigt werden, dass sowohl die metabolische (Maß für die Lebensfähigkeit der Zellen) als auch die mitochondriale Aktivität (Maß für die Proliferationsrate der Zellen) der Zellen auf HAP08 im Vergleich zu den Referenzmaterialien erhöht sind. Dies zeigt, dass die Zellen auf dem Material besser lebensfähig sind und auch eine höhere Proliferation zeigen. Die Aktivität der sauren Phosphatase, die ein Marker für die Osteoklasten ist, ist beim HAP08 im Vergleich zum HA deutlich erhöht (Abbildung 46). All diese Parameter weisen darauf hin, dass die Zellen auf dem HAP08 besonders aktiv sind.



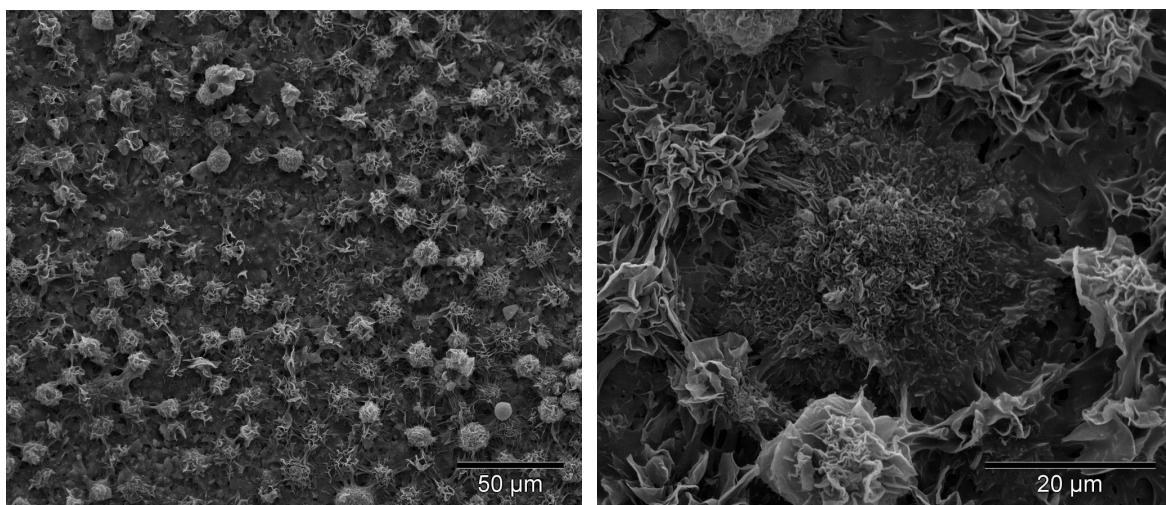
**Abbildung 46:** Metabolische Aktivität, Mitochondriale Aktivität, Laktatdehydrogenase-Aktivität und Aktivität der sauren Phosphatase von HAP08 (=NCP) im Vergleich zu  $\beta$ -TCP und mikrokristallinem Hydroxylapatit (HA) (Quelle: R.Detsch FBI Bayreuth).

Um zu klären, ob sich die Monozyten auf dem Material zu osteoklastären Zellen entwickelt haben, wurde nach 14 Tagen die für Osteoklasten spezifische TRAP-Färbung (engl.: *tartrate resistant acid phosphatase*) durchgeführt. Es konnte nachgewiesen werden, dass auf HAP08 die Monozyten differenzieren und sich zu TRAP-positiven, osteoklastären, mehrkernigen Zellen entwickelt haben (Abbildung 47). Im Vergleich zu den beiden Referenzmaterialien ist hier kein Unterschied in der TRAP-Färbung zu erkennen, d. h. die Differenzierung der Monozyten zu Osteoklasten findet auf allen Materialien gleichermaßen statt.



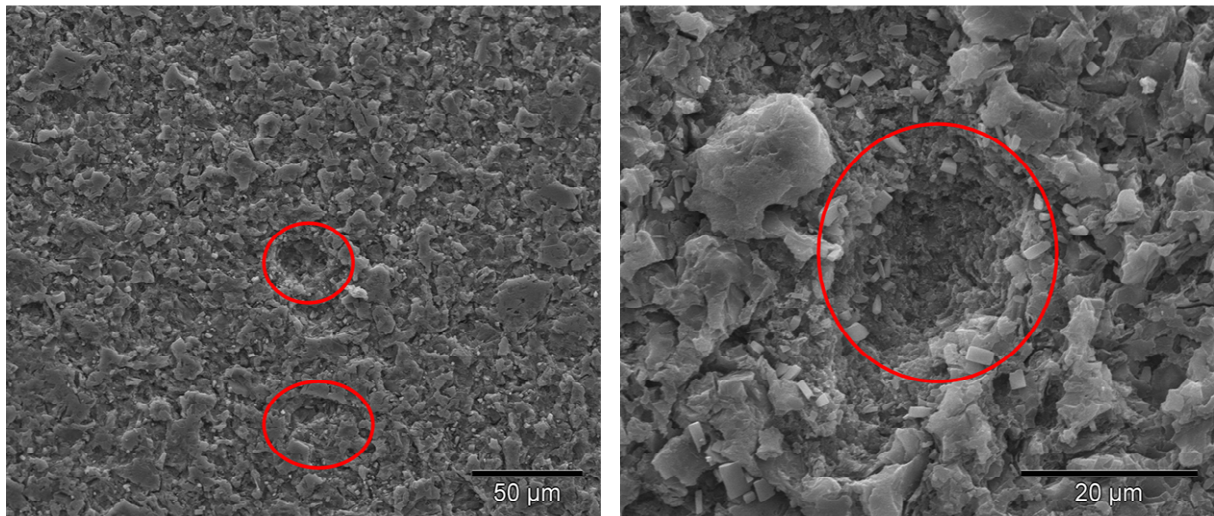
**Abbildung 47:** TRAP-Färbung der Osteoklasten-Zellkultur auf HAP08 nach 14 Tagen; Pfeile zeigen TRAP-positive osteoklastäre Zellen an (helle Färbung); dunkle Färbung: nicht differenzierte TRAP-negative Monozyten (Quelle: R.Detsch FBI Bayreuth)

REM-Aufnahmen nach 14 Tagen zeigen eine dichte Besiedlung des Materials mit Zellen, sowohl Monozyten als auch Osteoklasten. Die Morphologie der osteoklastären Zellen deutet ebenfalls auf eine hohe Aktivität hin (Abbildung 48). Die dichte Besiedlung mit Osteoklasten zeigt, dass HAP08 sowohl eine gute Biokompatibilität als auch eine gute Bioaktivität besitzt.



**Abbildung 48:** REM-Bilder der Zellkultur auf HAP08 nach 14 Tagen. Das Material ist dicht besiedelt; differenzierte Zellen zeigen die typische Morphologie von Osteoklasten (Quelle: R.Detsch FBI Bayreuth)



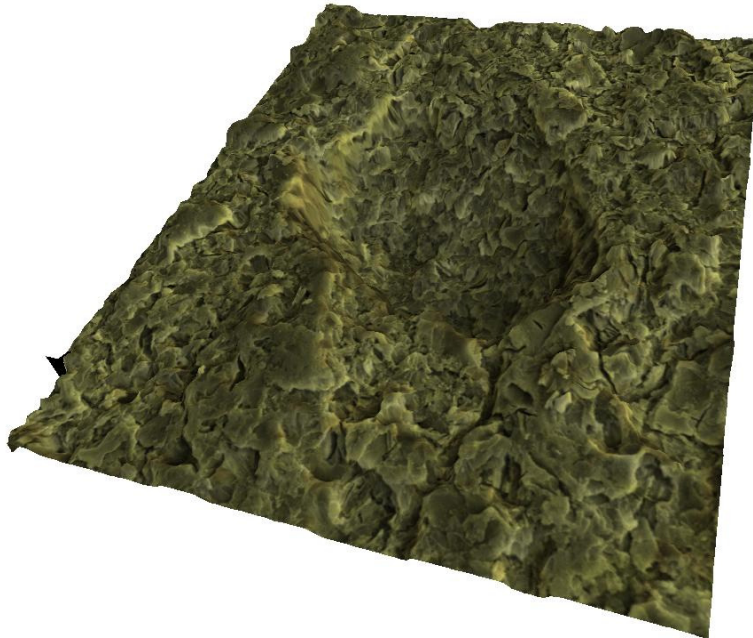


**Abbildung 49:** REM-Bilder von HAP08 nach 14 Tagen Zellkultur; die Zellen wurden vom Material abgewaschen, wodurch die Resorptionslakunen erkennbar wurden (Quelle: R.Detsch FBI Bayreuth).

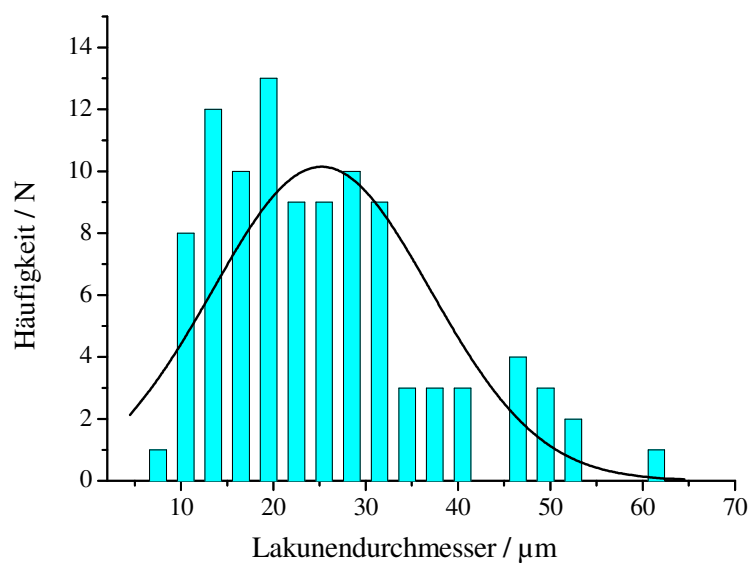
Nachdem die Zellen vom Material abgewaschen wurden, waren mehrere Resorptionslakunen auf dem Material zu erkennen (Abbildung 49). Das resorbierte Material wurde von den Zellen aufgenommen und durch sie hindurchgeschleust (Exozytose). Aus den REM-Bildern wurde ein dreidimensionales Bild konstruiert und eine maximale Lakumentiefe von 17,6 µm und ein maximaler Lakunendurchmesser von 52 µm ermittelt (Abbildung 50). Die Verteilung der Lakunendurchmesser wird in Abbildung 51 gezeigt. Der Großteil der Durchmesser liegt im Bereich von ca. 20-30 µm, der durchschnittliche Wert liegt bei 25,1 µm.

Die Ergebnisse bedeuten jedoch nicht, dass das Material auch *in vivo* resorbiert wird; hier müssten entsprechende Tests durchgeführt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass nach 6 Monaten nur 5 % der untersuchten Biomaterialien auf HAP-Basis auch *in vivo* resorbiert wurden <sup>[197]</sup>. Zudem ist unklar, ob auch die Osteoblasten in die Resorptionslakunen folgen und dort neuen Knochen bilden. Es kann festgehalten werden, dass sich sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten aus Vorläuferzellen auf dem Material bilden

und dort aktiv sind. Das Material ist somit osteoinduktiv, biokompatibel und resorbierbar.



**Abbildung 50:** 3D-Darstellung einer Resorptionslakune auf HAP08 nach 14 Tagen Osteoklastenkultur (Quelle: R.Detsch FBI Bayreuth)



**Abbildung 51:** Verteilung der Häufigkeit der Lakunendurchmesser auf HAP08 nach 14 Tagen Osteoklastenkultur (Quelle: R.Detsch FBI Bayreuth)

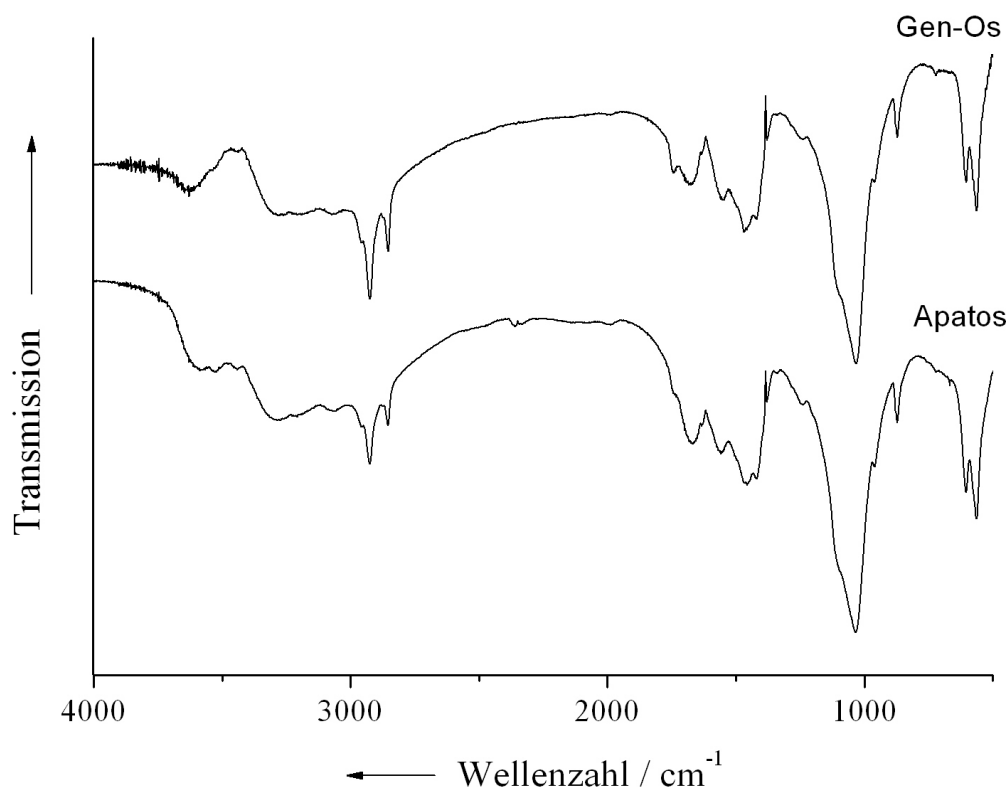
#### 4.2.2 Analyse von zwei Knochenersatzmaterialien

Es wurden die beiden Knochenersatzmaterialien Apatos und Gen-Os der Firma TecnoSS (Abbildung 52) mit unterschiedlichen Methoden (IR, TG, XRD, Elementaranalyse, REM und TEM) analysiert. Apatos, das eine mikroporöse Struktur hat, besteht dem Hersteller zufolge aus Hydroxylapatit, gewonnen aus kortikalem und spongiösem Schweineknöchel. Apatos findet Anwendung in der Kieferchirurgie, Periodontologie und in der Implantologie (als universelles Füllmaterial). Die organischen Substanzen, vor allem Proteine, wurden beim Herstellungsverfahren entfernt. Dagegen enthält Gen-Os, das auch ein Gemisch aus kortikalem und spongiösem Schweineknöchel ist, nach Herstellerangaben zusätzlich das noch im Knochen enthaltene Kollagen. Der Anwendungsbereich von Gen-Os entspricht dem des Apatos. Bei beiden Materialien beträgt die Resorptionszeit ungefähr 4 Monate.



