

**Zahnhartgewebe im Fokus:**  
*In vitro*-Untersuchungen zur  
**Biokompatibilität**  
**von fluorierten und nichtfluorierten**  
**Hydroxylapatit-Modelloberflächen**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät II  
- Physik und Mechatronik -  
der Universität des Saarlandes

von

Christian Zeitz

Saarbrücken

2013

Tag des Kolloquiums: 11. November 2013

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Christian Wagner

Mitglieder des Prüfungsausschusses:

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Dr. Karsten Kruse

Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karin Jacobs  
Univ.-Prof. Dr. Albrecht Ott

Akademischer Mitarbeiter: Dr. Jean-Baptiste Fleury

## Kurzzusammenfassung

Wechselwirkungen an Hartgewebeoberflächen spielen eine wichtige Rolle im medizinisch-biologischen Zusammenhängen. Trotz der großen Bedeutung, die sie besitzen, sind die Vorgänge an Hartgewebeoberflächen nur unzureichend verstanden und beschrieben. Ursache dafür ist zum einen die komplexe Struktur der Gewebe, ein Kompositmaterial aus Hydroxylapatit (HAP) und Proteinen. Zum anderen variiert die chemische Zusammensetzung, da diese durch äußere Einflüsse leicht beeinflusst werden kann. Zur Bewältigung der Komplexität wurden in dieser Arbeit Proben aus synthetischem HAP entwickelt und mit Hilfe physikalischer Messmethoden (XPS, XRD, REM, AFM, EBSD) charakterisiert. Diese Proben werden durch ein klassisches und ein *Spark Plasma*-Sinterverfahren erzeugt und bestehen nur aus der mineralischen Gewebephase ohne Protein. Die Proben zeichnen sich durch hohe Dichte und eine vereinfachte Struktur gegenüber natürlichem Hartgewebe aus. Mit Hilfe dieser Proben wurde das pH-abhängige Eindringverhalten von Fluorid in HAP untersucht: Bei neutralem pH dringt das Fluorid lediglich einige zehn Nanometer ein, während bei pH-Werten unter vier Eindringtiefen von einigen hundert Nanometern ermittelt wurden. Dann kommt es auch zu Änderungen der Oberflächenstruktur. Darüber hinaus wurde mit kraftspektroskopischen Messungen gezeigt, dass sich erhöhte Fluoridkonzentrationen in HAP vermindern auf die Adhäsionskräfte zwischen Bakterien und HAP-Modelloberflächen auswirkt.





## Abstract

Interactions at hard tissue surfaces play an important role in bio-medical contexts. Despite their large importance, the processes on hard tissue surfaces are only poorly understood and described. The reason lies in the complex tissue structure built like a natural composite material made from the mineral hydroxyapatite (HAP) and proteins. Additionally, there is only a poor control over the chemical composition, which can easily be influenced by the environment. To overcome the material challenges, synthetic HAP samples were fabricated that are then characterized by physical methods (XPS, XRD, REM, AFM, EBSD). For the fabrication of these samples, a classical and a spark plasma sintering technique were applied. The samples hence consist only of the mineral tissue phase without any protein and feature a high density and a simplified structure compared to the original hard tissues. With the aid of these samples, the pH dependent penetration depth of fluoride into HAP has been investigated: At neutral pH, fluoride penetrates only some tens of nanometers into the HAP, yet, at acidic pH below 4, penetration depths increase up to some hundreds of nanometers. In the latter case, superficial changes in structure arise. Furthermore, it was shown by AFM force spectroscopy that an increased fluoride concentration in HAP leads to a reduced adhesion force between bacteria and the HAP model samples.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>13</b>
2.1	Wechselwirkungen auf molekularer Skala . . . . .	13
2.2	DLVO-Theorie . . . . .	22
2.3	Proteine . . . . .	24
2.4	Hydroxylapatit und Hartgewebe . . . . .	28
2.5	Protein- und Biofilmbildung . . . . .	33
2.6	Wechselwirkung von Zahnoberflächen mit Proteinen und Bakterien . . . . .	39
<b>3</b>	<b>Allgemeines zu den angewendeten Messmethoden</b>	<b>43</b>
3.1	Photoelektronenspektroskopie – XPS . . . . .	43
3.2	Röntgenbeugung - XRD . . . . .	51
3.3	Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie . . . . .	53
3.4	Elektronenmikroskopie und elektronenspektroskopische Methoden . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Sintervorgänge</b>	<b>63</b>
<b>5</b>	<b>HAP-Pellets durch uniaxiales Vorverdichten und Sintern</b>	<b>67</b>
5.1	Charakterisierung des Ausgangsmaterials . . . . .	67
5.2	Pelletherstellung . . . . .	69
5.3	Charakterisierung der Proben und ihrer Oberfläche . . . . .	70
5.4	Messung der Fluoridverteilung . . . . .	74
5.5	Morphologische Änderungen durch Fluorierung . . . . .	87
5.6	Zusammenfassung . . . . .	96
<b>6</b>	<b>Präparation der HAP-Pelletproben mit FAST</b>	<b>97</b>
6.1	Eigenschaften und Vorbereitung des Ausgangsmaterials . . . . .	97
6.2	Probenverdichtung und -präparation . . . . .	104
6.3	Eigenschaften der HAP3-Pellets . . . . .	106
6.4	Diskussion . . . . .	111
<b>7</b>	<b>Messung fluoridgehaltabhängiger Adhäsionskräfte von Bakterien auf HAP-Oberflächen</b>	<b>119</b>
7.1	Präparation der AFM-Spitzen und der Oberflächen . . . . .	119
7.2	Messaufbau und Durchführung . . . . .	122
7.3	Ergebnisse . . . . .	126
7.4	Diskussion . . . . .	131
7.5	Ausblick . . . . .	132

