

2.1. Testmaterialien

2.1.1. Implantatoberflächen

Alle Titansubstrate wurden aus Reintitan Grad 2 (ASTM-F67) hergestellt. Die verwendeten Titanscheiben weisen 10 mm Querschnitt und 2 mm Dicke auf und wurden mit Gammastrahlen sterilisiert (Friadent Dentsply Inc., Mannheim, FRG). Die Oberflächen unterscheiden sich jedoch:

- Titan-Plasma-Beschichtung erzeugt durch das Plasmaspritzverfahren (Ti-TPS; Oberflächenrauigkeit: 18-20 μm)
- Titantiefenstrukturierung (Ti-DPS; Oberflächenrauigkeit: 18 μm), erzeugt durch Sandstrahlen mit 300-600 μm Al_2O_3 -Partikeln und anschließendes Ätzen
- Titan mit Hydroxylapatit-Plasma-Flame-Beschichtung nach dem Flammenspritzverfahren (Ti-HA; Oberflächenrauigkeit: 18-20 μm)
- Titan mit unterschiedlichen Calciumphosphatbeschichtung durch Plasmaspritzen
- Glatt polierte Titanoberfläche (Ti-ma) von Friadent/Dentsply als Kontrolle.

Die Oberflächenrauigkeit wurde mit dem Profilometer (UBM microfocus surface-measuring system, UBM Inc., Ettlingen, FRG) gemessen. Zur Bestimmung der Oberflächenrauigkeit wurden folgende Parameter berücksichtigt: R_a (arithmetischer Durchschnitt des Rauigkeitsdurchschnitts innerhalb einer Durchschnittslinie), R_t (Verhältnis eines Maximumwerts zu einem Minimumwert in einer geschätzten Länge) und R_z (DIN) (Durchschnitt der 5 aufeinanderfolgenden Werte einer Rauigkeitshöhe, welcher als Distanz zwischen dem Höchstwert und dem niedrigsten Wert zu definieren ist).

Als Resultat der Oberflächenrauigkeitsmessung ergab Ti-TPS den höchsten Rauigkeitswert, dicht gefolgt von Ti-DPS. Deutlich niedriger war der Wert von Ti-HA und am niedrigsten der Oberflächenrauigkeitswert von Ti-ma:

Oberflächenrauigkeit der dentalen Implantatoberflächen

Biomaterial	Oberflächenrauigkeit		
	R_z DIN (μm)	R_a (μm)	R_t (μm)
Ti-ma	1.02	0.15	1.56
Ti-TPS	14.77	3.43	20.49
Ti-DPS	13.06	2.91	19.11
HA	7.60	2.07	12.55

Weiterhin wurden die Substrate einer quantitativen röntgenologischen Diffraktionsanalyse (XRD) unterzogen. Das angewandte Röntgendiffraktometer gehört der Firma Philips und ist mit Cu-Tuben und Ni-Filter ausgestattet. Eine Magnetresonanzmessung [^{31}P magic angle spinning (MAS)-nuclear magnetic resonance (NMR)] und XRD wurden zur Charakterisierung der plasmabeschichteten Hydroxylapatite benutzt [137]. Die XRD-Analyse bestätigte einen Gehalt von 99 % Hydroxylapatit (HA) und 1 % Tricalciumphosphat (TCP) in der Hydroxylapatitbeschichtung. Diese Schicht besteht zu 60 % in der kristallinen Form.

Die Oberflächenbeschichtung wurde weiterhin durch die Energie-Dispersive Röntgenspektrometrie (EDX) und die Ionen-gekoppelte-Plasma-Analyse ICP (Philips Ion-Coupled-Plasma-Spectrometer PU 7450) untersucht:

ICP-Elementanalyse der Hydroxylapatitbeschichtung

Element	Atomare Zusammensetzung (atom %)
Ca	24.43
P	14.61
O	60.96
Ca/P	01.67

Die poröse Oberfläche bietet dem Gewebe die Möglichkeit hineinzuwachsen [51] und somit eine stabilere Verbindung herzustellen.