**Abbildung 52:** Apatos-Pulver zur Veranschaulichung der Probenbeschaffenheit; Gen-Os ist ebenfalls ein weißes Pulver.

Die beiden Materialien wurden mit IR-Spektroskopie charakterisiert. Die IR-Spektren zeigen, dass sowohl Apatos als auch Gen-Os aus Hydroxylapatit und organischem Material, wahrscheinlich Kollagen, bestehen. Zudem sind C-O-Valenzschwingung und Deformationsschwingungen zu sehen, was darauf hindeutet, dass der Hydroxylapatit Carbonat enthält. Die Breite der Signale weist auf die Nanokristallinität beider Substanzen hin. Die Spektren der beiden Proben unterscheiden sich nur geringfügig in der Lage der jeweiligen Banden (Abbildung 53 und Tabelle 12). Die IR-Untersuchungen bestätigen die Angaben des Herstellers, dass Gen-Os Kollagen enthält. Jedoch konnte entgegen der Herstellerangaben auch in Apatos ein organischer Anteil nachgewiesen werden.

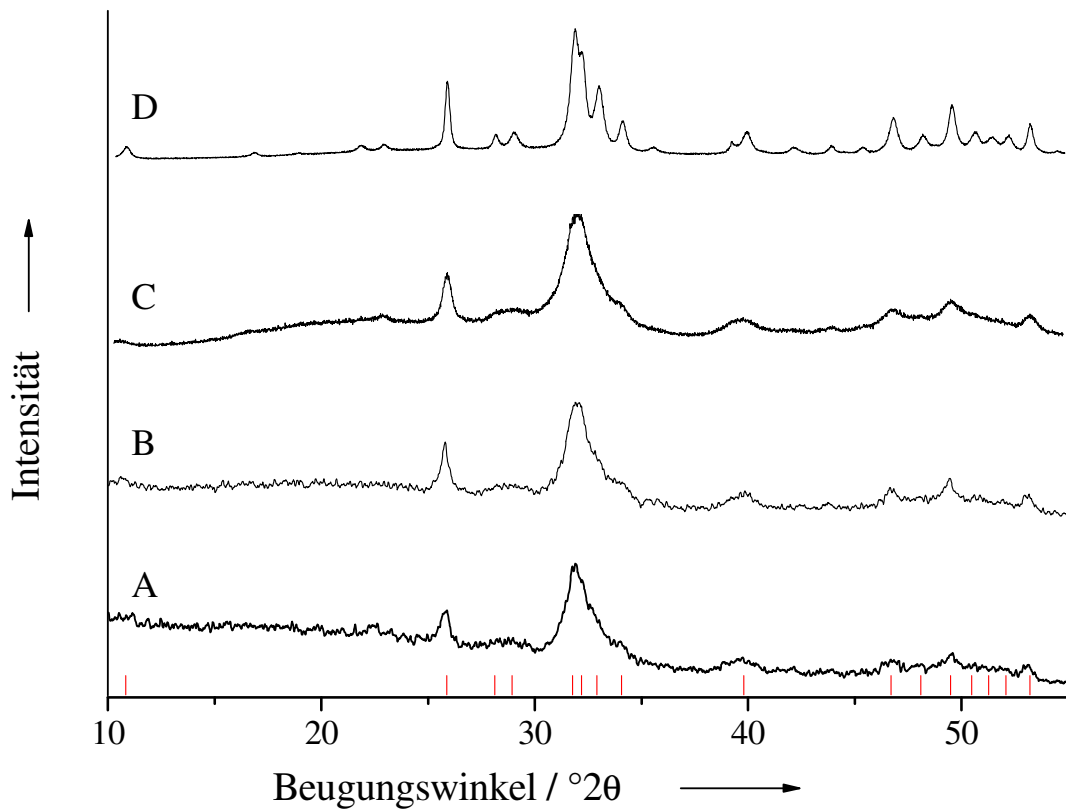


**Abbildung 53:** IR-Spektren von Apatos und Gen-Os.

**Tabelle 12:** Zuordnung der IR-Banden; w-schwach, s-stark, sh-Schulter, b-breit.

<b>Probe</b>	<b>Bande / cm<sup>-1</sup></b>
<b>Apatos</b>	563 P-O (s), 605 P-O (s), 872 C-O (s; Carbonat), 1035 P-O (s), 1239 C-O org. (sh), 1419 C-O (s; Carbonat), 1456 C-O (s; Carbonat), 1554 N-H (w), 1668 H-O-H (s, b; freies Wasser im Hydroxylapatit), 1739 C=O org. (sh), 2854 C-H (w), 2924 C-H (s), 3296 O-H (b)
<b>Gen-Os</b>	563 P-O (s), 604 P-O (s), 872 C-O (s; Carbonat), 1031 P-O (s), 1239 C-O org. (sh), 1419 C-O (w; Carbonat), 1469 C-O (s; Carbonat), 1549 N-H (w), 1675 H-O-H (s, b; freies Wasser im Hydroxylapatit), 1742 C=O org. (w), 2853 C-H (w), 2924 C-H (s), 3283 O-H (b)

Zudem wurden beide Substanzen mit Röntgenpulverdiffraktometrie analysiert. Sowohl Apatos als auch Gen-Os zeigen die erwarteten Peaks von HAP, die gut mit der Referenz aus der ICDD-Datenbank (Nr. 76-0694) übereinstimmen. Aufgrund der Nanokristallinität des HAP der beiden Materialien sind die Reflexe stark verbreitert. Es konnte in beiden Fällen keine andere kristalline Phase nachgewiesen werden. Die Diffraktogramme stimmen gut mit einem Diffraktogramm von humanen Knochen überein (Abbildung 54). Es ist somit festzuhalten, dass das Herstellungsverfahren beider Materialien ohne eine Veränderung der Mineralphase einhergeht.



**Abbildung 54:** Röntgenpulverdiffraktogramme von A) Apatos; B) Gen-Os; zum Vergleich: C) synthetischer HAP; D) humaner Knochen <sup>[16]</sup>. Die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr. 76-0694).

Die Partikelgröße wurde mittels der Scherrer-Gleichung abgeschätzt und mit den Werten für menschlichen Knochen verglichen (Tabelle 13).

Scherrer-Gleichung:

$$FWHM = \frac{K \cdot \lambda \cdot 57,3}{D \cdot \cos(\theta)} \quad [10]$$

FWHM: Halbwertsbreite in  $^{\circ}2\theta$

K: Konstante, die hier gleich 1 gesetzt wurde

$\lambda$ : Wellenlänge der Röntgenstrahlung in Å

D: Kristallitgröße in Å

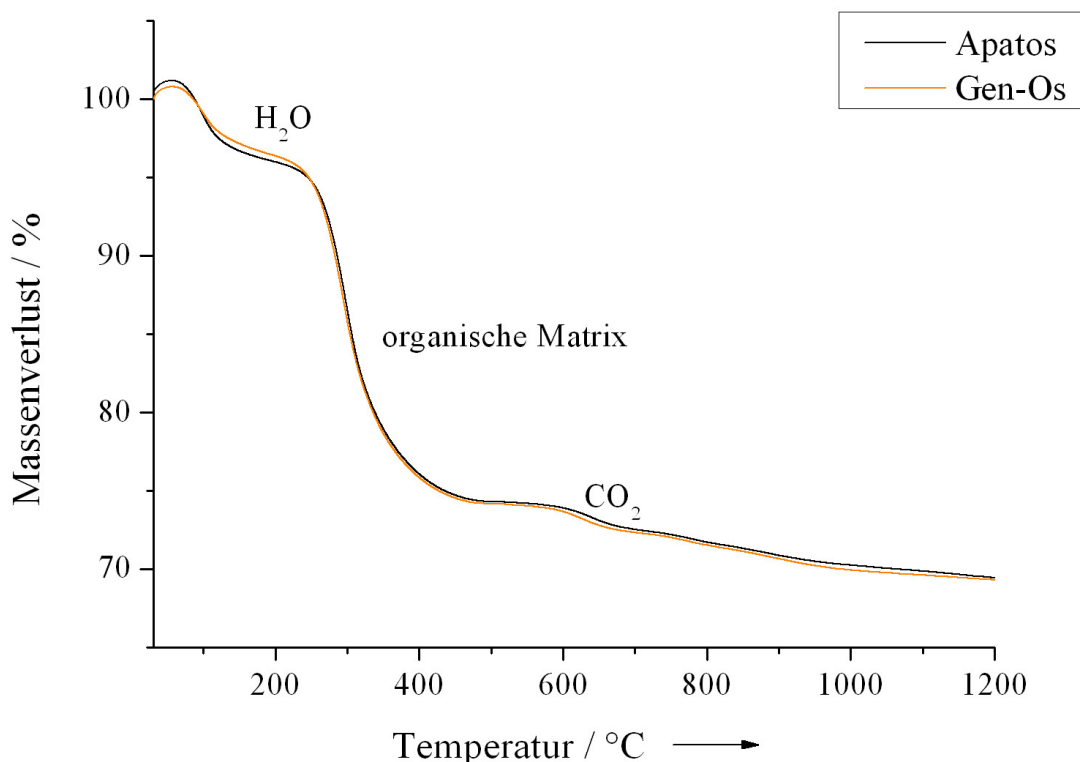
$\theta$ : Beugungswinkel des betreffenden Beugungsreflex in  $^{\circ}\theta$

**Tabelle 13:** Berechnete Kristallitgröße für Apatos und Gen-Os aus XRD-Daten mittels der Scherrer-Gleichung für die angegebenen Reflexe in nm; zum Vergleich gemessene Werte für Kallusknochen.

<b>Reflex (hkl)</b>	<b>(002)</b>	<b>(310)</b>	<b>(222)</b>	<b>(213)</b>	<b>(004)</b>
<b>Position (<math>^{\circ}2\theta</math>)</b>	<b>25,78</b>	<b>39,58</b>	<b>46,73</b>	<b>49,51</b>	<b>53,06</b>
<b>Apatos</b>	21,0	4,0	8,3	25,8	12,9
<b>Gen-Os</b>	24,1	7,6	14,0	24,7	16,3
<b>Kallusknochen</b> <sup>[16]</sup>	20,0	8,0	15,0	12,0	18,0

Zusätzlich wurden die Proben mittels Thermogravimetrie untersucht. Dazu wurden sie in einer dynamischen O<sub>2</sub>-Atmosphäre bis zu 1200 °C (Heizrate: 5 K min<sup>-1</sup>) erhitzt. Aus den Stufen der Gewichtsverluste wurde der Mineralgehalt von Apatos und Gen-Os berechnet (Tabelle 14). Von Raumtemperatur ausgehend bis 180 °C wurde eingeschlossenes Wasser abgegeben. Die Verbrennung der organischen Matrix beginnt im Fall von Apatos bei 180 °C bzw. für Gen-Os bei 185 °C. Dies ist ein weiterer Hinweis

darauf, dass auch Apatos noch einen organischen Anteil enthält. Bei 500 °C liegt nur noch die anorganische Phase Carbonatapatit vor. Kohlendioxid wurde bei Apatos ab 525 °C und bei Gen-Os ab 535 °C freigesetzt (Abbildung 55). Diese drei Massenverluste stimmen mit Untersuchungen an dem Biomaterial Tutoplast® überein [20]. Dagegen konnte bei gesinterten HAP-Materialien kein Massenverlust beobachtet werden, da durch die hohen Temperaturen beim Herstellungsprozess sowohl die organische Matrix als auch das Carbonat verbrannt wurden [20]. Es zeigt sich somit, dass durch den Herstellungsprozess weder im Apatos noch im Gen-Os die organischen Substanzen und das Carbonat im HAP zersetzt werden.



**Abbildung 55:** Thermogramm von Apatos und Gen-Os.



Die Massenverluste der jeweiligen Stufen sind in Tabelle 14 aufgelistet. Der Gehalt an Carbonat ( $M = 60,01 \text{ g mol}^{-1}$ ) im Apatos und Gen-Os wurde nach Gleichung 11 aus dem  $\text{CO}_2$ -Massenverlust ( $M = 44,01 \text{ g mol}^{-1}$ ) berechnet. Der Mineralgehalt lag in beiden Proben bei ungefähr 73,5 %. Der Carbonatgehalt entspricht mit 4,8 % bzw. 4,4 % dem von natürlichem Knochen <sup>[136, 198]</sup>. Die Werte für Apatos und Gen-Os liegen nah beieinander und sind zum Teil auf die mit den Messungen verbundenen Ungenauigkeiten zurückzuführen. Basierend darauf kann geschlossen werden, dass Apatos und Gen-Os eine nahezu identische Zusammensetzung besitzen.

$$w(\text{CO}_3^{2-}) = \frac{w(\text{CO}_2) \cdot 60,01}{44,01} \quad [11]$$

**Tabelle 14:** Zusammensetzung von Apatos und Gen-Os berechnet aus den Ergebnissen der thermogravimetrischen Analyse (Angaben in Gew.-%); zum Vergleich die Werte von Kallusknochen <sup>[16]</sup>.