<b>8 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>135</b>
<b>A Anatomie der Zähne und Entstehung der Zahnhartsubstanzen</b>	<b>137</b>
<b>B XRD-Messungen an gesinterten HAP2-Proben</b>	<b>143</b>
<b>Publikationen und Konferenzbeiträge</b>	<b>147</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>149</b>

# 1 Einleitung

Das Wechselspiel zwischen Physik, Chemie und den Lebenswissenschaften (Biologie, Medizin) wurde im Laufe der vergangenen Jahrzehnte von einer großen Dynamik ergriffen: Wissenschaftliche Erkenntnisse auf einem Gebiet haben zwar immer schon auch solche auf dem anderen Gebiet stimuliert, aber zunehmend stehen naturwissenschaftliche Methoden zur Untersuchung lebenswissenschaftlicher Phänomene zur Verfügung. Umgekehrt stellen die sich daraus ergebenden Erkenntnisse wichtiges Grundlagenwissen für Medizin oder Biologie zur Verfügung. Stand beispielsweise bis Mitte der achtziger Jahre für die Beobachtung biologischer, lebender Proben lediglich die Lichtmikroskopie zur Verfügung, so sind heute z.B. Rasterkraftmikroskope im Einsatz, die eine Abbildung von Zellen und Gewebe auf der Nanometerskala erlauben, ohne dass die Probe unter dem Einfluss eines für Elektronenmikroskopie notwendigen Vakuums während der Untersuchung irreversibel verändert wird. Fortgeschrittene Methoden wie *Environmental SEM* erlauben zwischenzeitlich ebenfalls die Untersuchung biologischer Proben im Elektronenmikroskop. Durch Fortschritte im Gebiet der genetischen Manipulation können heute innerhalb von Zellen Fluoreszenzfarbstoffe physiologische Vorgänge sichtbar machen. Mit STED-Mikroskopen<sup>1</sup> können Vorgänge auch unterhalb des Beugungslimits betrachtet werden.

Biologische Proben sind seit jeher im physikalischen Sinne „unkontrolliert“, denn durch die biologisch bedingte, individuelle Variation der Materialien treten z.B. strukturelle oder chemische Unterschiede auf. Gerade diese Variation, die ein Grundprinzip in der Biologie ausmacht, unterscheidet daher biologische von nicht-biologischen Proben, die keine individuellen, durch Genetik, Wachstum oder Umwelteinflüsse bedingte Merkmale tragen. Entsprechend schwieriger gestaltet sich folglich die Untersuchung biologischen Materials mit physikalischen Methoden.

Ein interessantes biologisches Material, auf das die obige Beschreibung ebenfalls zutrifft, ist Zahnschmelz. Er bedeckt die im Mund sichtbaren Oberflächen der Zähne und steht daher in direktem Kontakt mit Speichel, Nahrung und Bakterien, die sich in der Mundhöhle befinden. Dabei kommt es an der Oberfläche zur Bildung eines Biofilms, einer aus Proteinen und Bakterien bestehenden Schicht, die am Zahnschmelz anhaftet. Dieser Film gilt als eine Ursache der Zahnkaries, bei der durch den Stoffwechsel der in dem Film enthaltenen Bakterien eine Schädigung des Zahnschmelzes ausgelöst wird [1].

Die Struktur des Zahngewebes, aber auch die komplexen und von vielen äußeren Parametern abhängenden Eigenschaften der Proteine führen zu einem unübersichtlichen Gemenge von Wechselwirkungen, die an der Entstehung des oralen Biofilms beteiligt sind. Einzelne elementare Prozesse dabei zu erkennen oder gar zu quantifizieren, ist praktisch unmöglich, denn zu dicht nebeneinander und zu verwoben miteinander finden diese Prozesse statt. Beispielsweise ist bekannt, dass der Reifung des Biofilms die Adsorption eines Proteinfilms vorausgeht [2].

---

<sup>1</sup>STED: *Stimulated Emission Depletion*

Wie dessen Eigenschaften vom Gewebe abhängen, ist grob vorhersagbar. Wie diese Eigenschaften aber aus den lokal wirksamen Kräften und anderen Einflüssen auf das System tatsächlich entstehen, ist nicht beschreibbar. Dazu fehlt schlicht der Einblick in die elementaren Prozesse zwischen einzelnen beteiligten Systemen.

Genau in solchen Zusammenhängen bietet sich die Möglichkeit, mit Hilfe von vereinfachten Modellsystemen einem grundlegenden Verständnis der Vorgänge an der Gewebeoberfläche näher zu kommen. Im Falle der Proteinfilm wurde die Adsorption der Moleküle auf einfachen Modellsystemen wie Si-Wafern und Glimmer untersucht. Durch Variation der äußeren Parameter und der verwendeten Proteine können Eigenschaften der Oberflächen für bestimmte Verhaltensweisen der Proteine verantwortlich gemacht werden. Auf hydrophilen Oberflächen adsorbieren Proteine beispielsweise anders als auf hydrophoben [3].