Ein Schwachpunkt der Hydroxylapatit-Plasma-Flame-Beschichtung ist allerdings ihre thermische Instabilität und der von Titan und Titanlegierung (Ti6Al4V) abweichende thermische Expansionskoeffizient. HA-Plasma-Flame-Beschichtungen können eine unterschiedliche Kristallinität aufweisen [16, 44, 69, 73, 118, 131, 132, 144], welche mit der Löslichkeit korreliert. Diese ist höher bei geringerer Kristallinität. Aus diesem Grund werden die HA-Plasma-Flame-Beschichtungen häufig einer Wärmebehandlung unterzogen, um die Kristallinität zu steigern [16]. Die Wärmebehandlung führt jedoch aufgrund des unterschiedlichen thermischen Expansionskoeffizienten zu Spannungen zwischen der Beschichtung und dem Kern aus Titanlegierung oder Titan. Diese Spannung kann ein Abplatzen der Beschichtung verursachen.

Calciumtitanphosphate

Calciumtitanphosphate (CTP) sind Biowerkstoffe, die zur gesteigerten Knochenapposition an der Implantatoberfläche verwendet werden. Die feinpulvrigen (Körnergröße 40 µm) Ausgangsmaterialien wurden in einer Edelstahlpressform kalt zu Scheiben mit 10 mm Durchmesser verpresst und nach speziellen Sinterprogrammen bei 1350 bis 1400° C dicht versintert. (Friadent/Dentsply Inc).

Sie werden mittels Plasmaspritzen aufgetragen und dienen als Alternative zur Hydroxylapatit-Plasma-Flame-Beschichtung, da sie mit dem Titan einen angepassten thermischen Ausdehnungskoeffizienten besitzen und somit die Schwankungen in der Schichtqualität überwinden sollten [8, 93, 116].

Zur Entwicklung von Calciumtitanphosphatmaterialien wurde versucht, biokompatible und bioaktive Schichtsysteme auf der Basis von Calciumphosphatzusammensetzungen im System $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ - $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$ und $\text{CaZr}_4(\text{PO}_4)_6$ (Tricalciumphosphat- Calciumtitanphosphat- Calciumzirkonphosphat bzw. TCP-CTP-CZP) herzustellen. In ihrer chemischen Stabilität ähneln sie HA und CTP, sind jedoch weniger löslich als HA. Weiterhin sind Calciumtitanphosphate bioaktiv und biokompatibel und besitzen einen angepassten thermischen Ausdehnungskoeffizienten. Sie besitzen die Eigenschaft, das Knochenwachstum anzuregen und auf ihrer Oberfläche die Stammzellendifferenzierung zu beschleunigen [24, 32, 108].

Biomaterialien	<i>Therm. Expansionskoeffizient</i> [$\times 10^{-6} \text{K}^{-1}$]
Ti	9,1
HA	11
CTP	6,2
46 CaO 23TiO ₂ 31P ₂ O ₅	8
55CaO 20TiO ₂ 25P ₂ O ₅ ; (CTP-S3)	13,3

Die hier zu untersuchenden Calciumphosphatmaterialien sind:

- gesintertes CTP ; $\text{CaTi}_4(\text{PO}_4)_6$, (CTP-S1)
- gesintertes $46 \text{ CaO } 23\text{TiO}_2 \text{ } 31\text{P}_2\text{O}_5$, (CTP-S2)
- gesintertes $46 \text{ CaO } 23\text{ZrO}_3 \text{ } 31\text{P}_2\text{O}_5$, (CTZP-S2)
- gesintertes $55 \text{ CaO } 20\text{TiO}_2 \text{ } 25\text{P}_2\text{O}_5$, (CTP-S3)

Als Kontrollmaterial dient der Zellkulturkunststoff Polystyrol.

CTP-S2 ist ein homogenes Gemenge verschiedener kristalliner Phasen und kann geschmolzen und gegossen werden. Nach der Abkühlung können die Glasphasen durch Wärmebehandlung in kristalline Phasen überführt werden. Eine Phasentransformation geschieht bei Temperaturen über 600° C . CTP-S2 ist dann ein homogenes kristallines Produkt und enthält mehrere kristalline Phasen. Es weist eine hohe chemische Stabilität auf. CTP und CZP besitzen eine hexagonale Struktur, die für ihre hohe Stabilität und gleichzeitige Flexibilität verantwortlich ist.

Die Calciumphosphatbeschichtungen können entweder durch atmosphärisches Plasmaspritzen (APS-Verfahren) oder durch Flammenspritzen (High Velocity Flame Spraying; HVOF) hergestellt werden. Das APS-Verfahren erzeugt Beschichtungen mit geringerem Kristallinitätsgrad und damit höherer Löslichkeit, während das HVOF-Verfahren Schichten mit höherem Kristallinitätsgrad und damit mit geringerer Löslichkeit produziert. Hier werden die durch APS- und HVOF-Verfahren erzeugten Schichten in 0,2 M TRIS-HCL-Pufferlösung untersucht.