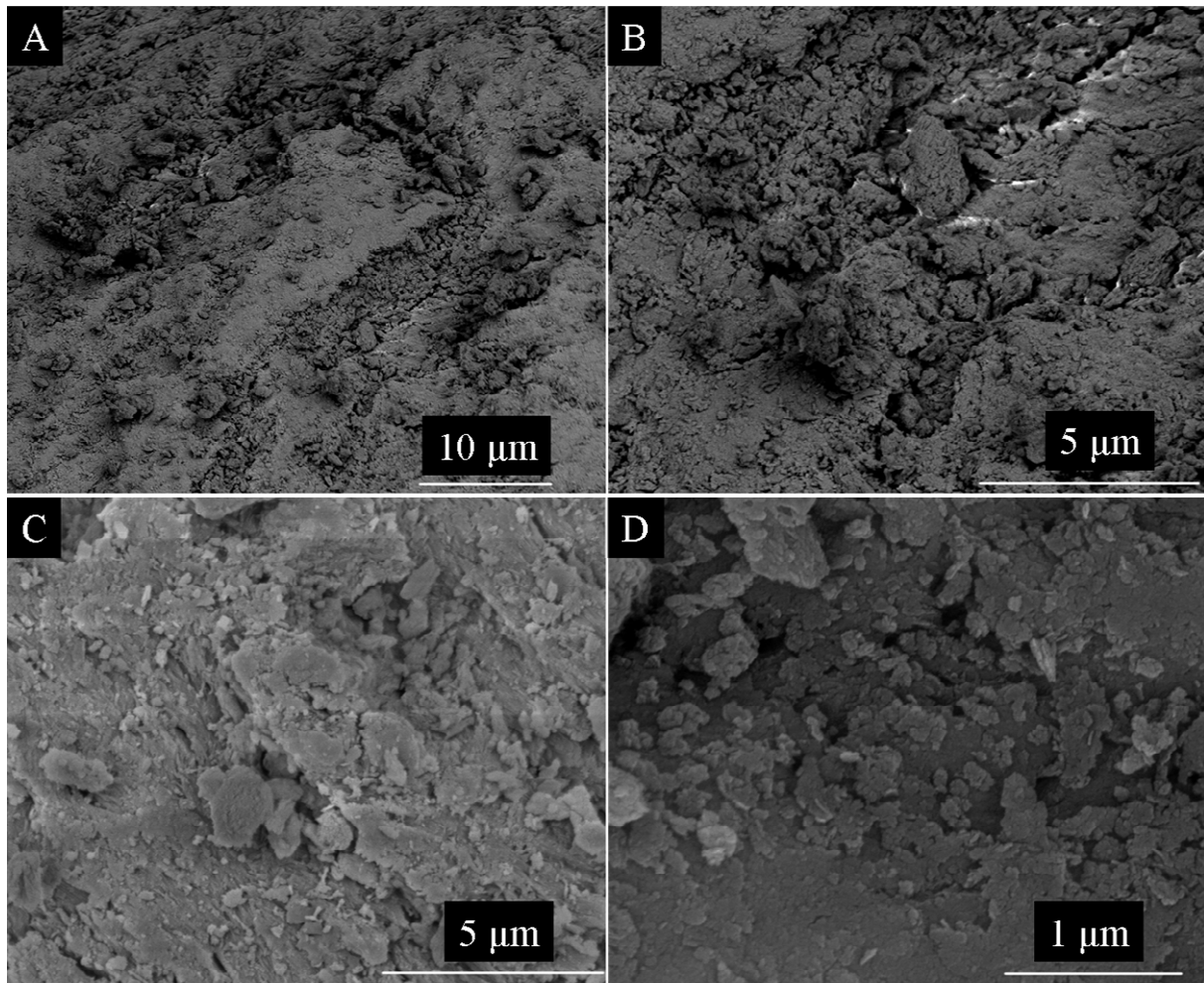
Probe	Wasser	Organische Matrix	$\text{CO}_2$	Carbonat	Mineral
Apatos	4,5	21,9	4,8	6,5	73,6
Gen-Os	4,0	22,4	4,4	6,0	73,6
Kallusknochen <sup>[16]</sup>	6,9	47,7	1,0	1,4	45,4

Die Elementaranalyse (siehe Tabelle 15) zeigt, dass beide Materialien Kohlenstoff, Wasserstoff, Stickstoff, Phosphat und Calcium enthalten. Der hohe Gehalt an Kohlenstoff (13-13,5 %) und Stickstoff unterstreicht die Ergebnisse aus den IR- und TG-Analysen, dass beide Materialien einen organischen Anteil enthalten. Das Verhältnis von Calcium zu Phosphat entspricht mit 1,67 für Apatos genau bzw. mit 1,73 für Gen-Os nahezu dem theoretischen Wert von 1,67 für Hydroxylapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .

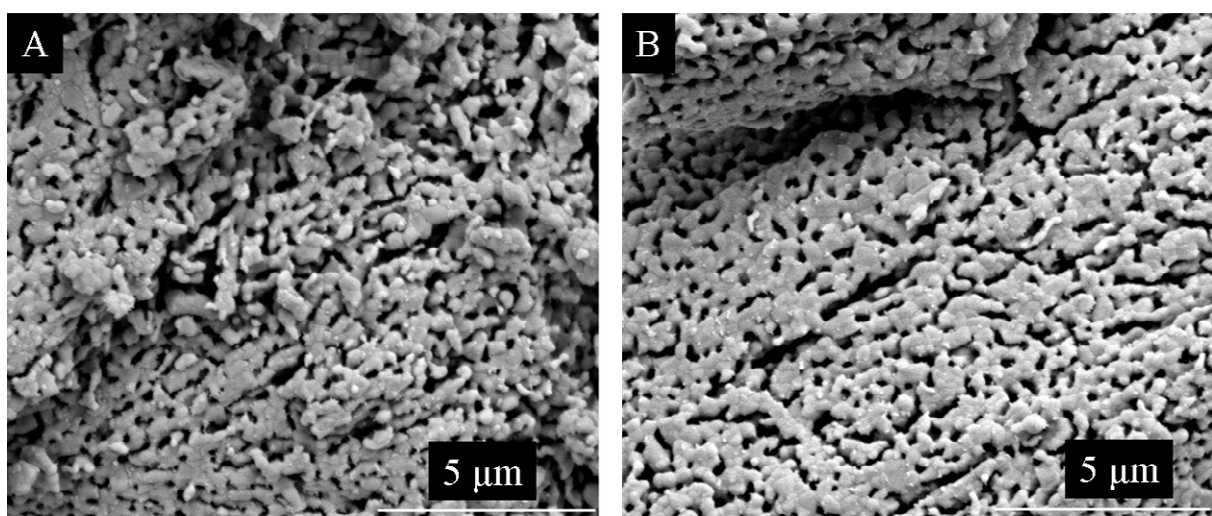
**Tabelle 15:** Ergebnisse der Elementaranalyse. Die Menge an Sauerstoff wurde näherungsweise als Differenz zu 100 % berechnet und nicht direkt gemessen.

	<b>Apatos (Gew.-%)</b>	<b>Gen-Os (Gew.-%)</b>
<b>Ca</b>	25,1	25,7
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup></b>	35,6	35,2
<b>C</b>	13,1	13,6
<b>H</b>	2,5	2,2
<b>N</b>	3,8	2,9
<b>O (nicht im PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>)</b>	19,9	20,4
<b>O (total)</b>	43,9	44,1
<b>Ca/P (n:n)</b>	1,67	1,73

Des Weiteren wurden zur Charakterisierung der Morphologie der beiden Materialien REM-Aufnahmen gemacht. Sowohl bei Apatos als auch bei Gen-Os ist eine raue Oberfläche zu erkennen. Die Nanokristalle sind zu größeren Partikeln agglomeriert. In beiden Fällen konnten mittels REM keine Kollagenfasern nachgewiesen werden. Die mikroporöse Struktur des Apatos konnte mittels REM nicht bestätigt werden. Die REM-Aufnahmen zeigen, dass der Rückstand nach den thermogravimetrischen Analysen Poren aufweist, die durch das Verbrennen der organischen Substanzen entstanden sind (Abbildungen 56 und 57).

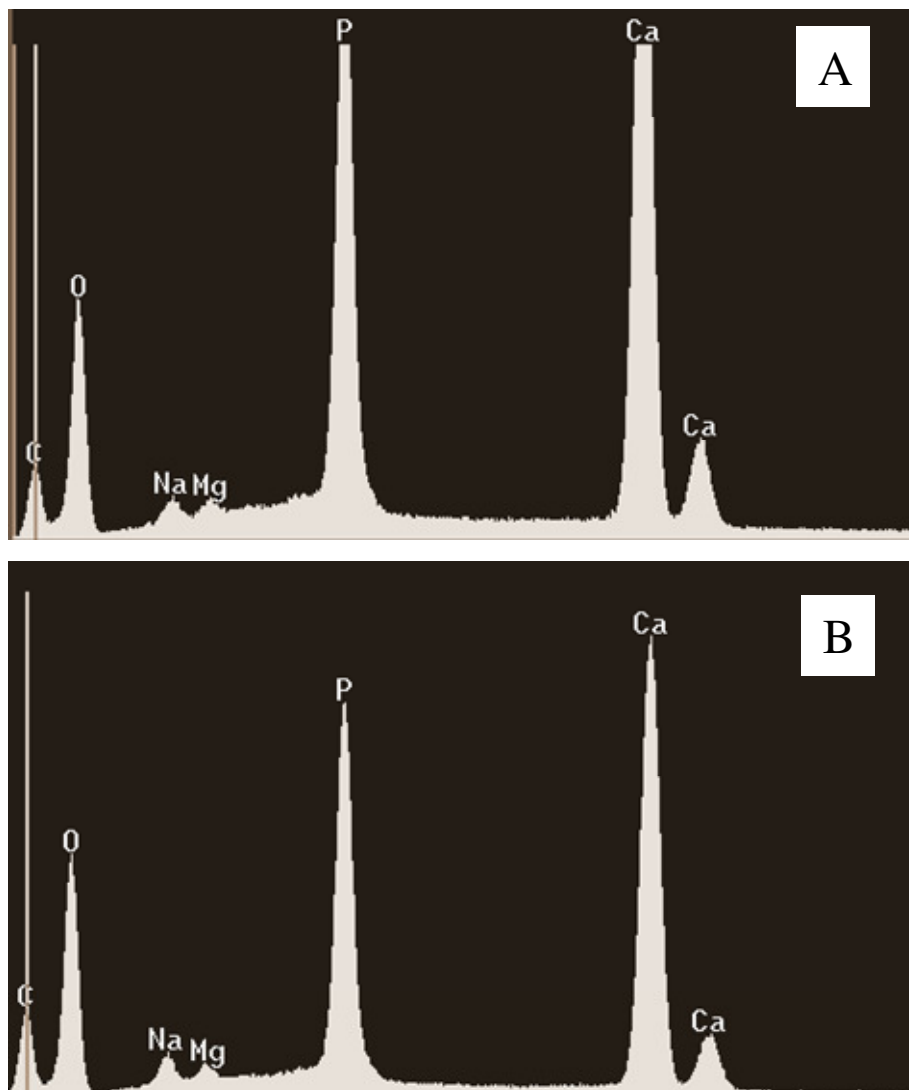


**Abbildung 56:** REM-Aufnahmen von Apatos (A, B) und Gen-Os (C, D).



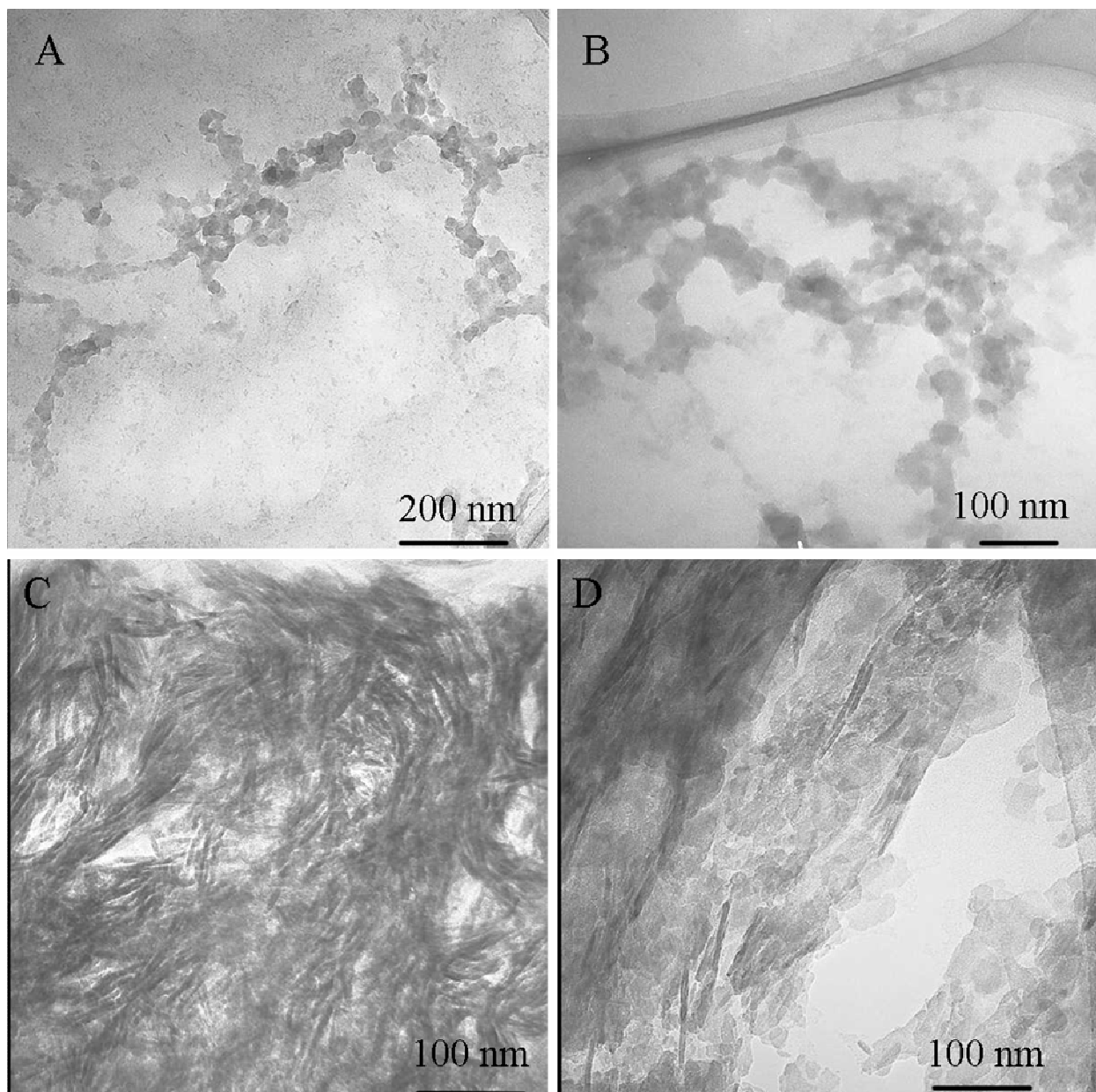
**Abbildung 57:** REM-Aufnahmen von Apatos (A) und Gen-Os (B) nach der TG-Analyse.

Zusätzlich zu den REM-Aufnahmen wurde eine EDX-Analyse durchgeführt. Sie bestätigt die Ergebnisse der Elementaranalyse. Zudem konnten zusätzlich Natrium (0,8 Gew.-%) und Magnesium (0,2 Gew.-%) gefunden werden. Dies ist in guter Übereinstimmung mit natürlichem Knochen, der 0,5 Gew.-%  $Mg^{2+}$  und 0,7 Gew.-%  $Na^+$  enthält <sup>[198]</sup>. Die EDX-Spektren sind in Abbildung 58 zu sehen; der Peak von Stickstoff wird vom intensiven Sauerstoff-Peak überlagert.