Etwas komplexer ist ein System, das aus einem gewebeähnlichen Material aufgebaut ist. Solche Proben müssten dazu aus demselben Material wie das Gewebe bestehen, es sollte aber möglichst unstrukturiert sein, um dadurch bedingte Einflüsse zu minimieren. Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit bestand genau in der Erzeugung solcher, aus Hydroxylapatit<sup>2</sup> (HAP) bestehender Proben, mit denen sich elementare Vorgänge an deren Oberfläche unabhängig von Einflüssen durch chemische Verunreinigungen oder strukturelle Variation untersuchen lassen. Diese Anforderung bedingt zwangsläufig einen entsprechend einfachen und kontrollierbaren Aufbau der Proben sowie eine hinreichend genaue Charakterisierung, um Erklärungen für das Zustandekommen der an der Oberfläche ablaufenden Vorgänge liefern zu können.

Die Anwendbarkeit solcher Modellproben wird an Beispielen demonstriert werden. Die dafür betrachteten Systeme (Eindringtiefe von Fluorid in HAP, bakterielle Adhäsionsmessungen auf HAP) besitzen hohe Relevanz im biomedizinischen Umfeld, denn sie zeigen genau die oben beschriebene Problematik eines aus vielen Einzeleinflüssen bestehenden Zusammenwirkens unterschiedlicher äußerer und innerer Parameter.

Um einen Überblick zu ermöglichen, stellt **Kapitel 2** die grundlegenden, auch für Zahn- und Gewebeoberflächen bestimmenden Wechselwirkungen und ihre Eigenschaften dar. Es wird aufgezeigt, wie sich die an der Oberfläche wirksamen Kräfte aus allen beteiligten Phänomenen ergeben und sich beschreiben lassen. Die in einem Grenzflächensystem diesen oberflächlichen Wechselwirkungen unterworfenen Proteinmoleküle und Kolloide werden ebenfalls kurz dargestellt. Schließlich wird die Bildung eines Biofilms als Resultat der Wechselwirkungen zwischen Oberfläche, Proteinen und Bakterien allgemein und bezogen auf den oralen Film nach heutigem Verständnis dargestellt, bevor am Ende des Kapitels aus der sich ergebenden Komplexität die Notwendigkeit vereinfachender Proben motiviert wird.

**Kapitel 3** erläutert kurz die Prinzipien, nach denen die angewendeten Messmethoden funktionieren. Etwas ausführlicher sind dabei die bei der Photoelektronenspektroskopie benutzten Vorgehensweisen geschildert worden, um die häufig aus vielen Einzelschritten bestehenden Abläufe zusammenhängend darzustellen. **Kapitel 4** beschäftigt sich einzig mit einer kurzen Prinzipskizze des Sinterns, das als wichtigstes Präparationsverfahren eingesetzt wurde.

In **Kapitel 5** wird die Erzeugung von HAP-Modellproben nach einem zweistufigen Verfahren aus uniaxialen Verpressen und anschließendem drucklosen atmosphärischen Sintern vorgestellt.

---

<sup>2</sup>Hydroxylapatit ist der mineralische Hauptbestandteil von Säugetier-Hartgeweben.

---

Die Probeneigenschaften wurden mit unterschiedlichen Messverfahren ermittelt, so dass ein umfassendes Bild der Proben entsteht. In einem zweiten Teil werden die so hergestellten Pellets zur Bestimmung der Eindringtiefe von Fluor in eine HAP-Oberfläche benutzt. Dabei werden unterschiedliche Parameter während der Fluorierung verwendet. Außerdem werden strukturelle Auswirkungen der Fluoridbehandlung aufgezeigt.

Die mit Hilfe des Uniaxialverpressens gewonnen Proben weisen trotz ihrer im Vergleich zu Zahngewebe größeren Dichte eine starke Variation von Oberflächeneigenschaften auf. Eine veränderte Präparationstechnik mit Anwendung eines sog. SPS-Verfahrens<sup>3</sup> wird in **Kapitel 6** vorgestellt. Die insbesondere in Hinblick auf die Oberflächeneigenschaften verbesserten Proben und eine eingehende Charakterisierung werden danach vorgestellt. Sie werden in **Kapitel 7** für die Bestimmung von Adhäsionskräften zwischen HAP und bakterienfunktionalisierten Kraftmikroskopspitzen eingesetzt. Die Anbindung der Bakterien, der Ablauf der Messungen und die Messergebnisse werden dargestellt und diskutiert.

Schließlich liefert **Kapitel 8** eine abschließende Zusammenstellung der Ergebnisse und einen Ausblick über die weitere Verwertbarkeit und die Möglichkeiten einer Fortentwicklung der HAP-Modellproben.

---

<sup>3</sup>*spark plasma sintering*





## 2 Grundlagen

### 2.1 Wechselwirkungen auf molekularer Skala

Intermolekulare bzw. interatomare Kräfte bilden die Grundlage vieler Eigenschaften kondensierter Materie. Ohne anziehende Kräfte zwischen Atomen und Molekülen wären feste und flüssige Aggregatzustände nicht denkbar. Die unterschiedlichen Kristallgitter, Härte, Viskosität oder Selbstorganisationsprozesse werden bestimmt durch ein individuell vorliegendes Kräftegleichgewicht auf molekularer bzw. atomarer Skala. Zu diesem Gleichgewicht tragen in erster Linie elektrische Wechselwirkungen bei, deren unterschiedliche Ausprägungen unterschiedliche Reichweiten und Beträge der wirkenden Kräfte bedingen.