Bei den vorliegenden Substraten ist die Knochenbindungsfähigkeit eine bekannte Eigenschaft [47, 52, 72, 87, 104, 110, 111, 145]. Sie sind in der Lage, auf ihre Oberfläche eine Apatitschicht mit annähernd gleichem pH-Wert (7, 40) wie die menschliche Blutplasma zu bilden [76, 83, 86, 87, 97, 109, 110]. Die auf diese Weise entstehende Apatitschicht ähnelt sowohl in der Zusammensetzung als auch in der Struktur dem Knochenapatit. Die osteogenen Zellen können sich in dieser Apatitschicht proliferieren und differenzieren. Folglich ist die Knochenbindungsfähigkeit der Materialien von ihrer Apatitschichtproduktion abhängig [85].

2.1.2. Knochenersatzmaterialien

Bioglas

Biogläser können mit unterschiedlichem SiO₂-Gehalt hergestellt werden. Bioglas 45s5 enthält 45 %, Bioglas 52s 52 %, Bioglas 55s 55 % und Bioglas 60s 60 % Siliziumoxid. Weiterhin enthalten die Biogläser Natriumoxid (Na₂O), Calciumoxid (CaO) und Diphosphorpentoxid (P₂O₅). Dabei handelt es sich um ein bioaktives Glas auf Silizium-Alkali-Basis, das mit dem umgebenden Knochen eine chemische und physikalische Verbindung eingeht. Der hohe Natriumanteil begünstigt zwar die Knochenmineralisation, sorgt jedoch gleichzeitig für eine hohe Löslichkeit des Materials und dessen Langzeitinstabilität [98].

Bioglas 45s5 beinhaltet 24,5 % Na₂O, 24,5 % CaO, und 6 % P₂O₅ (Gewichtsprozent). Bioglas 52s besteht zusätzlich aus 21 % Na₂O, 21 % CaO und 6 % P₂O₅ (Gewichtsprozent). Bioglas 55s enthält neben dem SiO₂ 19,5 % Na₂O, 19,5 % CaO und 6 % P₂O₅ (Gewichtsprozent). Bioglas 60s besteht aus 60 % Siliziumoxid (SiO₂), 17 % Na₂O, 17 % CaO und 6 % P₂O₅ (Gewichtsprozent). Das Rohglas wurde in Kugelmühle zerkleinert und mit der Granulatgröße zwischen 90 bis 710 µm durch Siebung gewonnen. Im vorliegenden Fall wurden Bioglaspartikeln der Firma US-Biomaterials, Alachua, Florida, USA zur Untersuchung verwendet.

Glaskeramik

Ceravital ist eine alkaliarme Kristallinapatithaltige ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) Glaskeramik, die von einer Matrix aus Natriumoxid (Na_2O), Kaliumoxid (K_2O), Magnesiumoxid (MgO), Calciumoxid (CaO) und Siliziumoxid (SiO_2) ummantelt ist. Der Natriumanteil und die Gesamtalkalikonzentration sind im Vergleich zu Biogläsern reduziert, und die Silikophosphatgläser sind keramisiert. Die Granulatgröße beträgt, ähnlich wie die Biogläser, zwischen 90 bis 710 μm und stammt von der Firma Leitz Wetzlar. Diese Tatsachen erhöhen die Langzeitstabilität des Materials gegenüber den Biogläsern [98].

Aluminiumoxidkeramiken

Im vorliegenden Fall dienen sie als Vergleichsmaterial. Al_2O_3 der Firma Friadent/Dentsply zwischen 90 bis 710 μm wird als enossales Implantat eingesetzt. Sie liegen entweder als glatte oder oberflächenstrukturierte Aluminiumoxidkeramiken vor [21]. In der hochreinen Form gelten sie als besonders langzeitstabil [29] und bioinert. Bei einer Implantation können metallische Aluminiumionen ins Gewebe gelangen.

2.2. Methode

Bei den vorliegenden Zellen handelt es sich um primäre humane Osteoblasten, die aus Knochenstücken gewonnen und modifiziert nach der von Bellows et al. [7, 63, 149, 150] entwickelten Methode angezüchtet wurden. Die Knochenstücke wurden von der Wirbelsäule einer gesunden jünger als 10 Jahre alten Patientin im Rahmen einer Formkorrektur entnommen. Die Entnahme wurde mit Genehmigung der Ethikkommission durchgeführt.