**Abbildung 58:** EDX-Spektren von Apatos (A) und Gen-Os (B).

Die aus den TEM-Bilder (Abbildung 59) abgeschätzte Partikelgröße beträgt für Apatos 30-60 nm und für Gen-Os liegt sie bei 30-50 nm. Damit werden die Ergebnisse aus den XRD-Analysen bestätigt. Die Nanokristalle sind, wie schon die REM-Bilder gezeigt haben, zu größeren Partikeln agglomeriert. Die TEM-Bilder von Gen-Os zeigen im Unterschied zu Apatos deutlich Kollagenfasern.



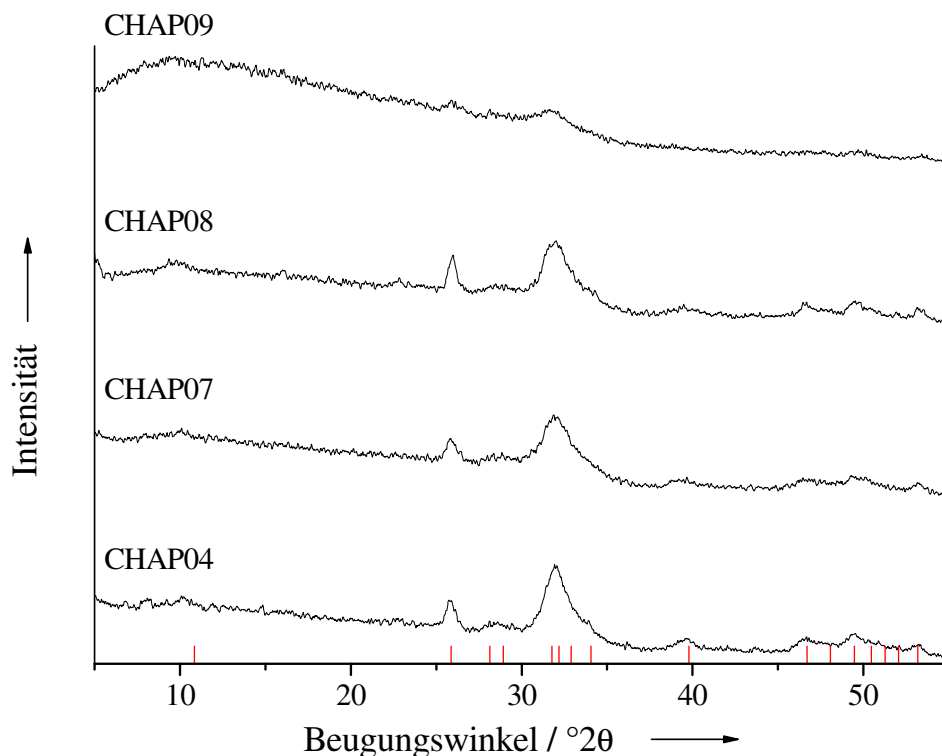
**Abbildung 59:** TEM-Aufnahmen von Apatos (A, B) und Gen-Os (C, D).

---

Es kann somit aufgrund der Analysen-Ergebnisse angenommen werden, dass sowohl Apatos als auch Gen-Os aus nanokristallinem Hydroxylapatit mit einem Carbonatgehalt von 4-4,5 Gew-% bestehen. Entgegen der Herstellerangaben kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch Apatos noch Kollagen enthält, wenn auch in den TEM-Aufnahmen keine Kollagenfasern zu erkennen sind.

### 4.3 Einfluss von Apatit auf glatte Muskelzellen

Ablagerungen (Plaques) in Form von Calciumphosphaten gelten als ein Marker für Arteriosklerose und stehen in Verbindung mit einem erhöhten Herzinfarktrisiko. Der Zusammenhang zwischen Calcifizierung der Ablagerungen und dem Abreißen der Plaques ist noch nicht geklärt<sup>[199-201]</sup>. Da bisher nicht bekannt ist, ob die verschiedenen Calciumphosphate (HAP, Carbonatapatit und ACP), die in den Plaques vorkommen, unterschiedliche Effekte auf glatte Muskelzellen haben, wurde der Einfluss von einigen Calciumphosphat-Phasen auf glatte Muskelzellen untersucht. Dazu wurden als Vergleich zu den Kristallen aus menschlichen Ablagerungen Apatit-Phasen unterschiedlicher Kristallinität und mit verschiedenem Carbonatgehalt hergestellt.



**Abbildung 60:** Pulverdiffraktogramme der verschiedenen Apatit-Phasen. Bis auf die Probe CHAP09 weisen alle nahezu die gleiche Kristallinität auf. Die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr. 76-0694).

Die Proben CHAP04, CHAP07 und CHAP08 sind alle nanokristallin, während die Probe CHAP09 amorph ist (Abbildung 60). Bis auf die Probe CHAP08 bestehen die Proben aus kugelförmigen, zum Teil agglomerierten Partikeln (Abbildung 61). Der Carbonatgehalt der Proben liegt im Bereich von 1 bis 4,8 Gew.-% (Tabelle 16).

**Tabelle 16:** Zusammenfassung der Ergebnisse aus Elementaranalyse und TG-Messungen.

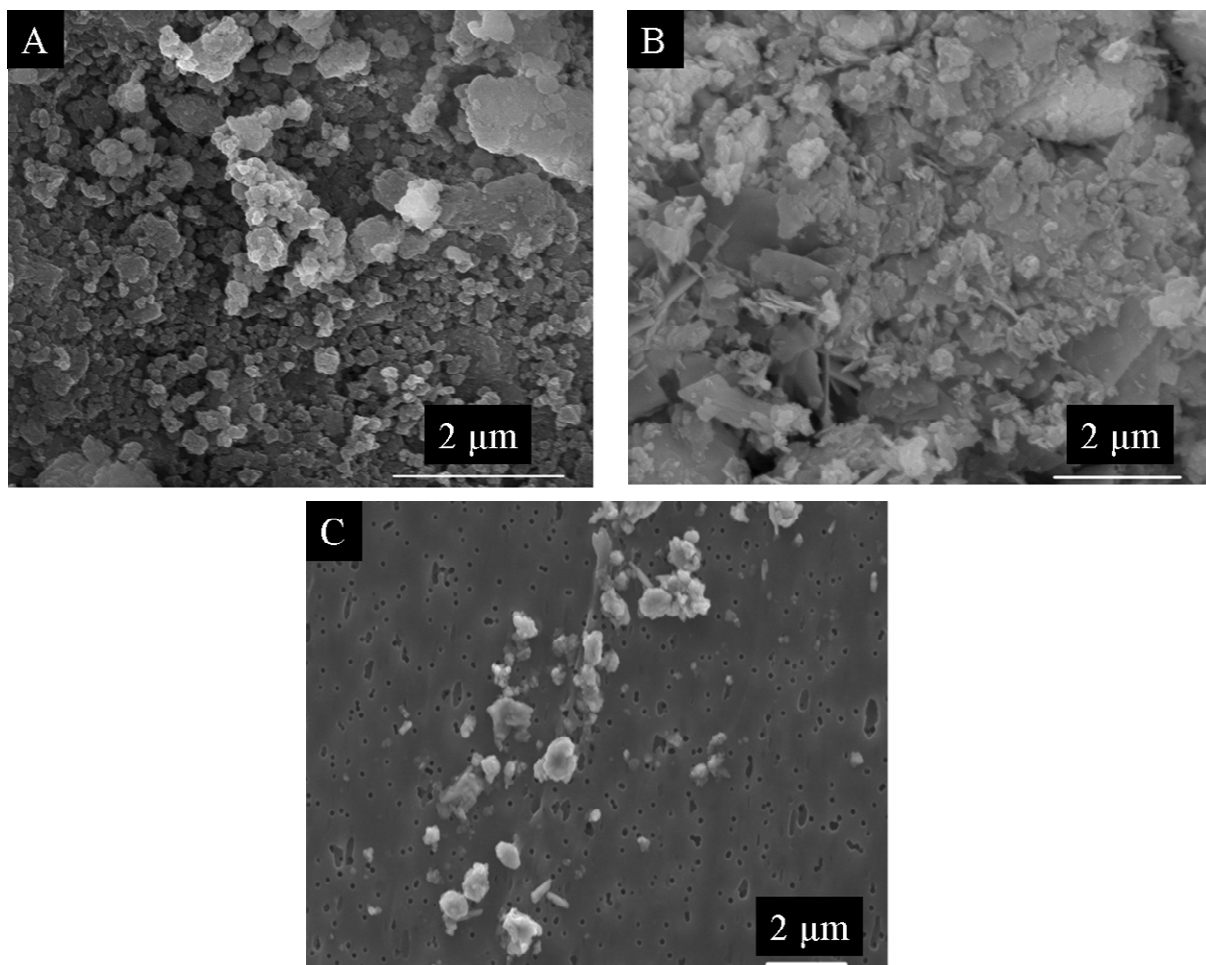
	CHAP04	CHAP07	CHAP08	CHAP09
<b>Calcium / Gew.-% (AAS)</b>	30,23	33,62	35,96	33,42
<b>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> / Gew.-% (UV)</b>	45,6	57,15	63,55	64,4
<b>Ca:PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>-Verhältnis (n:n)</b>	1,57	1,39	1,34	1,23
<b>Wassergehalt / Gew.-% (TGA)</b>	10,2	8,8	8,7	10,0
<b>CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-Gehalt / Gew.-% (TGA)</b>	4,0	4,8	2,1	1,0

Weitere Vergleichssubstanzen (BCP und Latexkugeln) wurden von den Kooperationspartnern um Dr. Diane Proudfoot aus Cambridge, die auch die Zelltests mit den unterschiedlichen Substanzen durchgeführt haben, bereitgestellt. Die Kristalle aus den menschlichen Ablagerungen haben eine Größe von 50 nm bis 8 µm und liegen damit im Bereich der Vergleichssubstanzen (BCP ca. 1 µm; CHAP 100-300 nm).

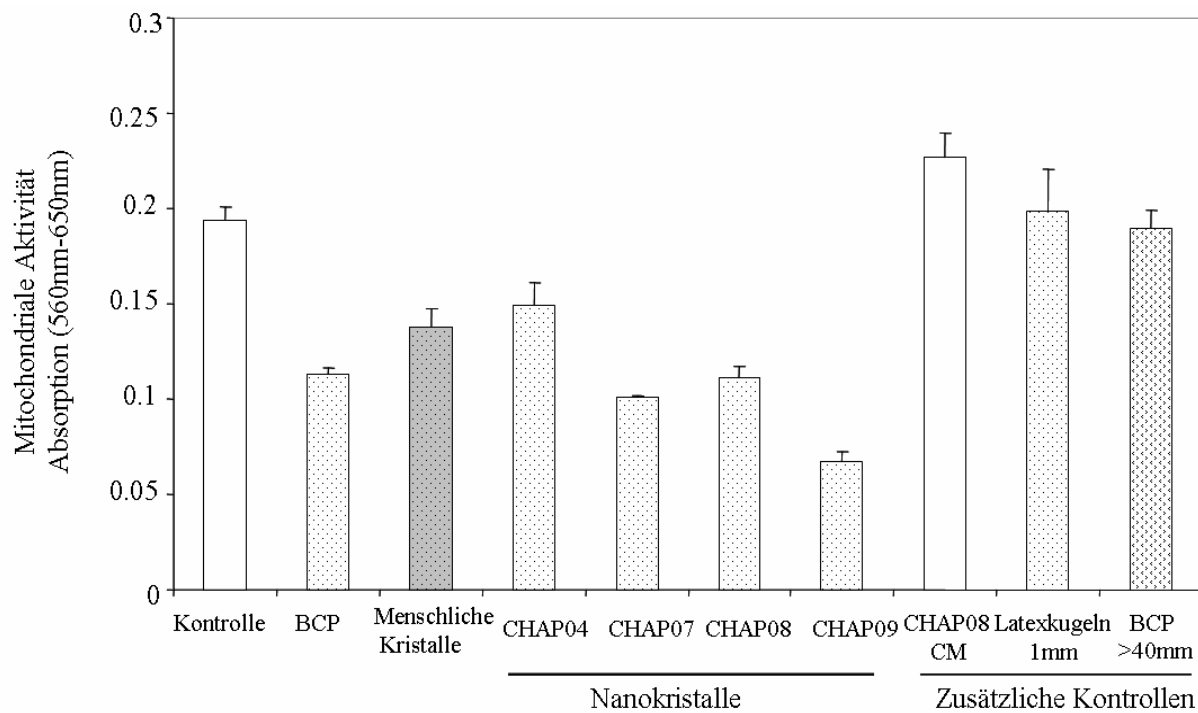
Zuerst wurde die Lebensfähigkeit der Zellen, die mit den synthetischen Apatiten behandelt wurden, über die mitochondriale Aktivität gemessen. Sie ist ein Maß für die metabolische Aktivität in den Zellen und korreliert in der Regel mit der Anzahl lebender Zellen. Die Messung erfolgt über einen gelben Farbstoff (Diphenyltetrazoliumbromid, MTT), der in den Mitochondrien (Teil einer eukaryotischen Zelle, der als „Kraftwerk“ fungiert) durch ein Enzym violett gefärbt wird. Anschließend wird die Menge des Farbstoffs photometrisch



( $\lambda=570$  nm) bestimmt. Sowohl die Kristalle aus den menschlichen Ablagerungen als auch die unterschiedlichen Apatit-Phasen haben zu einer verminderten Lebensfähigkeit der glatten Muskelzellen geführt, wobei die amorphe Probe (CHAP09) den größten Effekt hat. Da weder Latexkugeln mit einem Durchmesser von  $1\ \mu\text{m}$  noch größere Calciumphosphat-Kristalle ( $> 40\ \mu\text{m}$ ) eine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Zellen haben, ist davon auszugehen, dass die Kristallgröße eine bedeutende Rolle spielt (Abbildung 62). Am BCP und den menschlichen Kristallen konnte gezeigt werden, dass die Abnahme der Lebensfähigkeit der Zellen mit einer Reduzierung der Zellanzahl einhergeht, d. h. die Kristalle führen zu einem vermehrten Zelltod (Apoptosis). Dies lässt sich auf die verschiedenen Apatit-Phasen übertragen.