Grenzflächen haben in diesem Zusammenhang eine besondere Stellung, denn an ihnen ändert sich abrupt der Aufbau der Materie. Trotzdem sind die Wechselwirkungen zwischen benachbarten Phasen derselben Natur wie die Kräfte innerhalb einer einzelnen Phase. Aufgrund der Reichweite vieler Wechselwirkungen sind die internen Kräfte allerdings auch jenseits scharfer Phasengrenzen wirksam.

Die wichtigsten Kräfte zwischen Atomen und Molekülen werden nachfolgend kurz vorgestellt. Die unterschiedlichen Ausprägungen in molekularen und kolloidalen Systemen werden ebenso dargestellt wie diejenigen im Falle makroskopisch ausgedehnten Oberflächensysteme. Am Ende des Abschnitts wird der Zusammenhang zu Adhäsionsphänomenen hergestellt, wie sie auf makroskopischer Skala auftreten.

#### Coulombkraft

Die **elektrostatische** oder **Coulomb-Wechselwirkung** tritt zwischen elektrisch geladenen Objekten auf. Für die auftretende Kraft  $\vec{F}_C$  gilt das Coulomb-Gesetz:

$$\vec{F}_C = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \frac{q_1q_2}{r^2} \vec{e}_r \quad (2.1)$$

$q_1$  und  $q_2$  sind dabei die wechselwirkenden elektrischen Ladungen, die einen Abstand  $r$  voneinander besitzen. Gleichnamige Ladungen haben eine abstoßende, ungleichnamige eine anziehende Kraft zur Folge.  $\vec{e}_r$  ist ein Einheitsvektor entlang der Verbindungslinie zweier Ladungen bzw. Ladungsschwerpunkte.  $\epsilon_0$  ist die elektrische Feldkonstante,  $\epsilon_r$  die im Falle statischer Felder konstante Dielektrizitätszahl des Mediums, in dem sich die beiden Ladungen befinden und durch welches hindurch die Wechselwirkung stattfindet. Neben der Abstandsabhängigkeit  $\propto \frac{1}{r^2}$  lässt sich anhand der Beziehung leicht sehen, dass sich Medien mit mit großem  $\epsilon_r$  und damit großer Polarisierbarkeit dämpfend auf elektrostatische Wechselwirkungen auswirken.

Bei der Coulomb-Kraft handelt es sich um eine der vier Fundamentalwechselwirkungen: Ihr Wirken lässt sich nicht aus anderen Prinzipien herleiten. Die nachfolgend aufgeführten Ausprägungen elektrischer Wechselwirkungen lassen sich allerdings auf die Coulomb-Wechselwirkung oder das Verhalten elektrischer Ladungen zurückführen.

### Bindungskräfte zwischen Atomen

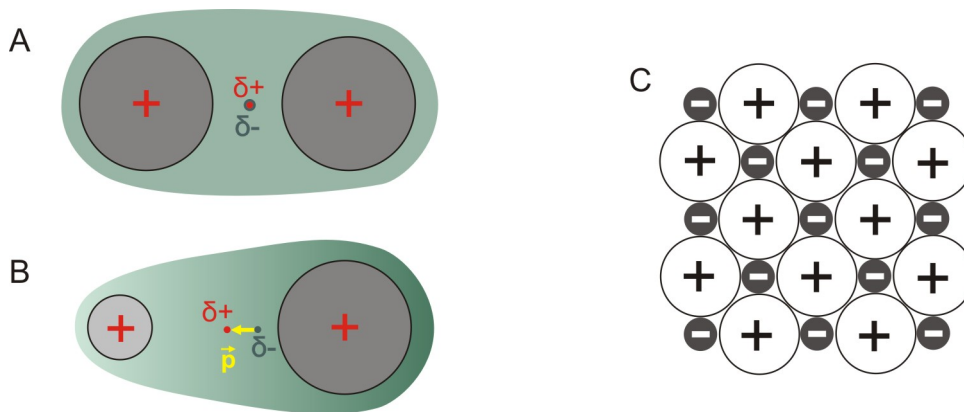


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung unterschiedlicher Typen von Bindungen zwischen Atomen. Bei der kovalenten Bindung (A und B) teilen sich zwei Atomrümpfe ein gemeinsames Elektronenpaar, wobei in der Abbildung die Farbintensität der gezeichneten Ladungswolke die Größe der elektronischen Aufenthaltswahrscheinlichkeit wiedergibt. Im Falle einer symmetrischen Bindung (Abb. A, z.B. zwischen zwei Kohlenstoffatomen) fallen zeitgemittelter Ladungsschwerpunkt der positiven und der negativen Ladungen ( $\delta+$ ,  $\delta-$ ) aufeinander. Daher besitzt diese Bindung keine Polarität. Besitzen aber, wie in Abbildung B dargestellt, die Bindungspartner unterschiedliche Elektronegativitäten, so wird das gemeinsame Elektronenpaar entsprechend auf die Seite des elektronegativeren Atoms herübergezogen. Hierdurch kommt es zu einer Trennung der zeitgemittelten Ladungsschwerpunkte positiver und negativer Ladung und damit zur Bildung eines Dipols. In Abbildung C sind anhand des einfachen Beispiels einer zweidimensionalen Darstellung eines kubisch-flächenzentrierten Gitters die Bindungsverhältnisse in Ionenkristallen wiedergegeben.