Das Kulturmedium der humanen Osteoblasten besteht aus:

- Alpha-Medium (1x); Firma Biochrom AG; Kat.-Nr. F 0925
- 10 ml fetalem Kälberserum; Firma Biochrom KG; Kat.-Nr. S 0115
- Penicillin/Streptomycin 10 000E (10000 µg/ml); Firma Biochrom AG; Kat.-NR. A2213
- 200 mM L-Glutamin; Firma Biochrom AG; Kat.-Nr. K 0283
- 25 mM Hepes buffer; Firma Biochrom AG; Kat.-Nr. L-1613
- 0.1 M L-Ascorbinsäurephosphat; Firma Waker; Kat.-Nr. 013-12061
- PBS (1x); Firma Biochrom AG; Kat.-Nr. L 1825
- EDTA; Firma Sigma; Kat.-Nr. 6381-92-6 und
- Trypcin; Firma Sigma; Kat.-Nr. 9002-07-7 } 0.02 % EDTA+0.1 %
Trypcin in PBS gelöst.

Die Rattenosteoblasten wurden aus Femur, Tibia und Humerus gewonnen und nach Methode von Maniatopoulos et al. [94] und Davies et al. [26] in einem Kulturmedium angezüchtet. Das Zellkulturmedium besteht aus:

- Alpha-Minimalmedium (Gibco; Kat.-Nr. 22571-020) mit Ribonucleosiden und Desoxyribonucleosiden
- 15 % fetalem Kälberserum (Gibco; Kat.-Nr. 10106-060)
- Penicillin G (Sigma; Kat.-Nr. 7404)
- Gentamycin (Gibco; Kat.-Nr. 15750-037)

- Amphotericin B (Sigma; Kat.-Nr. 9528)
- Dexamethason (Sigma;Kat.-Nr. D1756)
- β -Glycerophosphat (Sigma; Kat.-Nr. C6251)
- Ascorbinsäure (Sigma; Kat.-Nr. A 274)

zum Passagieren:

- Natrium-Citrat-Kochsalzlösung
- Trypsin-Citrat-Kochsalzlösung

zum Fixieren:

- PBS
- Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer (4 %)
- 0,04 M TES-Puffer (3 %)

Weitere für die Untersuchung verwendete Materialien sind:

- 75 cm² Glaskolben
- 24 sterile Zellkultureinsätze aus Polyethylenterephthalat mit 1,0 μ m Porengröße; Firma Nunc; Kat.-Nr. 143982
- sterile Zellkulturflaschen; Firma Nunc; Kat.-Nr. 156499
- Sterilfilter für Medium; Firma Nunc; Kat.-Nr. 291-4520
- Umkehrmikroskop; Firma Wilovert
- Abzug: Kojair KR-125
- Zentrifugenröhrchen, 15 ml, Firma Nunc
- Zentrifuge, Firma Heraeus, "Varifuge", Typ-Nr.: 4122

Die Zelldichte betrug 8×10^5 pro cm². Die Biogläser und Glaskeramik wurden als Partikel und Calciumtitanphosphat als Scheiben bei 200° C für 3 Stunden hitzesterilisiert. Die Titanoberflächen wurden vom Hersteller Gamma hitzesterilisiert. Die Menge der Substrate betrug 4 mg. Sie wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen quantitativ untersucht. Der Zeitpunkt der Untersuchungen war der 3., 5., 7., 14. und 21. Tag.

2.2.1 Kultivierungstechnik der humanen Osteoblasten

Bei der Haltung der Osteoblasten sollten die Bedingungen den physiologischen Gegebenheiten im Organismus möglichst nahe kommen. Deshalb entsprechen auch die eingesetzten Medien in ihrer chemischen Zusammensetzung und osmotischen Konzentration denen der Körperflüssigkeit. Die Temperatur der Zellen sollte den physiologischen Bedingungen in vivo angepasst werden.