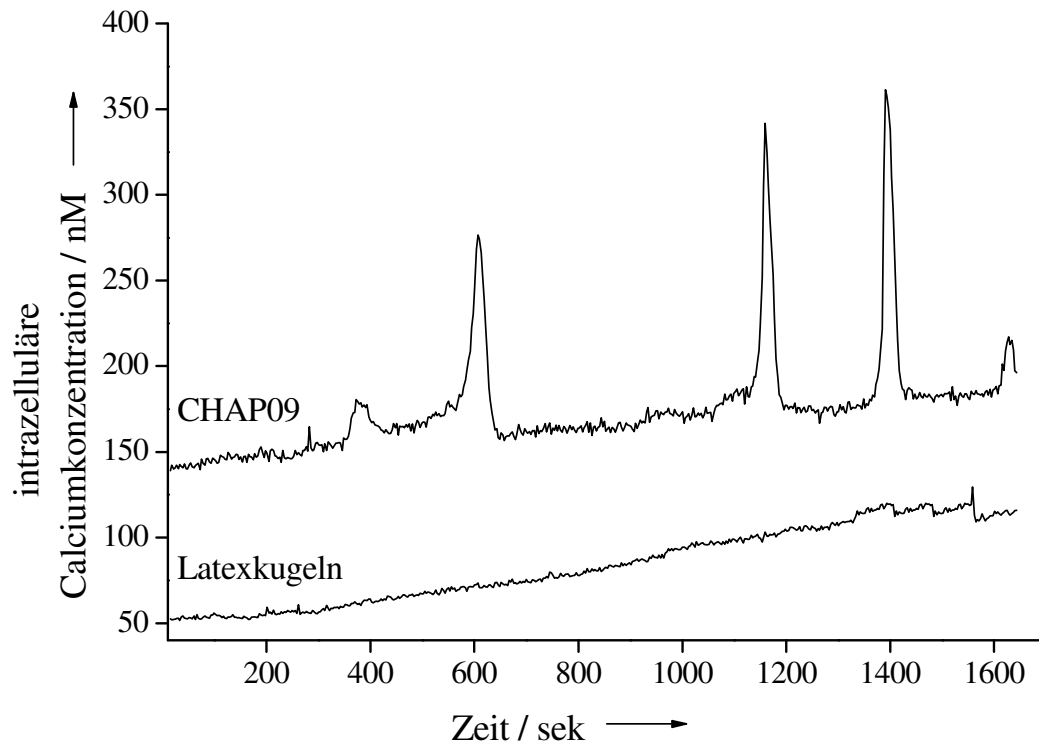
**Abbildung 61:** REM-Aufnahmen von A) CHAP04 mit einer Partikelgröße zwischen  $100\text{-}300\ \text{nm}$ ; B) CHAP08; C) Kristalle, die aus menschlichen Plaques isoliert wurden <sup>[202]</sup>.



**Abbildung 62:** Glatte Muskelzellen wurden über 72 Stunden mit verschiedenen CaP-Kristallen versetzt und anschließend über die mitochondriale Aktivität die Lebensfähigkeit der Zellen gemessen. Die Lebensfähigkeit der mit Apatit-Kristallen (CHAP-Proben, Zusammensetzung siehe Tabelle 15) behandelten Zellen nimmt ab. Die Kontrolle enthält keine Kristalle, nur das Zellmedium (Quelle: Dr. D. Proudfoot University Cambridge).

Aus Untersuchungen mit Fibroblasten ist bekannt, dass CaP-Kristalle durch Phagozytose aufgenommen, in den Lysosomen der Zellen wieder gelöst werden und dadurch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration erhöht wird [203]. Da es als sicher gilt, dass eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration den Zelltod induziert, wurde untersucht, ob die CaP-Kristalle auch bei glatten Muskelzellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration beeinflussen. Die verschiedenen nanokristallinen Apatit-Phasen führten alle zu einem ähnlichen Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration und folglich zum Zelltod in ca. 50 % der glatten Muskelzellen. Warum nur 50 % der Zellen sterben, ist bisher unklar; es wird jedoch die Heterogenität der glatten Muskelzellen als Ursache angenommen. In

Abbildung 63 ist der Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration für das amorphe CaP und Latexkugeln, die keine Auswirkung auf die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration haben, zu sehen.



**Abbildung 63:** Charakteristischer Kurvenverlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration in glatten Muskelzellen, die mit amorphen Calciumphosphat und Latexkugeln stimuliert wurden (Quelle: Dr. D. Proudfoot University Cambridge)

Um sicher zu gehen, dass der Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration durch Kristallaufnahme und späterem Freisetzen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Ansäuern der Kristalle erfolgt, wurde von den Kooperationspartnern mit Bafilomycin A1 ein Inhibitor eingesetzt. Bafilomycin A1 verhindert die Ansäuerung in den Lysosomen und damit die Auflösung der Kristalle. In Gegenwart von Bafilomycin A1 konnte kein Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration festgestellt werden und somit auch kein Zelltod der glatten Muskelzellen. Dies zeigt, dass eine Degradation der Kristalle

in den Lysosomen der Zelle notwendig ist, um eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration zu verursachen, die dann zur Apoptose führt.

Es konnte gezeigt werden, dass Apatit-Kristalle in Abhängigkeit ihrer Größe und Zusammensetzung zur Apoptose in menschlichen glatten Muskelzellen, die die Plaques vor dem Abreißen schützen, führen. Es zeigte sich zudem, dass vor allem kleine Kristalle ( $< 1\mu\text{m}$ ) den Zelltod von glatten Muskelzellen auslösen und somit zur möglichen Destabilisierung von arteriosklerotischen Plaques beitragen. Dies stimmt mit vorherigen Untersuchungen überein, die ebenfalls zu dem Schluss kommen, dass vorzugsweise kleine calcifizierte Ablagerungen eine Instabilität der Plaques verursachen <sup>[204-206]</sup>. Es kann somit angenommen werden, dass kleinere, nicht agglomerierte Partikel in den Plaques, im Vergleich zu größeren Ablagerungen, zelltoxischer auf glatte Muskelzellen wirken.

Die Untersuchungen zum Einfluss von nanokristallinen Apatit-Phasen auf glatte Muskelzellen sind ein weiterer Hinweis darauf, dass Calciumphosphate die Aktivität von Zellen beeinflussen können. In vorangegangenen Studien führten sie zur Apoptose von Makrophagen und Krebszellen oder im Gegensatz dazu zu einer erhöhten Proliferation von Fibroblasten <sup>[207-209]</sup>.

## **5. Experimenteller Teil**

### **5.1 Herstellung von ACC**

Amorphes Calciumcarbonat (ACC) wurde nach der Methode von Günther et al.<sup>[9]</sup> hergestellt. Dazu wurde in eine auf 1-2 °C gekühlte, übersättigte Ca(OH)<sub>2</sub>-Lösung CO<sub>2</sub> eingeleitet. Dabei wurde die Leitfähigkeit kontrolliert. Zu Beginn betrug sie 10,5-11 mS cm<sup>-1</sup>. Bei einem Wert von 2,5-3 mS cm<sup>-1</sup> wurde das Einleiten von CO<sub>2</sub> beendet. Der entstandene Niederschlag wurde rasch abgesaugt und mit vorher eisgekühltem und über Molsieb getrocknetem Aceton gewaschen. Danach wurde die Substanz im Ölpumpenvakuum über Nacht getrocknet; später wurde nur noch im Trockenschrank bei 70 °C getrocknet. Anschließend wurde die trockene Substanz gut verschlossen bei Raumtemperatur gelagert. Ausgehend von 200 ml übersättigter Ca(OH)<sub>2</sub>-Lösung betrug die Ausbeute pro Ansatz 250-300 mg ACC.

### **5.2 Umwandlung von ACC**

Es wurden jeweils 20 mg ACC eingewogen und in 10 ml (entspricht 0,018 mol l<sup>-1</sup>) der jeweiligen Lösung gegeben. Es wurden Versuche in destilliertem Wasser, in Magnesiumlösung mit einer Konzentration von 0,019 mol l<sup>-1</sup> und 0,039 mol l<sup>-1</sup> durchgeführt. Zudem wurden Zinklösungen mit einer Konzentration von 0,007 mol l<sup>-1</sup> und 0,017 mol l<sup>-1</sup> verwendet. Zur Herstellung der Lösungen wurde Magnesiumnitrat bzw. Zinknitrat verwendet. Es wurden Versuche mit unterschiedlicher Dauer durchgeführt (ein Tag, 5 Tage und 12 Tage). Nach dem jeweiligen Zeitraum wurde die Substanz abzentrifugiert, mit Aceton gewaschen, bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und anschließend mittels XRD und REM charakterisiert.

### **5.3 Herstellung von Ikait**

Der Ikait (Calciumcarbonathexahydrat  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) wurde durch eine geringe Abwandlung der Methode von Günther et al.<sup>[9]</sup> zur Herstellung von ACC hergestellt. Nach dem Absaugen und Waschen des Niederschlags mit kaltem, getrocknetem Aceton wurde die Substanz nicht im Vakuum getrocknet, sondern feucht (mit Aceton) in einem Gefrierschrank bei  $-18\text{ °C}$  gelagert.

### **5.4 Herstellung von MHC**

Monohydrocalcit wurde nach einer Methode von Tlili et al.<sup>[56]</sup> hergestellt. Dazu wurden, um künstliches Meerwasser herzustellen, 29,22 g (0,5 mol) NaCl, 5,0 g (52,5 mmol)  $\text{MgCl}_2$  und 1,56 g (10,6 mmol)  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in 250 ml destilliertem Wasser gelöst. Dann wurden 0,3 g  $\text{K}_2\text{CO}_3$  dazu gegeben und gut gerührt, bis sich alles gelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung über Nacht in einem Kühlschrank gelagert. Der ausgefallene Niederschlag wurde am nächsten Tag abfiltriert, mit Wasser und Aceton gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet.

### **5.5 Fällung von Hydroxylapatit und Carbonatapatit**

Nach Tadic<sup>[210]</sup> wurden eine 18 mM Calciumlactatlösung und eine jeweils 10,8 mM Natriumcarbonat- und Natriumhydrogenphosphatlösung hergestellt. Dazu wurden für jeweils 10 Liter 55,49 g Calciumlactat, 11,45 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  und 28,95 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  eingewogen. Für die carbonatfreien Apatite wurde die  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Lösung weggelassen. Die Calciumlactat-Lösung wurde mit NaOH (1 M) auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Phosphat-Lösung wurde mit Phosphorsäure ebenfalls auf pH=10 eingestellt. Die Lösungen wurden nun mit einer Peristaltikpumpe (Pumpgeschwindigkeit: 99; entspricht  $37\text{ ml min}^{-1}$  pro Lösung) zusammengegeben und die Substanz kontinuierlich über einen Büchnertrichter abfiltriert (Versuchsaufbau siehe Abbildung 64). Es wurden

dabei drei Blaubandfilterpapiere übereinander gelegt, damit möglichst wenig durch den Filter hindurch ging. Die Filterpapiere wurden ca. alle 20 Minuten gewechselt und zum Trocknen der Substanz in einen Trockenschrank bei 100 °C gegeben.

Der Niederschlag, der während des Filtrierens durch den Filter hindurchging, wurde gesammelt, über einige Wochen in Lösung stengelassen und in unterschiedlichen Zeitabständen etwas abfiltriert und analysiert.

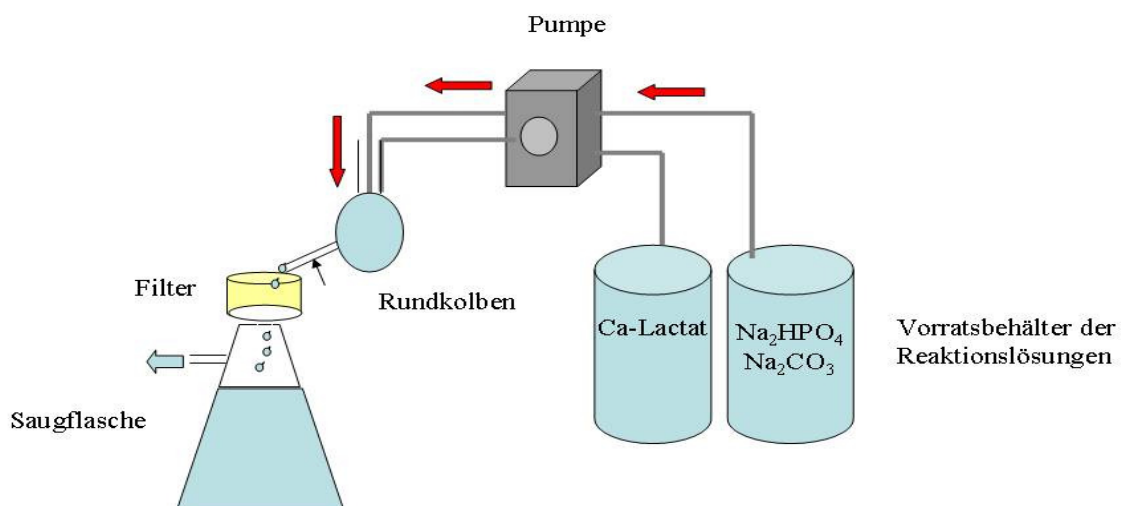
Die mittlere Verweilzeit kann mit folgender Formel berechnet werden. Sie betrug bei einer Zuflussgeschwindigkeit von  $37 \text{ ml min}^{-1}$  57 Sekunden:

$$t = \frac{V}{dV \cdot dt^{-1}} \quad [12]$$

$t$  = mittlere Verweilzeit / min

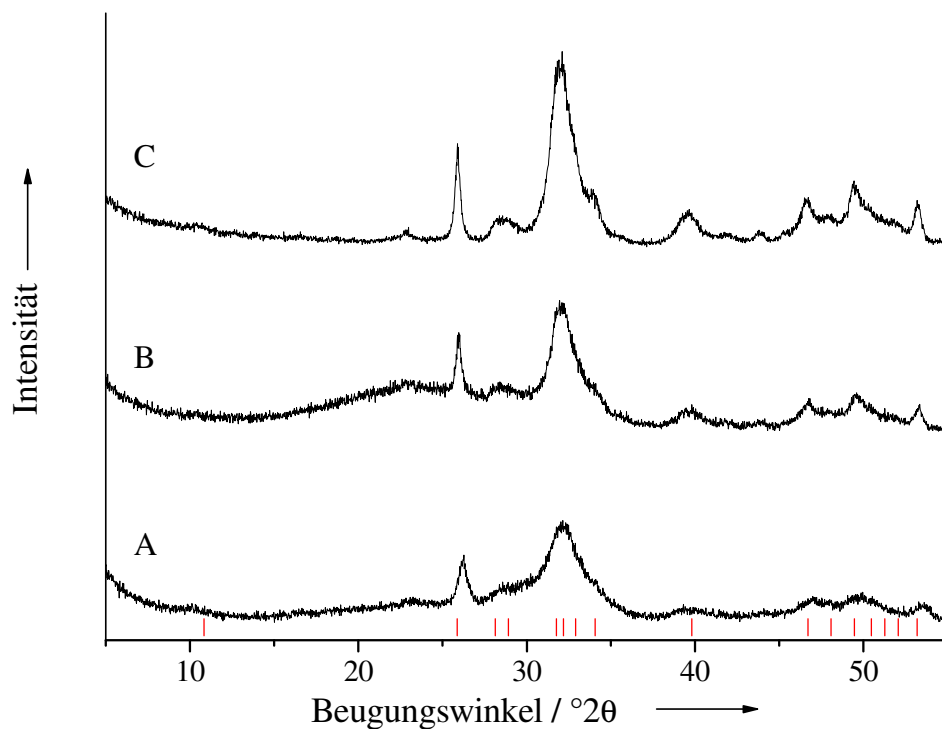
$V$  = Volumen des Reaktionsgefäßes / ml