Die Bindungskräfte, die Atome in Molekülen zusammenhalten, werden durch **kovalente** oder **Elektronenpaarbindungen** verursacht. Sie entstehen durch die anziehende Wirkung der gegensätzlichen elektrischen Ladung positiv geladener Atomrümpfe und negativ geladene Valenzelektronen der an einer Bindung beteiligten Atome (vgl. Abbildung 2.1). Aufgrund der energetischen Verhältnisse der Orbitale kommt es für einzelne Atome bzw. den energetischen Zustand der Valenzelektronen zu einer Energieminimierung, wenn sie zusammen mit weiteren Atomen kovalente Bindungen eingehen und dadurch Valenzelektronen gemeinsam genutzt werden. Die kovalente Bindung wirkt sehr gerichtet nur über kurze Distanz, und sie führt daher

nur zu Kräften innerhalb eines Moleküls<sup>1</sup>. Sie besitzt daher nur untergeordnete Bedeutung für Kräfte zwischen Molekülen, eine überragende Rolle nimmt diese Bindungsart allerdings - naturgemäß - beim Bau von Molekülen ein.

Die gegensätzliche elektrische Ladung von Ionen führt zur **Ionenbindung** und einer dadurch bedingten regelmäßigen Anordnung der Ionen auf kleinstmöglichem Raum im sog. **Ionengitter**. Die strukturell unterschiedlichen Ionengitter einfacher ionischer Verbindungen entstehen durch die individuellen Radien der am Aufbau beteiligten Ionen, was ebenso individuelle Packungsdichten der Materialien bedingt. Die Bindungsenergie lässt sich direkt auf die gegenseitige Anziehung positiv oder negativ geladener Ionen zurückführen (vgl. Abb. 2.1 C).

Die Bindungsenergien sind dabei größer als bei molekularen Verbindungen<sup>2</sup>. Eigenschaften ionischer Verbindungen hängen von der vorliegenden Kristallstruktur ab, die z.B. mit Hilfe der Röntgenbeugung bestimmt werden kann. Die Struktur kann aber auch durch äußere Parameter beeinflusst sein. Polymorphien sind ein bekanntes Beispiel, bei denen unterschiedliche Umgebungstemperaturen oder Drücke ursächlich für unterschiedliche Kristallstrukturen derselben chemischen Verbindung sind. Eisen(II)-sulfid ( $\text{FeS}_2$ ) kommt beispielsweise einerseits als Pyrit in kubischer Struktur vor, andererseits aber auch als Markasit in orthorhombischer Struktur. Letzteres wandelt sich bei hohen Temperaturen ( $> 400 \text{ }^\circ\text{C}$ ) in Pyrit um.

Im Gegensatz zu kovalenten Bindungen treten Ionenbindungen häufig dann auf, wenn die beteiligten Atome oder Molekülgruppen stark unterschiedliche Elektronegativitäten besitzen. Dies gilt z.B. für einfache Metallhalogenide oder -chalkogene, daneben aber auch für Komplexionen wie Sulfate. Auf kurze Distanz besitzen ionische Oberflächen in jedem Fall multipolare Eigenschaften, denn die entgegengesetzten Ladungen der Ionen sind an unterschiedlichen Positionen der Oberfläche lokalisiert. Die dabei auftretenden Kräfte werden nachfolgend beschrieben.

## Dipole und Polarisierbarkeit

Befinden sich zwei ungleichnamige elektrische Ladungen in einem bestimmten Abstand voneinander in stationären Anordnung, so bilden diese Ladungen einen **Dipol**. Auf die vorab diskutierten ionischer Kristalle trifft diese Beschreibung zu. Ein weiteres Beispiel sind polare kovalente Bindungen, in denen sich die beiden gebundenen Atome in ihrer Elektronegativität unterscheiden (siehe hierzu Abbildung 2.1 B). Der Ladungsschwerpunkt der gemeinsam genutzten Elektronen befindet sich in dieser Anordnung weiter auf die Seite des elektronegativeren Bindungspartners.

Dipole können stationär sein, sie können aber auch induziert werden durch **Influenz**. Das geschieht beispielsweise in Metallen, in denen sich Elektronen innerhalb des Leitungsbandes frei bewegen können und daher dem Einfluss äußerer elektrischer Felder folgen. Induzierte Dipole

---

<sup>1</sup>Auf die Wirkung fluktuierender Ladungsverteilungen innerhalb dieser Bindungen wird weiter unten eingegangen.

<sup>2</sup>Um ionisch gebundene Kristalle zu schmelzen und damit die Bindungsenergie der Ionenbindung zu überwinden, sind häufig Temperaturen über  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$  notwendig. Dagegen werden molekulare Verbindungen häufig bereits bei Temperaturen deutlich unter  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$  instabil und zerfallen.

kommen auf molekularer Größenskala z.B. in Verbindung mit delokalisierten Elektronensystemen vor, innerhalb derer sich Elektronen durch Influenz verlagern lassen und an unterschiedlichen Stellen lokalisierte Ladungsschwerpunkte erzeugt werden können. Auf die gleiche Weise lassen sich auch an einzelnen Atomen Dipole induzieren.