Die Zellen werden in Zellkulturflaschen mit speziell behandelter Oberfläche kultiviert. Dazu werden die Zellen zunächst einige Male im sterilen Puffer (PBS) gewaschen und schließlich in dieser Lösung für 90 Minuten bei 37° C in den Brutschrank gestellt. Die gelösten Knochenstücke werden in 25 cm² großen Gewebekulturflaschen mit 5 bis 10 ml Medium platziert und darin kultiviert. Die Flaschen werden bei 37° C mit 5 % Kohlendioxid (CO₂) in den Brutschrank gestellt. Während der ersten Woche werden die Zellen lediglich durch das Ersetzen des alten Wachstumsmediums mit Frischmedium gefüttert. Anschließend wird das Medium drei Mal wöchentlich gewechselt [149].

Nach etwa zwei Wochen bildet sich eine Monolayer-Zellschicht auf dem Flaschenboden. Die Zellen erreichen damit eine so hohe Konfluenz und damit bereits Wachstumshemmung, dass sie passagiert werden müssen. Adhärenz Zellen wachsen als zusammenhängende einschichtige Zelllage unter Anheftung an eine inerte Oberfläche. Sie zeigen dichteabhängige Proliferationshemmung bzw. Kontaktinhibition. Eine weitere Zellvermehrung ist nur dann möglich, wenn passagiert wird.

Passagieren ist in regelmäßigen Abständen notwendig, damit die Zellen in einem teilungsfähigen Zustand bleiben und nicht durch die ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte sowie durch Mangel an Nährstoffen sterben.

Eine Passage wird durch die Methode der Trypsinisierung durchgeführt. Bei der Trypsinisierung werden die Zellen von der Unterlage mit Hilfe von Trypsin in Verbindung mit EDTA gelöst. Trypsin spaltet Proteine an den Stellen der Aminosäuren Arginin und Lysin. EDTA bindet die zweiwertigen Kationen wie

Ca^{2+} und Mg^{2+} , diese stabilisieren die zellbindenden Membranproteine. Zum Aussäen der humanen Osteoblasten werden Zellen der 1. bis zur 7. Passage verwendet.

Zur Trypsinisierung gibt man 2 ml Trypsinlösung pro 25 cm² Flasche, 5 ml pro 80 cm² Flasche und 10 ml pro 175 cm² Flasche auf die in PBS gewaschenen Zellen hinzu. Anschließend werden die Gewebekulturflaschen mit Zellen und Trypsin/EDTA in den Brutschrank bei 37° C für 5 Minuten inkubiert. Ein längeres Einwirken von Trypsin führt zur Zellschädigung.

Unter einem Umkehrmikroskop wird das Ablösen der Zellen kontrolliert. Nach Zugabe des Mediums in die Flasche werden die Zellen in Zentrifugenröhrchen bei 3000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Dabei wird die Trypsinwirkung auf die Zellen durch Serumumsatz des Mediums gestoppt und das cytotoxische EDTA gebunden. Nach der Zentrifugierung trennt sich das Zellpellet von der Mediumtrypsinschicht. Das gewonnene Zellpellet wird in Frischmedium gelöst und im Verhältnis 1:3 in neue Zellkulturflaschen verteilt: 25 cm² große Flasche wird in eine 80 cm² große Flasche (10 bis 11 ml Medium), eine 80 cm² große Flasche in eine 175 cm² große Flasche (23 ml Medium) und eine 175 cm² große Flasche in drei 175 cm² große Flaschen verteilt.

2.2.2 Kultivierungstechnik der Rattenosteoblasten

Zu 100 ml Medium werden 0,1 g Penicillin G, 0,3 ml Amphotericin B und 1 ml Gentamycin hinzugefügt. Es wird 1 ml der 10⁻⁴ M Dexamethason-Lösung zu 99 ml Medium, inkl. 15 % fetalem Kälberserum und Antibiotika, hinzugefügt. Weiterhin werden 21,6 g Natrium-β-Glycerolphosphat im destillierten Wasser aufgelöst und bis 100 ml aufgefüllt und 5 mg Ascorbinsäure pro ml Stammlösung hinzugegeben.

Zur Kultivierung der Rattenosteoblasten werden folgende Lösungen vorbereitet:

- 3 Ampullen mit je 5 ml Medium und 10facher Antibiotikakonzentration
- 1 Ampulle mit 5 ml Medium und normaler Antibiotikakonzentration
- 1 Zentrifugenröhrchen mit 30 ml Medium und normaler Antibiotikakonzentration
- 3 Behälter mit Dexamethason, β-Glycerophosphat und Ascorbinsäure

Der gewonnene Knochen aus Rattenfemur, -tibia und -humerus wird dreimal im Medium mit 10facher Antibiotikakonzentration für jeweils 10 Minuten und nach einer Reinigung einmal in einfacher Antibiotikakonzentration für 10 Minuten gewaschen. Anschließend werden Dexamethason, β -Glycerophosphat und Ascorbinsäure hinzugegeben. Die Lösung wird auf zwei verschiedene 15 ml fassende Kulturflaschen verteilt. Die Kulturflaschen werden bei 37° C und einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 95 % Luft und 100 % Luftfeuchtigkeit in den Brutschrank gestellt. Anschließend wird nach 24 Stunden und dann alle zwei Tage das Medium gewechselt.