$dV \cdot dt^{-1}$  = Zuflussgeschwindigkeit  $\text{ml min}^{-1}$



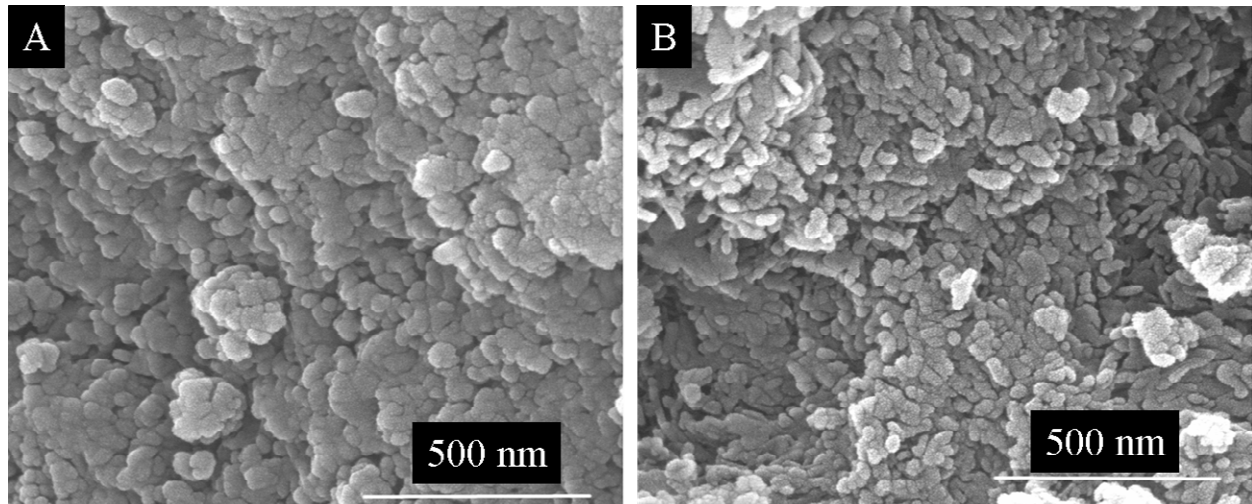
**Abbildung 64:** Schematischer Versuchsaufbau zur Herstellung der Apatite.

Bei der Herstellung der Carbonatapatite ist auch immer Substanz durch den Filter hindurch gegangen. Dieser Feststoff wurde in Lösung stehen gelassen, in Abständen abfiltriert und mittels XRD (Abbildung 65) und REM (Abbildung 66) charakterisiert. Es zeigte sich, dass sich die Kristallinität auch nach 7 Wochen nur geringfügig verändert hat. Es handelt sich weiter um nanokristallinen Carbonatapatit. Auf den REM-Bildern ist zu sehen, dass die Partikel nach 4 Wochen neben einer kugelförmigen Morphologie auch teilweise eine Stäbchenform aufweisen. Es kann somit festgehalten werden, dass das direkte Abfiltrieren nicht zwingend notwendig ist, um nanokristallinen Carbonatapatit zu synthetisieren. Es ändert sich aber mit der längeren Verweilzeit die Morphologie der Partikel.



**Abbildung 65:** Röntgenpulverdiffraktogramme von Carbonatapatit nach unterschiedlicher Verweilzeit in Lösung bei Raumtemperatur: A) direkt nach Fällung; B) nach 4 Wochen; C) nach 7 Wochen. Die Ausgangskonzentrationen betragen 18 mM Calciumlactat und je 10,8 mM Natriumcarbonat bzw. Natriumhydrogenphosphat. Die roten Linien kennzeichnen die aus der ICDD-Datenbank entnommenen Reflexlagen (Nr. 76-0694).





**Abbildung 66:** REM-Aufnahmen von Carbonatapatit nach unterschiedlicher Verweilzeit in Lösung bei Raumtemperatur: A) direkt nach der Fällung; B) nach 4 Wochen.

### **5.6 Apatit für Osteoblasten- und Osteoklastentests**

Die gefällten Apatite wurden nach dem Trocknen mit Hilfe einer Kugelmühle zerkleinert (30-60 Minuten bei  $300 \text{ U min}^{-1}$ ). Dann wurden aus jeweils 200 mg Pulver Presslinge hergestellt. Die so hergestellten Presslinge wurden für die anschließenden Zelltests verwendet. Des Weiteren wurden für die Osteoblastentests poröse Presslinge nach der Methode von Tadic<sup>[211]</sup> hergestellt. Dazu wurde 1 g Carbonatapatit mit 200 mg NaCl (Korngröße: 250-400  $\mu\text{m}$ ) und 10 mg PVA-Fäden vermischt und anschließend davon jeweils 400 mg zum Pressen verwendet. Die so hergestellten Presslinge wurden zuerst bei Raumtemperatur in Wasser und dann in 50 °C warmes destilliertes Wasser gegeben. Dadurch wurden sowohl das Natriumchlorid als auch die PVA-Fäden wieder herausgewaschen und man erhielt poröse Presslinge.

### **5.7 Apatit für Tests mit glatten Muskelzellen**

Für die Tests mit glatten Muskelzellen wurde sowohl Carbonatapatit als auch carbonatfreier Apatit synthetisiert, die zudem eine unterschiedliche Kristallinität aufwiesen (Konzentration der Lösungen siehe Kapitel 5.5). Dazu wurden die Pumpgeschwindigkeit und Fällungstemperatur variiert. Für nanokristallinen Apatit (CHAP 04 und CHAP 07) betrug die Pumpgeschwindigkeit  $37 \text{ ml min}^{-1}$  sowohl für die Calcium- als auch für die Phosphatlösung bei einer Fällungstemperatur von  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . CHAP 08 wurde bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  und einer Zuflussgeschwindigkeit von  $5 \text{ ml min}^{-1}$  hergestellt. Für einen amorphen Apatit (CHAP 09) wurden folgende Bedingungen benutzt:  $37 \text{ ml min}^{-1}$  für beide Lösungen und  $5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## **6. Zusammenfassung**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde amorphes Calciumcarbonat (ACC) nach einer bestehenden Synthesevorschrift hergestellt und näher untersucht. Das ACC wurde entgegen der Literatur bei 70 °C im Trockenschrank getrocknet. Dies stellte sich als ausreichend heraus. Bei Raumtemperatur gelagert, war das ACC für mehrere Wochen stabil. Nicht die Lagerungstemperatur ist für die Stabilität entscheidend, sondern die Feuchtigkeit. Wird es bei Raumtemperatur an der Luft gelagert, hat es sich innerhalb von einer Woche in Calcit umgewandelt. Des Weiteren wurden Umwandlungsversuche in Magnesium- und Zinklösungen durchgeführt. Im Fall von Magnesium bildete sich in Abhängigkeit der Konzentration entweder Monohydrocalcit (MHC) oder Aragonit. Dabei zeigte sich, dass die höhere Magnesiumkonzentration die instabilere Phase MHC über einen längeren Zeitraum stabilisiert. Bei höherer Temperatur bildet sich unabhängig von der Konzentration schon nach einem Tag Aragonit. Es konnte jedoch in keinem Ansatz Calcit als Umwandlungsprodukt identifiziert werden, was bestätigt, dass Magnesium die Calcitbildung inhibiert. In Zinklösungen entstand dagegen in allen Fällen nanokristalliner Hydrozinkit  $\text{Zn}_5(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_6$ .

Es wurde zudem eine neue Synthese von Ikait entwickelt. Dazu wurde der noch feuchte Niederschlag bei der Fällung von ACC bei -18 °C gelagert. Der sich so gebildete Ikait bleibt bei dieser tiefen Temperatur über Monate lang stabil. Bei Raumtemperatur wandelt er sich nach wenigen Stunden in Calcit um. Daraus kann geschlossen werden, dass sich das ACC über die Zwischenstufe Ikait in Calcit umwandelt, wobei der Ikait bei tiefen Temperaturen stabilisiert wird. Diese Annahme konnte mittels Festkörper-NMR bestätigt werden. Das ACC muss eine dem Ikait ähnliche Struktur haben, da die chemischen Verschiebungen in den  $^{13}\text{C}$ -Spektren identisch sind. Zudem konnte durch die  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen gezeigt werden, dass das ACC kein Hydrogencarbonat enthält. Die Signale im Protonenspektrum werden durch das

Strukturwasser (7-8 Gew.-%) und einer geringen Menge an mobilem Wasser, das Hydroxid enthält, verursacht.

Aufgrund der Ergebnisse der *in vitro*-Osteoblastentests kann festgehalten werden, dass die Carbonatapatit-Materialien prinzipiell als Knochenersatzmaterial in Frage kommen. Dies müsste in *in vivo*-Tests weiter untersucht und bestätigt werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Osteoblasten gut auf dem Material haften und dort gut proliferieren. Im Fall der porösen Materialien sind die Osteoblasten zum Teil in die Poren eingedrungen. Dies ist für ein Knochenersatzmaterial aufgrund des besseren Gewebewachstums von Vorteil. Anhand von weiteren Zelltests wurde verdeutlicht, dass auf dem Material Monozyten zu osteoklastären Zellen differenzieren. Im Vergleich zu weiteren Substanzen (TCP und HAP) wachsen und differenzieren die Zellen ähnlich gut. Die Osteoklasten bauen das Material ab und es entstehen die typischen Resorptionslakunen. Das Material reagiert *in vitro* sowohl auf Osteoblasten als auch Osteoklasten positiv und ist damit ein vielversprechendes Knochenersatzmaterial, was jedoch in weiteren *in vivo*-Tests untersucht werden müsste.

Die Analyse von zwei Biomaterialien der Firma Tecnos hat ergeben, dass sowohl Apatos als auch Gen-Os aus nanokristallinem Hydroxylapatit mit 4-4,5 Gew.-% Carbonat bestehen. Damit sind die Zusammensetzung und auch die Partikelgröße, die mittels XRD bestimmt wurde, dem menschlichen Knochen sehr ähnlich. Der Herstellungsprozess zog somit keine Veränderung der Kristallinität des HAP nach sich. Im Fall von Gen-Os konnte bestätigt werden, dass es noch Kollagen enthält. Bei Apatos wird aufgrund der IR- und TG-Ergebnisse ebenfalls angenommen, dass es entgegen der Herstellerangaben Kollagen enthält. Jedoch zeigten die TEM-Aufnahmen keine typischen Kollagenfasern.

Die Studie zur Auswirkung nanokristalliner Apatit-Phasen auf glatte Muskelzellen führten zu dem Ergebnis, dass diese zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führten. Dadurch wurde in 50 % der glatten Muskelzellen ein Zelltod (Apoptose) verursacht. Dabei lösen vor allem kleine Partikel ( $< 1\mu\text{m}$ ) den Zelltod aus. Es kann somit angenommen werden, dass kleinere, nicht agglomerierte Partikel in den Plaques, im Vergleich zu größeren Ablagerungen, zelltoxischer auf glatte Muskelzellen wirken. Da es als sicher gilt, dass glatte Muskelzellen bei einer Arteriosklerose eine schützende Wirkung auf die Plaques haben, kann der Zelltod zu instabilen Ablagerungen führen.

Die Analyse zum Einfluss von nanokristallinen Apatit-Phasen auf glatte Muskelzellen ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Calciumphosphate die Aktivität von Zellen beeinflussen.

## **7. Literaturverzeichnis**

- [1] E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, *P. Roy. Soc. Lond. B Mat.* **1997**, 264, 461.
- [2] S. Weiner, Y. Levi-Kalisman, S. Raz, L. Addadi, *Connect. Tissue Res.* **2003**, 44, 214.
- [3] A. Becker, A. Ziegler, M. Epple, *J. Chem. Soc. Dalton* **2005**, 1814.
- [4] A. Becker, U. Bismayer, M. Epple, H. Fabritius, B. Hasse, J. Shi, A. Ziegler, *J. Chem. Soc. Dalton* **2003**, 551.
- [5] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *Adv. Funct. Mater.* **2002**, 12, 43.
- [6] L. Addadi, S. Raz, S. Weiner, *Adv. Mater.* **2003**, 15, 959.
- [7] S. Raz, P. C. Hamilton, F. H. Wilt, S. Weiner, L. Addadi, *Adv. Funct. Mater.* **2003**, 13, 480.
- [8] M. G. Taylor, K. Simkiss, G. N. Greaves, M. Okazaki, S. Mann, *P. Roy. Soc. Lond. B Mat.* **1993**, 252, 75.
- [9] C. Günther, A. Becker, G. Wolf, M. Epple, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2005**, 631, 2830.
- [10] A. R. Lennie, *Mineral. Mag.* **2005**, 69, 325.
- [11] J. L. Bischoff, J. A. Fitzpatrick, R. J. Rosenbauer, *J. Geol.* **1993**, 101, 21.
- [12] G. Marland, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1975**, 39, 83.
- [13] A. S. Posner, F. Betts, N. C. Blumenthal, *J. Cryst. Growth* **1981**, 53, 63.
- [14] W. E. Brown, L. C. Chow, *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1976**, 6, 213.
- [15] A. S. Posner, F. Betts, N. C. Blumenthal, *Prog. Cryst. Growth Charact. Mater.* **1980**, 3, 49.
- [16] F. Peters, K. Schwarz, M. Epple, *Thermochim. Acta* **2000**, 361, 131.
- [17] S. V. Dorozhkin, M. Epple, *Angew. Chem. Int. Edit* **2002**, 41, 3130.
- [18] M. Neumann, M. Epple, *Eur. J. Trauma* **2006**, 32, 125.
- [19] A. F. Schilling, S. Filke, S. Brink, H. Korbmacher, M. Amling, J. M. Rueger, *Eur. J. Trauma* **2006**, 2, 107.