Dipole werden durch ihr Dipolmoment  $\vec{p} = q\vec{l}$  charakterisiert.  $q$  ist dabei der Betrag der (positiven oder negativen) Ladung um einen Ladungsschwerpunkt herum,  $\vec{l}$  ist der Verbindungsvektor zwischen dem negativen und dem positiven Ladungsschwerpunkt. In homogenen Feldern wirkt auf einen Dipol lediglich ein Drehmoment, das sein Dipolmoment parallel zum äußeren elektrischen Feld ausrichtet. Die an beiden Ladungen angreifenden Kräfte sind dabei jederzeit entgegengesetzt gleich groß und kompensieren sich nach der Ausrichtung des Dipols vollständig. Im Falle inhomogener Felder, beispielsweise falls sich Dipole gegenseitig beeinflussen, wirkt zusätzlich zur Richtkraft eine attraktive Kraft zwischen den Dipolen. Permanente Dipole können ähnlich wie elektrische Ladungen durch die Wirkung ihres Feldes spontan weitere Dipole induzieren, wodurch zwischen beiden ebenfalls die vorab genannte attraktive Wechselwirkung entsteht.

Die Relevanz von Dipolkräften wird bei der Untersuchung von Siedetemperaturen deutlich. Ethan ist ein relativ schweres Molekül (30,07 g/mol) und siedet trotzdem bereits bei  $-89\text{ }^\circ\text{C}$ , während Wasser trotz seines geringeren Molekulargewichtes von 18 g/mol erst bei  $100\text{ }^\circ\text{C}$  siedet. Beim Wasser muss daher eine nicht zu vernachlässigende anziehende Kraft wirken, die trotz des geringen Molekulargewichtes zu dieser hohen Siedetemperatur führt. Diese Kraft rührt von Dipolkräften her, die die Wassermoleküle bis zu hohen Temperaturen zusammenhalten. Diese intermolekularen Dipolkräfte werden als **Wasserstoff-Brückenbindungen** bezeichnet. Durch ihren Einfluss bildet Wasser ein Molekülnetzwerk, innerhalb dessen die Moleküle sich energieminimal anordnen.

Sämtliche Atombindungen zwischen Atomen unterschiedlicher Elektronegativität zeigen einen mehr oder minder ausgeprägten polaren Charakter, und resultierend daraus ergeben sich auch dort entsprechende Kräfte durch Wasserstoffbrücken. Die Stärke der Wechselwirkung hängt primär von der Differenz der Elektronegativitäten der beteiligten Atome und damit von der Bindungspolarität ab. Die Ausbildung der Wasserstoff- bzw. Dipolbrücken kann durch eine zunehmende Molekülgröße oder ungeeignete Molekülgeometrien behindert werden. Das Wassermolekül ist insofern kein exotisches Beispiel, bei dem diese Art der intermolekularen Wechselwirkung unitär auftritt. Allerdings lassen die starke Bindungspolarität zwischen Wasserstoff und Sauerstoff und die geringe Größe des Wassermoleküls diesen Effekt sehr deutlich ausfallen.

### Kolloidale und makroskopische Objekte

Homogene Körper bestehen aus vielen Atomen oder Molekülen derselben Sorte, die alle einzeln betrachtet auf externe Felder alle gleichartig reagieren. Treten viele Atome oder Moleküle gemeinsam auf (etwa in Kolloidalteilchen oder entlang von Grenzflächen), so beeinflussen sich diese gegenseitig, und äußere Felder führen dann i.a. zu anderen Wirkungen als die einfache Summe einzelner Molekülwechselwirkungen. Dies kann Konsequenzen auf die Wechselwirkung des gesamten Körpers haben. In realen Systemen hat man es oft mit einem undurchsichtigen Gemenge organischer und anorganischer Materialien zu tun, die in ihrer Gesamtheit bis auf

das letzte Molekül oder ein ionisch aufgebautes Nanopartikel gar nicht zu erfassen sind. Eine wohldefinierte chemische Zusammensetzung einer Oberfläche würde hingegen die Untersuchung von Oberflächeninteraktionen in besonderem Maße erleichtern. Dasselbe gilt für eine einfache Oberflächenstruktur.

## Ionen und gelöste Bestandteile entlang von Grenzflächen

Wasser oder wässrige Lösungen beinhalten immer Ionen, entweder durch Verunreinigungen oder durch Autoprotolyse<sup>3</sup>. Daher wird es entlang ladungstragender Oberflächen in wässrigen Lösungen immer Abschirmeffekte durch entsprechende Gegenladungen und entstehende Gleichgewichtsverteilungen der Ionen geben. Derartige Anordnungen reduziert die Reichweite elektrostatischer Wechselwirkungen. In wässrigen Medien führt die starke Polarisierbarkeit des Mediums zusätzlich zu einer Schwächung des effektiv wirkenden elektrischen Feldes, so dass die von elektrischen Ladungsverteilungen ausgehenden Kräfte kleiner sind als im Modellfall von Ladungen im Vakuum. Daher besitzt das Medium, durch welches hindurch Wechselwirkungen stattfinden, einen signifikanten Einfluss auf die Stärke der elektrischen Wechselwirkungen, der im statischen Fall durch seine **Polarisierbarkeit** charakterisiert wird.