Nach fünf Tagen wird mit Passagieren und Aussäen begonnen. Zum Aussäen der Rattenosteoblasten werden die Zellen der ersten Passage verwendet. Hierfür wird zunächst das Medium abgesaugt. Die Osteoblasten werden mit Citrat-Kochsalzlösung gespült, um die proteolytische Einwirkung des Trypsins zu erleichtern. Jede Flasche wird mit 5 ml Trypsin-Citrat-Kochsalzlösung gefüllt und für 35 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit werden die Zellen herauspipettiert, um von einander gelöst zu werden. 5 ml Medium wird hinzugefügt und die Lösung durch einen Zellfilter in die Zentrifugengläser hineingegeben. Vier Minuten wird bei 400 UpM zentrifugiert. Das Medium wird danach abgesaugt. Die Zellen werden mit frischem Medium verdünnt, für 24 Stunden in 0,5 ml Medium inkubiert und in 24-Wellplatten platziert. Anschließend werden sie in einer Dichte von 3×10^4 Zellen/cm² auf die Proben ausgesät. Die Proben werden für 14 Tage in den Inkubator gestellt. Während dieser Zeit wird das Medium täglich gewechselt.

Die Calciumausgangskonzentration des Kontrollmediums beträgt 1,8 mmol/l, wobei die Phosphatausgangskonzentration 4 mmol/l ist.

2.2.3 Vorbereitung von Rasterelektronenmikroskop (REM) -präparaten und EDX-Präparaten

Das Medium wird abgesaugt und dreimal in 0,1 M Cacodylatpuffer gespült. Cacodylatpuffer wird nach folgendem Mischverhältnis zu 0,1 M Lösung:

10 ml 0,2 M Cacodylatpuffer.

Anschließend wird das Präparat für 20 Minuten bei 4° C in 4 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer mit pH 7,2 fixiert.

Anschließend werden die Präparatoberflächen in einem Rasterelektronenmikroskop dargestellt. Für diese Untersuchung wird die Probenoberfläche durch Aufdampfen einer dünnen Silberschicht elektrisch leitend gemacht. Diese Schicht vermeidet die bildstörende elektrische Aufladung an der Oberfläche und erzielt die für die Bilderzeugung notwendige Sekundärelektronenemission. Frühestens nach 24 Stunden werden die Proben am Sputter-Gerät durch die Hochvakuumaufdampftechnik weiterverarbeitet.

2.2.4 Energie-Dispersive Röntgenspektrometrie (EDX)

Das Rasterelektronenmikroskop kann in Kombination mit dem EDX-Detektor nicht nur Bilder für die optische Untersuchung liefern, sondern auch Informationen über die elementare chemische Zusammensetzung einer Probe. Die dabei angewandte Methode ist die Röntgen-Mikroanalyse. Im REM wird die Probe mit Elektronen beschossen. Dabei entstehen nicht nur Sekundär- oder rückgestreute Elektronen, die zur Erstellung von Rasterbildern benutzt werden. Sozusagen als Schmutzeffekt entstehen auch Röntgenstrahlen. Diese Röntgenstrahlen sind charakteristisch für die in der Probe vorhandenen Elemente. Gelingt es, die in den Röntgenstrahlen enthaltenen Informationen zu verarbeiten, so können gleichzeitig am REM ein Bild und eine Analyse gemacht werden. Es ist bekannt, dass sich die Elektronen auf Schalen bzw. auf festen Energieniveaus um den Kern herumbewegen. Wird durch den auftreffenden Elektronenstrahl ein Elektron aus dem Verband herausgeschossen, so wird diese Lücke sofort durch ein Elektron mit höherer Energie wieder aufgefüllt. Dabei wird Energie in Form von Röntgenstrahlen frei. Diese Strahlung, die je nach Übergang im Schalensystem als K-, L- oder M-Strahlung bezeichnet wird, muss zur Weiterverarbeitung mit einem Detektor aufgenommen werden. Die Strahlen können energie- oder wellenlängendispersiv weiterverarbeitet werden.