- [20] D. Tadic, M. Epple, *Biomaterials* **2004**, 25, 987.
- [21] A. Becker, M. Epple, K. M. Müller, I. Schmitz, *J. Inorg. Biochem.* **2004**, 98, 2032.
- [22] H. Vollmer, *Arteriosklerose-Das vermeidbare Risiko*, Ratgeber Ehrenwirth, München, **1999**.
- [23] D. Proudfoot, C. M. Shanahan, P. L. Weissberg, *J. Pathol.* **1998**, 185, 1.
- [24] *Römpp Chemie Lexikon*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1995**.
- [25] A. F. Hollemann, E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, W. de Gruyter, Berlin, **1995**.
- [26] L. Brecevic, A. E. Nielsen, *J. Cryst. Growth* **1989**, 98, 504.
- [27] M. Epple, *Biomaterialien und Biomineralisation*, B. G. Teubner Verlag, Wiesbaden, **2003**.
- [28] K. Dahl, B. Buchardt, *J. Sedimen. Res.* **2006**, 76, 460.
- [29] B. Dickens, W. E. Brown, *Inorg. Chem.* **1970**, 9, 480.
- [30] F. Lipmann, *Naturwiss.* **1959**, 46, 553.
- [31] L. N. Plummer, E. Busenberg, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1982**, 46, 1011.
- [32] D. Kralj, L. Brecevic, *Colloid Surface A* **1995**, 96, 287.
- [33] A. A. Andersen, L. Brecevic, *Acta Chem. Scand.* **1991**, 45, 1018.
- [34] E. E. Coleyshaw, G. Crump, W. P. Griffith, *Spectrochim. Acta A* **2003**, 59, 2231.
- [35] N. V. Vagenas, A. Gatsouli, C. G. Kontoyannis, *Talanta* **2003**, 59, 831.
- [36] R. Chester, H. Elderfield, *Sedimentology* **1967**, 9, 5.
- [37] G. Duyckaerts, *Analyst* **1959**, 84, 201.
- [38] J. Johnston, H. E. Merwin, E. D. Williamson, *Am. J. Sci.* **1916**, 41, 473.
- [39] R. Brooks, L. M. Clark, E. F. Thurston, *Philos. T. Roy. Soc. A* **1950**, 243, 145.
- [40] S. R. Dickinson, G. E. Henderson, K. M. McGrath, *J. Cryst. Growth* **2002**, 244, 369.
- [41] S. A. T. Redfern, *Rev. Mineral. Geochem.* **2001**, 41, 289.

- [42] K. Suito, J. Namba, T. Horikawa, Y. Taniguchi, N. Sakurai, M. Kobayashi, A. Onodera, O. Shimomura, T. Kikegawa, *Am. Mineral.* **2001**, 86, 997.
- [43] F. W. Tegethoff, *Calciumcarbonat - Von der Kreidezeit ins 21. Jahrhundert*, Birkhäuser, **2001**.
- [44] Diamond, Version 3.1e, Bonn, **2007**.
- [45] G.-T. Zhou, Y.-F. Zheng, *N. Jb. Miner. Abh.* **2001**, 176, 323.
- [46] G. T. Faust, *Am. Mineral.* **1950**, 35, 207.
- [47] G. Wolf, C. Günther, *J. Therm. Anal. Calorim.* **2001**, 65, 687.
- [48] F. Bosselmann, Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2007**.
- [49] S. R. Kamhi, *Acta Crystallogr.* **1963**, 16, 770.
- [50] J. M. Albright, *Am. Mineral.* **1971**, 56, 620.
- [51] H. Effenberger, *Monatsh. Chem.* **1981**, 112, 899.
- [52] M. Neumann, M. Epple, *Eur. J. Inorg. Chem* **2007**.
- [53] A. Becker, Dissertation, Universität Duisburg-Essen **2005**.
- [54] F. Krauss, W. Schriever, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1929**, 259.
- [55] R. van Tassel, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1962**, 319, 107.
- [56] M. M. Tlili, M. Ben Amor, C. Gabrielli, S. Joiret, G. Maurin, P. Rousseau, *J. Raman Spectrosc.* **2001**, 33, 10.
- [57] D. G. Sapozhnikov, A. I. Zvetkov, *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **1959**, 124, 402.
- [58] E. I. Semenov, *Sov. Phys. Crystallogr.* **1964**, 9, 88.
- [59] P. Stoffers, R. Fischbeck, *Sedimentology* **1974**, 21, 163.
- [60] W. E. Krumbein, *Sedimentology* **1975**, 22, 631.
- [61] H. Catherine, W. Skinner, G. W. Osbaldiston, A. N. Wilner, *Am. Mineral.* **1977**, 62, 273.
- [62] D. Carlström, *Biol. Bull.* **1963**, 125, 441.
- [63] F. Dejehet, S. Idrissi, R. Debuyst, *J. Chem. Phys.* **1999**, 96, 741.
- [64] H. Hull, A. G. Turnbull, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1973**, 37, 685.



- [65] A. R. Lennie, C. C. Tang, S. P. Thompson, *Mineral. Mag.* **2004**, 68, 135.
- [66] K. F. Hesse, H. Küppers, *Z. Kristallogr.* **1983**, 163, 227.
- [67] <http://en.wikipedia.org/wiki/Ikaite>, **2008**.
- [68] H. Pauly, *Arctic* **1963**, 16, 263.
- [69] E. Suess, G. Wefer, C. A. Ungerer, P. J. Müller, K.-F. Hesse, W. Balzer, *Science* **1982**, 216, 1128.
- [70] T. Ito, *Geochem. J.* **1998**, 32, 267.
- [71] J. L. Bischoff, S. Stine, R. J. Rosenbauer, J. A. Fitzpatrick, T. W. Stafford, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1993**, 57, 3855.
- [72] T. C. Council, P. C. Bennet, *Geology* **1993**, 21, 971.
- [73] <http://www.geocities.com/RainForest/Vines/1486/>, **2008**.
- [74] J. F. Daniell, *Ann. Chim. Phys.* **1819**, 10, 219.
- [75] A. C. Becquerel, *Ann. Chim. Phys.* **1831**, 47, 5.
- [76] J. F. Daniell, *J. Sci. Arts* **1819**, 6, 32.
- [77] J. Pelouze, *Ann. Chim. Phys.* **1831**, 48, 301.
- [78] J. Pelouze, *Chem. Rev.* **1865**, 60, 429.
- [79] J. A. O. Bütschli, *Untersuchungen über organische Kalkgebilde*, Abhandlungen der Königlichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen, Berlin, **1908**.
- [80] J. E. MacKenzie, *J. Chem. Soc.* **1923**, 2409.
- [81] A. van Valkenburg, H. K. Mao, P. M. Bell, *Year Book*, Carnegie Institution, Washington, **1971**.
- [82] F. Vetter, *Z. Kristallogr.* **1910**, 48, 45.
- [83] J. H. Jansen, C. F. Woensdregt, M. J. Kooistra, S. J. van der Gaast, *Geology* **1987**, 15, 245.
- [84] C. L. Stein, A. J. Smith, *Init. Repts. DSDP.* **1986**, 77, 659.
- [85] T. Ito, *J. Min. Petr. Econ. Geol.* **1996**, 91, 209.
- [86] T. Ito, S. Matsubara, R. Miyawaki, *J. Min. Petr. Econ. Geol.* **1999**, 94, 176.

- [87] A. Shahar, W. A. Basset, H. W. Mao, I. M. Chou, W. Mao, *Am. Mineral.* **2005**, *90*, 1835.
- [88] W. Ostwald, *Z. Phys. Chem.* **1897**, *22*, 289.
- [89] I. Matsushita, T. Sekita, T. Suzuki, T. Moriga, T. Ashida, I. Nakabayashi, *Zairyo* **1993**, *42*, 195.
- [90] I. Matsushita, Y. Hamada, T. Moriga, T. Ashida, I. Nakabayashi, *J. Ceram. Soc. Jpn.* **1996**, *104*, 1088.
- [91] K. Sawada, *Pure Appl. Chem.* **1997**, *69*, 921.
- [92] G. Dorfmueller, *Deutsch. Zuckerind.* **1938**, *51*, 1217.
- [93] E. Loste, R. M. Wilson, R. Seshadri, F. C. Meldrum, *J. Cryst. Growth* **2003**, *254*, 206.
- [94] S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, *Adv. Mater.* **2000**, *12*, 38.
- [95] J. R. Clarkson, T. J. Price, C. J. Adams, *J. Chem. Soc. Faraday T.* **1992**, *88*, 243.
- [96] J. J. J. M. Donners, B. R. Heywood, E. W. Meijer, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Eur. J.* **2002**, *8*, 2561.
- [97] L. B. Gower, D. J. Odom, *J. Cryst. Growth* **2000**, *210*, 719.
- [98] T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1987**, *51*, 2757.
- [99] N. Koga, Y. Nakagoe, H. Tanaka, *Thermochim. Acta* **1998**, *318*, 239.
- [100] R. S. K. Lam, J. M. Charnock, A. Lennie, F. C. Meldrum, *Cryst. Eng. Comm.* **2007**, *9*, 1226.
- [101] M. Faatz, F. Gröhn, G. Wegner, *Adv. Mater.* **2004**, *16*, 996.
- [102] E. Loste, F. C. Meldrum, *Chem. Commun.* **2001**, 901.
- [103] M. M. Reddy, G. H. Nancollas, *J. Cryst. Growth* **1976**, *35*, 33.
- [104] H. Cölfen, L. Qi, *Chem. Eur. J.* **2001**, *7*, 106.
- [105] J. J. J. M. Donners, B. R. Heywood, E. W. Meijer, R. J. M. Nolte, C. Roman, A. P. H. J. Schenning, N. A. J. M. Sommerdijk, *Chem. Commun.* **2000**, *19*, 1937.

- [106] J. J. J. M. Donners, R. J. M. Nolte, N. A. J. M. Sommerdijk, E. W. Meijer, *Polym. Mat. Sci. Eng.* **2001**, 84, 1039.
- [107] P. Kjellin, K. Holmberg, M. Nyden, *Colloid Surface A* **2001**, 194, 49.
- [108] C. Li, L. Qi, *Angew. Chem. Int. Edit* **2008**, 47, 2388.
- [109] H. A. Lowenstam, S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press, New York, **1989**.
- [110] F. W. Clarke, W. C. Wheeler, *The inorganic constituents of marine invertebrates*, Washington DC, **1922**.
- [111] A. P. Vinogradov, *The elementary chemical composition of marine organism*, Sears Foundation For Marine Research, New Haven, **1953**.
- [112] B. Hasse, H. Ehrenberger, J. C. Marxen, W. Becker, M. Epple, *Chem. Eur. J.* **2000**, 6, 3679.
- [113] J. C. Marxen, W. Becker, D. Finke, B. Hasse, M. Epple, *J. Mollus. Stud.* **2003**, 69, 113.
- [114] Y. Levi-Kalisman, S. Raz, S. Weiner, L. Addadi, I. Sagi, *J. Chem. Soc. Dalton* **2000**, 3977.
- [115] J. C. Elliot, *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, **1994**.
- [116] E. Riedel, *Anorganische Chemie*, 3. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin, **1994**.
- [117] R. A. Young, W. E. Brown, *Structure of biological minerals*, Springer-Verlag, Berlin, **1982**.
- [118] R. Z. LeGeros, *Biological and synthetic apatites*, Brown, P. W. , London, **1994**.
- [119] H. Newesely, *Monatsh. Chem.* **1967**, 98, 379.
- [120] M. Bohner, *Eur. Spine J.* **2001**, 10, 114.
- [121] M. I. Kay, R. A. Young, A. S. Posner, *Nature* **1964**, 1050.
- [122] P. Layrolle, A. Lebugle, *Chem. Mater.* **1994**, 6, 1994.

- [123] R. Z. LeGeros, W. P. Shirra, M. A. Miravite, J. P. LeGeros, *Amorphous calcium phosphate: synthetic and biological*, CNRS, Paris, **1975**.
- [124] M. S. Tung, W. E. Brown, *Calcified Tissue Int.* **1983**, 35, 783.
- [125] P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. H. Nancollas, *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 102, 1553.
- [126] T. P. Feenstra, P. L. de Bruyn, *J. Phys. Chem.* **1979**, 83, 475.
- [127] A. S. Posner, F. Betts, *Accounts Chem. Res.* **1975**, 8, 273.
- [128] E. D. Eanes, I. H. Gillessen, A. S. Posner, *Nature* **1965**, 208, 365.
- [129] J. D. Termine, R. A. Peckauskas, A. S. Posner, *Arch. Biochem. Biophys.* **1970**, 140, 318.
- [130] J. E. Harries, S. S. Hasnain, J. S. Shan, *Calcified Tissue Int.* **1987**, 41, 346.
- [131] J. E. Harries, D. W. L. Hukins, C. Holt, S. S. Hasnain, *J. Cryst. Growth* **1987**, 84, 563.
- [132] C. Jäger, T. Welzel, W. Meyer-Zaika, M. Epple, *Magn. Reson. Chem.* **2006**, 44, 573.
- [133] D. G. A. Nelson, J. D. B. Featherstone, *Calcified Tissue Int.* **1982**, 34, 69.
- [134] M. E. Fleet, X. Liu, *J. Solid State Chem.* **2003**, 174, 412.
- [135] M. E. Fleet, X. Liu, *J. Solid State Chem.* **2004**, 177, 3174.
- [136] A. S. Posner, *Clin. Orthop. Rel. Res.* **1985**, 200, 87.
- [137] R. M. Wilson, J. C. Elliot, S. E. P. Dowker, L. M. Rodriguez-Lorenzo, *Biomaterials* **2005**, 26, 1317.
- [138] M. D. Francis, W. S. Briner, J. A. Gray, *Chemical agents in the control of calcification processes in biological systems*, Elsevier, London, **1973**.
- [139] W. Achilles, *Nephrology* **1987**, 58, 59.
- [140] R. Z. LeGeros, *J. Dent. Res.* **1974**, 53, 45.
- [141] de.encarta.msn.com, **2008**.
- [142] www.vitanet.de, **2008**.

- [143] B. B. Tomazic, *Characterization of mineral phases in cardiovascular calcification*, CRC Press, Boca Raton, **1994**.
- [144] B. B. Tomazic, *Z. Kardiol.* **2001**, *90*, 68.
- [145] M. Epple, P. Lanzer, *Z. Kardiol.* **2001**, *90*, 2.
- [146] W. Jahnen-Dechent, T. Schinke, A. Trindl, W. Müller-Esterl, F. Sablitzky, S. Kaiser, M. Blessing, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 31496.
- [147] G. Luo, P. Ducy, M. D. McKee, G. J. Pinero, E. Loyer, R. R. Behringer, G. Karsenty, *Nature* **1997**, *386*, 78.
- [148] I. Nadra, J. C. Mason, P. Philippidis, O. Florey, C. D. W. Smythe, G. M. McCarthy, R. C. Landis, D. O. Haskard, *Circ. Res.* **2005**, *96*, 1248.
- [149] J. Jerosch, A. Bader, G. Uhr, *Knochen, Curasan Taschenatlas spezial*, 1. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **2002**.
- [150] J. S. Nyman, M. Reyes, X. Wang, *Micron* **2005**, *36*, 566.
- [151] S. L. Teitelbaum, M. M. Tondravi, F. P. Ross, *J. Leukoc. Biol.* **1997**, *61*, 381.
- [152] P. H. Schlesinger, H. C. Blair, S. L. Teitelbaum, J. C. Edwards, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 18636.
- [153] M. Amling, A. F. Schilling, P. Pogoda, M. Priemel, J. M. Rueger, *Eur. J. Trauma* **2006**, *32*, 102.
- [154] M. Grynopas, *Calcified Tissue Int.* **1993**, *53*, 57.
- [155] A. S. Posner, F. Betts, *Accts. Chem. Res.* **1975**, *8*, 273.
- [156] J. Menczel, A. S. Posner, R. A. Harper, *Isr. J. Med. Sci.* **1965**, *1*, 251.
- [157] R. Z. LeGeros, *Calcium Phosphates in oral biology and medicine*, Karger, Basel, **1991**.
- [158] M. Kikuchi, H. N. Matsumoto, T. Yamada, *Biomaterials* **2004**, *25*, 63.
- [159] A. K. Lynn, T. Nakamura, N. Patel, *J. Biomed. Mater. Res.* **2005**, *74A*, 447.
- [160] W. Linhart, F. Peters, W. Lehmann, *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, *54*, 162.
- [161] C. Schiller, M. Epple, *Biomaterials* **2003**, *24*, 2037.