Die Polarisierbarkeit eines Materials für elektromagnetische Wechselfelder kann durch die **Dielektrische Funktion**

$$\varepsilon(\nu) = \varepsilon'(\nu) + i\varepsilon''(\nu) \in \mathbb{C}$$

beschrieben werden. Das Betragsquadrat des Realteils dieser komplexwertigen Funktion entspricht der frequenzabhängigen Brechzahl  $n$

$$n = \varepsilon'^2$$

Der Imaginärteil  $\varepsilon''$  beschreibt das Absorptionsverhalten elektromagnetischer Wellen bei Wechselwirkung mit einem Medium.

Aus der dielektrischen Funktion zweier Medien lässt sich die Hamaker-Konstante berechnen, die für die Beschreibung der van-der-Waals-Kräfte wichtig ist.

Die große und häufig relevante Polarisierbarkeit von Wasser lässt sich auf das Dipolmoment des Wassermoleküls zurückführen. Auf eingebrachte Ladungen reagiert Wasser mit dem Aufbau einer Hydrathülle: Wassermoleküle ordnen sich dabei aufgrund ihres Dipolcharakters um die eingebrachten Ladungen herum an. Die Bindungskräfte so angelagerter Wassermoleküle an eine Ladung können so groß sein, dass bei der Bewegung der Ladung die angelagerten Moleküle mitbewegt werden (müssen). Das erhöht erheblich die effektive Masse und auch den effektiven Querschnitt des dann hydratisierten Ions, von dessen Beweglichkeit z.B. die elektrische Leitfähigkeit abhängen kann.

---

<sup>3</sup>Als Autoprotolyse bezeichnet man die spontane Aufspaltung eines Wassermoleküls in ein Proton und ein negativ geladenes Hydroxidion. Dieses chemische Gleichgewicht ist der Grund für den neutralen pH-Wert von 7, bei dem keine weiteren außer die aus der Autoprotolyse stammenden Protonen in einer Lösung vorhanden sind.

## Oberflächen

Bei in Wasser eingebrachten, ladungstragenden Oberflächen treten die gerade für freie Ladungen geschilderten Effekte an der Grenzschicht zwischen Wasser und Oberfläche auf. Durch den Einfluss des Wassers kann es u.U. sogar erst zu Ladungen an der Oberfläche kommen, wenn z.B. dort befindliche Ionen in Lösung gehen oder funktionelle Gruppen an der Oberfläche mit Wasser reagieren. Entlang einer geladenen Oberfläche reichern sich im Wasser jedenfalls Gegenladungen an, die die sogenannte **Stern-Schicht** bilden, vgl. Abbildung 2.2. Innerhalb dieser Schicht gibt es sehr stark an die Oberfläche gebundene Ionen, die auf der Oberfläche lokalisierte Ladungen schwächen. Die elektrostatische Wirkung der Oberfläche wird hierdurch erheblich vermindert. Auf der Stern-Schicht wiederum lagern sich mit größerer Tendenz entgegengesetzte Ladungen an. So entsteht eine Abfolge gegensätzlich geladener Ionen, die aber aufgrund der immer geringer werdenden Feldstärke und des dämpfenden Einflusses des Wassers mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche immer unschärfer wird. Im Grenzfall großer Entfernung von jeglicher Oberfläche sind positive und negative elektrische Ladung homogen verteilt, und ihre Konzentration entspricht der Elektrolytkonzentration des Mediums.

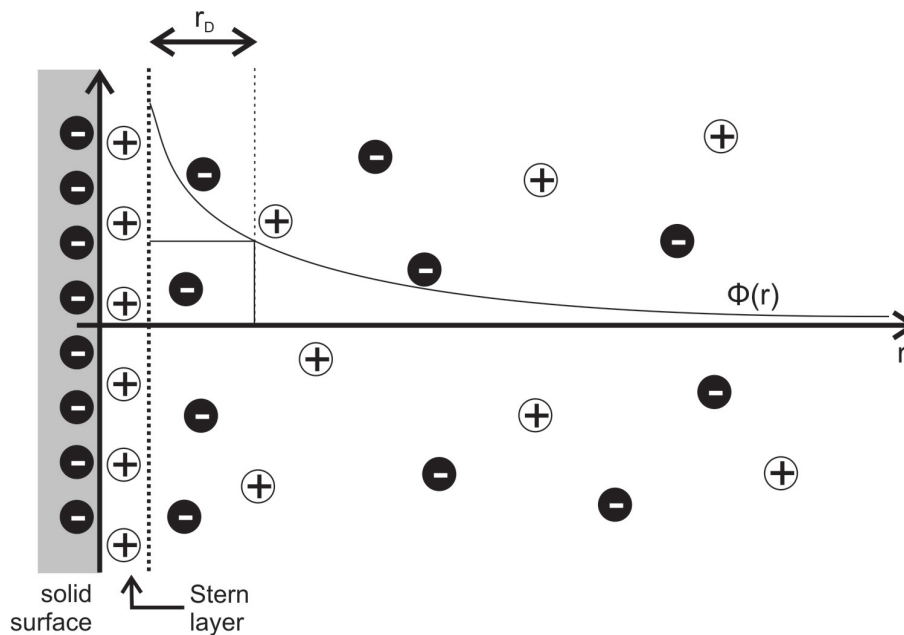


Abbildung 2.2: Anordnung von Ladungen entlang einer geladenen Oberfläche in einer Salzlösung. Das den Ladungszustand der Oberfläche charakterisierende  $\zeta$ -Potential wird an der Position zwischen Sternschicht und Lösung bestimmt (dicke gestrichelte Linie).