Zur Analyse der Biogläser, Aluminiumoxid, Ceravital und Polystyrol als Kontrolle wurde eine Energie-Dispersive Spektrometrie betrieben. Bei dem sogenannten EDX-Verfahren wurden die von den Proben erzeugten Röntgenstrahlen spektral zerlegt und analytisch ausgewertet. Durch die EDX-Analyse lässt sich die chemische

Zusammensetzung der Proben weitgehend bestimmen. Da sämtliche Röntgenlinien von allen chemischen Elementen genau bekannt sind, zeigt ein Peak in einem Spektrum das Vorhandensein eines entsprechenden Elements an. Demnach ist dies eine qualitative Analyse.

2.2.5 Flammenspektroskopie

Für die Identifizierung der Einzelbestandteile wie Calcium und Phosphat im Kulturmedium der Biogläser, Aluminiumoxid, Ceravital und Polystyrol als Kontrolle wurden diese nach einer 24-stündigen Präinkubation und tägliche Inkubation in eine reaktive Form überführt und durch die Flammenspektroskopie bzw. Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) analysiert. Hierfür wurden die Calcium- und Phosphatkonzentration des Kulturmediums verschiedener Substrate bestimmt.

Viele Kationen bewirken, wenn sie in eine möglichst farblose Gasflamme eingebracht werden, eine intensive und charakteristische Flammenfärbung. Bringt man gelöste Verbindungen als Tröpfchen in eine Gasflamme ein, so wird die Flüssigkeit verdampft und der gelöste Stoff wird als Feststoff ausgeschieden. Handelt es sich um bei hohen Temperaturen verdampfbare Verbindungen, wie z.B. Elementnatrium, so wird der Feststoff zumindest teilweise in die Gasphase überführt. Durch die hohe Temperatur der Gas/Luft-Flamme (1600 bis 1700° C) steht genügend Energie für die Dissoziation der gasförmigen Verbindung zur Verfügung. Ein Teil der durch die Dissoziation gebildeten Ionen kann der Flamme Elektronen entziehen und Atome zurückbilden. Elemente mit geringer Ionisierungsenergie und geringem energetischen Abstand des äußeren Energieniveaus, beispielsweise die Alkali- und Erdalkalitionen, können bereits durch die thermische Energie der Flamme angeregt werden. Beim Anregungsvorgang geht das Elementatom wie Natrium aus seinem energetischen Grundzustand unter Energieaufnahme in den sog. „angeregten Zustand“ über, d.h., ein Außenelektron wird auf ein höheres Energieniveau gehoben. Solche angeregten Zustände sind immer instabil, die Alkali- und Erdalkaliatome fallen sehr schnell in den Grundzustand zurück. Die Energie des Elektrons wird beim Übergang auf das niedrigere Energieniveau (Grundzustand) abgegeben, und zwar als Lichtquant definierter Energie.

Da die Energie des Lichts mit seiner Wellenlänge verknüpft ist, emittieren Atome beim Übergang aus dem angeregten in den Grundzustand streng monochromatisches Licht, dessen Wellenlänge aufgrund der atomaren Aufbauprinzipien der Elektronenhülle (energetischer Abstand des Energieniveaus) elementspezifisch ist. Die Lichtquanten bewirken beispielsweise beim Natrium eine typisch gelbe Färbung der Flamme. Mit Hilfe eines Spektroskops lässt sich die Wellenlänge der Lichtquanten genau messen. Bei der Analyse des Mediums der Biogläser, Ceravital, Aluminiumoxid und Polystyrol als Kontrolle werden zahlreiche Elemente spektroskopisch identifiziert und quantitativ bestimmt. Die relativen Lagen der wichtigsten Spektrallinien sind:

Na 589,3 nm gelb

Ca 622,0 nm ziegelrot

2.3 Geräte

Sputtern

Die Proben erhalten durch Sputtern elektrische Leitfähigkeit, die für den Einsatz des Rasterelektronenmikroskops notwendig ist.