- [162] N. Ignjatovic, E. Suljovrujic, J. Biudinski-Simendic, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* **2004**, 71B, 284.
- [163] M. Kikuchi, Y. Koyama, T. Yamada, *Biomaterials* **2004**, 25, 5979.
- [164] C. H. Yao, B. S. Liu, S. H. Hsu, *J. Biomed. Mater. Res.* **2004**, 69A, 709.
- [165] J. C. Brodie, E. Goldie, G. Connel, *J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater.* **2005**, 73, 409.
- [166] S. Yamada, *Biomaterials* **1997**, 18, 1037.
- [167] B. R. Constantz, I. C. Ison, M. T. Fulmer, *Science* **1995**, 267, 1796.
- [168] E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, *J. Mat. Sci. Mater. M.* **1999**, 10, 169.
- [169] E. Fernandez, F. J. Gil, M. P. Ginebra, *J. Mat. Sci. Mater. M.* **1999**, 10, 177.
- [170] A. Bigi, B. Bracci, S. Panzavolta, *Biomaterials* **2004**, 25, 2893.
- [171] H. W. Kim, E. J. Lee, H. E. Kim, *Biomaterials* **2005**, 26, 4395.
- [172] B. H. Yoon, H. W. Kim, S. H. Lee, *Biomaterials* **2005**, 26, 2957.
- [173] S. L. Flegler, J. W. Heckman, K. L. Klomparens, *Elektronenmikroskopie, Spektrum, Heidelberg*, **1995**.
- [174] P. J. Goodhew, F. J. Humphrey, *Electron microscopy and analysis*, 2. Auflage, Taylor and Francis, **1988**.
- [175] W. Massa, *Kristallstrukturbestimmung*, 3. Auflage, B. G. Teubner GmbH, Wiesbaden, **2002**.
- [176] L. Spieß, R. Schwarzer, H. Behnken, G. Teichert, *Moderne Röntgenbeugung*, 1. ed., B. G. Teubner GmbH, Wiesbaden, **2005**.
- [177] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, 2. Auflage, VCH Weinheim, **1996**.
- [178] H. Günther, *NMR-Spektroskopie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, **1992**.
- [179] J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner, G. Lambert, *Adv. Mater.* **1996**, 8.
- [180] T. Y. J. Han, J. Aizenberg, *Chem. Mater.* **2008**, 20, 1064.
- [181] K. Kamiya, S. Sakka, K. Terada, *Mater. Res. Bull.* **1977**, 12, 1095.
- [182] R. A. Berner, *Geochim. Cosmochim. Ac.* **1975**, 39, 489.

- [183] A. Glasner, D. Weiss, *J. Inorg. Nucl. Chem.* **1980**, *42*, 655.
- [184] A. K. Alwan, P. A. Williams, *Transit. Metal. Chem.* **1979**, *4*, 128.
- [185] J. L. Jambor, *Can. Mineral.* **1964**, *8*, 92.
- [186] J. Neczaj-Hruzewicz, W. Janusz, J. Szczypa, *Gazz. Chim. Ital.* **1977**, *107*, 461.
- [187] H. W. Papenguth, R. J. Kirkpatrick, B. Montez, P. A. Sandberg, *Am. Mineral.* **1989**, *74*, 1152.
- [188] J. Feng, Y. L. Lee, R. J. Reeder, B. L. Phillips, *Am. Mineral.* **2006**, *91*, 957.
- [189] N. Nassif, N. Pinna, N. Gehrke, M. Antonietti, C. Jäger, H. Cölfen, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12653.
- [190] S. J. Gaffey, *Am. Mineral.* **1995**, *80*, 947.
- [191] J. P. Yesinowski, H. Eckert, G. R. Rossman, *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 1367.
- [192] R. Detsch, H. Mayr, G. Ziegler, *Acta Biomaterialia* **2008**, *4*, 139.
- [193] S. A. Redey, M. Nardin, C. Rey, P. Delannoy, L. Sedel, J. P. Marie, D. Bernache-Assolant, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *50*, 353.
- [194] R. Zhang, P. X. Ma, *J. Biomed. Mater. Res.* **1999**, *44*, 446.
- [195] R. Zhang, P. X. Ma, *J. Biomed. Mater. Res.* **2000**, *52*, 430.
- [196] Y. Zhang, M. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res.* **2001**, *55*, 304.
- [197] S. J. Jones, A. Boyde, *J. Biomed. Mater. Res.* **1984**, *170*, 247.
- [198] A. S. Posner, F. Betts, *Acc. Chem. Res.* **1975**, *8*, 273.
- [199] T. M. Doherty, R. C. Detrano, *Calcified Tissue Int.* **1994**, *54*, 224.
- [200] A. Farb, A. P. Burke, A. L. Tang, *Circulation* **1996**, *93*, 1354.
- [201] H. Huang, R. Virmani, H. Younis, *Circulation* **2001**, *103*, 1051.
- [202] A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. M. McCarthy, M. Epple, M. Neumann, C. M. Shanahan, D. Proudfoot, **2008**.
- [203] P. B. Halverson, A. Greene, H. S. Cheung, *Osteoarthr. Cartilage* **1998**, *6*, 324.

- 
- [204] S. Ehara, Y. Kobayashi, M. Yoshiyama, *Circulation* **2004**, *110*, 3424.
- [205] Y. Vengrenyuk, S. Carlier, S. Xanthos, *P. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 14678.
- [206] R. Virmani, A. P. Burke, F. D. Kolodgie, *J. Interv. Cardiol.* **2003**, *16*, 267.
- [207] X. Chen, C. Deng, S. Tang, *Biol. Pharm. Bull.* **2007**, *30*, 128.
- [208] W. Li, M. Ostblom, L. H. Xu, *Faseb J.* **2006**, *20*, 2281.
- [209] M. P. Morgan, G. M. McCarthy, *Curr. Opin. Rheumatol.* **2002**, *14*, 292.
- [210] D. Tadic, F. Peters, M. Epple, *Biomaterials* **2002**, *23*, 2553.
- [211] D. Tadic, Dissertation, Ruhr-Universität Bochum **2003**.



## **8. Anhang**

### **8.1 Abkürzungsverzeichnis**

ACC	amorphes Calciumcarbonat
ACP	amorphes Calciumphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
BCP	Biphasisches Calciumphosphat
CDHA	Calcium-defizitärer Hydroxylapatit
CHAP	Carbonatapatit
DCPA	Dicalciumphosphat-Anhydrat; Monetit
DICPD	Dicalciumphosphat-Dihydrat; Brushit
DSC	Dynamische Differenz-Kalorimetrie (engl. <i>differential scanning calorimetry</i> )
EDX	energiedispersive Röntgenspektroskopie (engl. <i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i> )
EXAFS	Röntgenabsorptionsspektroskopie (engl. <i>extended X-ray absorption fine structure</i> )
HAP	Hydroxylapatit
ICDD	<i>International Centre for Diffraction Data</i>
IR	Infrarot
MHC	Monohydrocalcit
NMR	Kernresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i> )
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PVA	Polyvinylalkohol
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
TCP	Tricalciumphosphat
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TG	Thermogravimetrie
XRD	Röntgendiffraktometrie

**8.2 Verzeichnis der verwendeten Chemikalien****Tabelle 17:** Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien

Name	Gefahrensymbol	R-Sätze	S-Sätze	Firma
Aceton	F, X <sub>i</sub>	11-36-66-67	9-16-26	Fisher Chemicals
Calciumchlorid- Dihydrat	X <sub>i</sub>	36	22-24	Sigma
Calciumhydroxid	C	37/38-41	22-24-26-39	Merck
Calciumlactat	-			Merck
Kaliumcarbonat	X <sub>i</sub>	36/37/38	22-26	Merck
Kohlenstoffdioxid	-	-	9-23	Messer Griesheim
Magnesiumchlorid	-	-	-	Merck
Magnesiumnitrat- Hexahydrat	O	8	24/25	Riedel-de Haen
Natriumcarbonat	X <sub>i</sub>	36	22, 26	Merck
Natriumchlorid	-	-	-	AppliChem GmbH
Natriumhydrogenphosphat	-	-	-	Merck
Natriumhydroxid	C	35	26, 36-37/39-45	Carl Roth GmbH
verdünnte Phosphorsäure	C	34	26-45	
Strontiumchlorid	X <sub>n</sub>	22	-	Acros Organics
Zinknitrat-Hexahydrat	X <sub>n</sub> , O	8-22-36/37/38	26	Riedel-de Haen

### **8.3 Publikationsliste**

#### **Veröffentlichungen:**

1. M. Neumann, M. Epple, Composites of calcium phosphate and polymers as bone substitution materials: A review; *Eur. J. Trauma*, **2006**, 32, 125-131.
2. M. Neumann, M. Epple, Monohydrocalcite and its relationship to hydrated amorphous calcium carbonate in biominerals, *Eur. J. Inorg. Chem.* **2007**, 1953-1957
3. H. Nebel, M. Neumann, C. Mayer, M. Epple, On the structure of amorphous calcium carbonate – a detailed study by solid-state NMR spectroscopy (eingereicht)
4. A. E. Ewence, M. Bootman, H. L. Roderick, J. N. Skepper, G. McCarth, M. Epple, M. Neumann, C. M. Shanahan, D. Proudfoot, Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells: a potential mechanism in atherosclerotic plaque de-stabilization (eingereicht)
5. R. Detsch, M. Epple, M. Neumann, S. Schluefter, A. Vortkamp, M. Wuelling, G. Ziegler, Cellular reaction towards nanocrystalline carbonated apatite compared to sintered HA- and TCP- ceramics (in Vorbereitung)

**Konferenzbeiträge:**

M. Neumann, M. Epple, „Synthese, Struktur und thermochemisches Verhalten von Monohydrocalcit“, 17. Ulm-Freiburger Kalorimetrietage, Freiberg, 28.-30. März 2007 (**Poster**)

M. Neumann, M. Epple, “Preparation of the metastable phases amorphous calcium carbonate (ACC) and calcium carbonate hexahydrate (Ikaite) and their transformation into stable calcium carbonate phases”, European Geosciences Union General Assembly 2008, Wien, 13.-18. April 2008 (**Vortrag**)

## **8.4 Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Name: Markus Neumann  
Geburtsdatum: 21.03.1978  
Geburtsort: Krefeld  
Familienstand: ledig, keine Kinder  
Staatsangehörigkeit: deutsch



### **Schulische Ausbildung**

1988 - 1997 Maria-Sibylla-Merian-Gymnasium in Krefeld,  
Abschluss: Abitur

### **Zivildienst**

1998-1999 Tätigkeit in der Pflege einer chirurgischen  
Station im Krankenhaus Maria-Hilf in Krefeld

### **Studium**

10/1999 - 03/2005 Studium der Chemie an der Universität  
Duisburg-Essen  
Abschluss als Diplom-Chemiker

05/2005 - 05/2008 Promotion an der Universität Duisburg-Essen im  
Fachbereich der Anorganischen Chemie

### **8.5 Danksagung**

Diese Dissertation und die erhaltenen Ergebnisse wären ohne die Unterstützung durch Mitarbeiter der Anorganischen Chemie und die Kooperation mit anderen Forschungsgruppen nicht in dieser Form möglich gewesen.

Mein herzlicher Dank gilt deswegen:

Prof. Dr. Matthias Epple für die Möglichkeit, bei ihm promovieren zu dürfen.

Prof. Dr. Christian Mayer für die Übernahme des Koreferats und die Möglichkeit der Kooperation während der Arbeit.

Meinen weiteren Kooperationspartnern Frau Dr. Manuela Wülling (ZMB Essen), Frau Dr. Diane Proudfoot (Universität Cambridge) und Herrn Rainer Detsch (FBI Bayreuth) danke ich für die stets gute Zusammenarbeit und Hilfe.

Herrn Manfred Zähres für die zahlreichen NMR-Messungen.

Herrn Jörg-Holger Ibsch für die vielen XRD-Messungen.

Herrn Dipl. Ing. Smail Boukercha für die zahlreichen REM-Aufnahmen.

Frau Barbara Nota für ihre stete Hilfe bei verwaltungstechnischen Fragen.

Frau Ursula Giebel für ihre immer vorhandene Hilfsbereitschaft.

Frau Kerstin Brauner und Frau Veronika Hiltenkamp für die Durchführung der Elementaranalysen.

---

Mein Dank gilt den Kollegen, die immer ein offenes Ohr für kleinere oder größere Probleme hatten und mit denen ich nette, lustige Tage und Abende verbringen konnte. Insbesondere danken möchte ich Frank Neues und Holger Nebel für ihre Freundschaft und die vielen privaten Gespräche. Ebenfalls danken möchte ich Dirk Mahl für die netten Unterhaltungen.

Des Weiteren möchte ich mich bei folgenden Kollegen für die kritische Durchsicht dieser Arbeit bedanken: Janine Schwiertz, Stefanie Kittler, Thorsten Peitsch, Dirk Mahl, Holger Nebel und Frank Neues.

Nicht zuletzt danken möchte ich auch meiner Familie, die ebenfalls bei der Korrektur dieser Arbeit mitgewirkt und mich zu jeder Zeit unterstützt hat.

Alle, die hier ungenannt bleiben, bitte ich um Nachsicht. Diese Liste erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Arbeit mit dem Titel

**„Synthese und Charakterisierung von Calciumcarbonat-Phasen und Calciumphosphat-basierter Knochenersatzmaterialien“**

selbst verfasst und keine außer den angegebenen Hilfsmitteln und Quellen verwendet zu haben.

Zudem erkläre ich, dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form bei keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Essen, im Mai 2008

Markus Neumann