Es kommt ein Sputtergerät SCD 040 der Firma Balzers Union zum Einsatz. Es besteht aus Glaszylinder, Kathode (Goldtarget), Anode (Probentisch), Magnetsystem, Vakuumpumpe, Vakuumschalter, Endschalter und Polung für Sputterbetrieb. In einer evakuierten Probenkammer wird ein Druck von 0,05 mbar durch Einlass des Argons eingestellt. Anschließend wird eine Hochspannung zwischen Anode und Kathode erzeugt. Die dabei zur Kathode hin beschleunigten, positiv geladenen Argongasionen schlagen bei ihrem Aufprall auf das Sputter-Target aus diesem Metallatom heraus. Zwischen den freigewordenen Metallatomen und den in der Probenkammer zahlreich vorhandenen Gasmolekülen kommt es zu wiederholten Zusammenstößen und in der Folge zu einer starken Streuung der freien Metallatome. Dadurch entsteht eine Metallatomwolke, die sich auf allen Flächen der Umgebung wie auch dem Probekörper anlagert. Die angelagerte dünne und homogene Metallschicht bietet dem Präparat im Rasterelektronenmikroskop die ausreichende elektrische Leitfähigkeit. Diese ist vom Targetmaterial und Arbeitsabstand, dem Gasdruck, dem Glimmstrom und der Prozessdauer abhängig.

Energiedispersives Röntgenspektrometer

Das Energiedispersive Röntgenspektrometer ist am Rasterelektronenmikroskop angeschlossen und dient im Rahmen der EDX-Analyse zum Nachweis der Elemente. Das Röntgenspektrometer stammt von der Firma Röntec in Adlershof.

Beim energiedispersiven Verfahren wird das gesamte Spektrum von einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Si-(Li)-Halbleiter-Detektor aufgenommen. Entsprechend der Energie des eingefallenen Photons wird an die nachgeschaltete Elektronik ein Impuls weitergegeben. Ein Vielkanalanalysator sammelt und sortiert

diese Impulse in einzelne Kanäle und baut daraus ein Spektrum zusammen. Das gesammelte Spektrum wird auf einem Monitor wiedergegeben.

Atomabsorptionsspektroskop

Das verwendete Atomabsorptionsspektroskop (AAS) ist im vorliegenden Fall BM/Hitachi 704. Ein AAS-Photometer besteht aus einer monochromatischen Lichtquelle (meist Hohlkathodenlampen, bei denen eine zusätzliche Entladungsstrecke die Lichtemission erhöht), einem Brenner mit Zerstäuber, einem Monochromator

(Prisma oder Filter), einem Licht-Detektor und einer Anzeigevorrichtung. Als Kalibratoren bedient man sich erhältlicher Metallsalze von Carbonsäuren, die in Öl gelöst vorliegen oder anorganische Metallsalze in Wasser.

Die Materie liegt als Plasmen vor. Dies ist ein Zustand, in dem Verbindungen nicht in definierter molekularer Form vorliegen, sondern als Gemische von Molekülen, Ionen und Radikalen. Dies ist nur bei stark erhöhten Temperaturen möglich. Die Temperaturen von Plasmen liegen zwischen 1000 und 4000 K. Die meisten Metallatome liegen bei dieser Temperatur allerdings noch überwiegend im Grundzustand vor. Das bedeutet, dass die Wahrscheinlichkeit für die Absorption von Strahlung viel größer ist als für die Emission. Damit ist die AAS nachweisstärker. Außerdem ist der Absorptionsprozess Temperatur unabhängig.

Die AAS verwendet vorwiegend Hohlkathodenlampen als Lichtquellen. Nur sie gewährleisten die erforderliche Linienschärfe, denn kontinuierliche Lichtquellen könnten spektral nicht so eng auf eine Atomabsorptionslinie eingestellt werden, wie dies erforderlich ist, um eine messbare Absorption zu erzielen. Hohlkathodenlampen liefern Linien mit einer Bandbreite von nur +/- 0,001 nm. Eine Hohlkathodenlampe besteht aus einer Wolfram-Anode und einem Zylinder aus einem Material, dessen Linie erzeugt werden soll. Die Lampe ist mit Edelgas von geringem Druck gefüllt. Legt man an die Elektroden eine Spannung von 300 V an, tritt ein Ionisationsstrom auf. Wenn die Edelgas-Kationen dann auf die Kathode aufschlagen, schlagen sie Metaldampf heraus. Dieser sendet die für ein Metall typische Linie aus, wenn er in den Grundzustand zurückfällt.

Fast alle Metalle der 1. und 2. Hauptgruppe (Alkali- und Erdalkalimetalle) lassen sich mit Hilfe der Flammenspektroskopie identifizieren.