Während eine isoliert im Vakuum befindliche elektrische Ladung ein radial abfallendes elektrisches Potential  $\propto \frac{1}{r}$  erzeugt, resultiert für eine geladene Oberfläche in einer Ionen enthaltenden Lösung als spezielle Anordnung von Gegenladungen eine exponentiell verlaufende Ladungsträgerkonzentration: Während die zur geladenen Oberfläche gleichnamigen Ladungen einen

exponentellen Anstieg auf die Konzentration in der Lösung fernab der Oberfläche zeigen, resultiert für die ungleichnamige Ladungssorte an der Oberfläche und ein mit zunehmendem Abstand exponentiell abfallender Überschuss. Auf die sich insgesamt einstellende Ladungsträgerkonzentration kann die Poisson-Gleichung angewendet werden. Als Lösung ergibt sich ein exponentielles elektrisches Potential, dessen Größe vom Abstand zur geladenen Oberfläche abhängt.

$$\Phi(r) = \Phi_0 \exp(-\xi r)$$

$\Phi_0$  ist hierbei das elektrische Potential fern der felderzeugenden Ladung(en), in dieser Betrachtung also das elektr. Potential der Lösung. Der Koeffizient  $\xi$  hat die Einheit einer reziproken Länge und es gilt

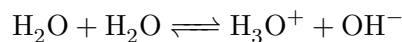
$$r_D = \frac{1}{\xi} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r k_B T}{e^2 \sum_i c_i z_i^2} \quad (2.2)$$

$r_D$  heißt **Debye-Länge** und ist ein Maß für die Reichweite elektrostatischer Kräfte in einer Salzlösung. Die Summe

$$\sum_i c_i z_i^2 =: I \quad (2.3)$$

wird als **Ionenstärke** bezeichnet. Sie berücksichtigt neben der Zahl der Ionen in einer Lösung auch deren jeweilige Ladung. Hohe Ionenstärken führen nach Gleichung 2.2 zu einer starken Dämpfung des elektrischen Potentials, was sich in einer entsprechend kleinen Debye-Länge äußert. In hochkonzentrierten Puffern spielen elektrostatische Wechselwirkungen daher auch nur eine untergeordnete Rolle für die Wechselwirkung von Kolloiden oder Molekülen. Ionisch stabilisierte Suspensionen von Kolloidalteilchen können durch Hinzugabe von Salz durch die auftretende Verkürzung der Debye-Länge zum Ausfallen getrieben werden.

Der pH-Wert ist ein Maß für die Zahl in einer wässrigen Lösung vorhandener Oxoniumionen. Definiert wird er als negativer Zehnerlogarithmus ihrer Konzentration in einer Lösung. In pH-neutralem Wasser beträgt die Konzentration beider Ionensorten  $10^{-7}$  mol/l, und sie entstehen paarweise durch die Autoprotolyse des Wassers:



Entstehen durch andere Prozesse weitere  $\text{H}_3\text{O}^+$ - oder  $\text{OH}^-$ -Ionen, so ändert sich der pH-Wert einer Lösung, und gleichzeitig steigt die Zahl der freien Ladungsträger. Häufig besitzt der pH-Wert neben dem Einfluss auf die Debye-Länge auch Einfluss auf die chemischen Verhältnisse in der Lösung oder an einer angrenzenden Oberfläche. Dort können Protonierungs- oder Deprotonierungsreaktionen ausgelöst werden, wodurch sich der Ladungszustand einer Oberfläche

verändern kann. Auch kann der pH-Wert Einfluss auf die Löslichkeit eines Materials besitzen. Bei Säuren und Laugen besteht daher in mehrfacher Hinsicht ein Einfluss auf die Wechselwirkungen entlang von Grenzflächen in wässrigen Medien.

Das elektrische Potential an der wasserseitigen Grenze der Sternschicht relativ zum ungestörten Ladungszustand der Lösung fernab jeglicher Grenzfläche wird als  **$\zeta$ -Potential** bezeichnet. Die innerhalb der Sternschicht enthaltenen Ionen sind aufgrund der elektrischen Anziehungskräfte der Oberfläche praktisch fixiert und sorgen so für einen stationären Zustand, der durch hinreichend kleine Scherströmungen innerhalb des überstehenden Mediums nicht gestört wird. Dazu kommen in einer nächsten Lage ggf. schwächer als in der Stern-Schicht gebundene Ionen, die sich relativ zur Oberfläche bewegen können und sich bei ruhender Lösung unter dem Einfluss der Oberfläche anordnen können. Das effektive elektrostatische Oberflächenpotential einer Lösung bestimmt sich daher als das  $\zeta$ -Potential. In Abbildung 2.2 ist der Ort zur Bestimmung des Zetapotentials als dicke getrichelte Linie eingetragen.

Änderungen des  $\zeta$ -Potentials sind durch Änderungen in den elektrostatischen Verhältnissen entlang einer Oberfläche bedingt. Die genaue quantitative Abhängigkeit ist kompliziert, allerdings kommt der relativen Änderung häufig Bedeutung zu: Ändert sich durch chemische Änderungen an einer Oberfläche das zugehörige  $\zeta$ -Potential, so wirkt die Oberfläche relativ zum Anfangszustand mehr oder weniger geladen. Elektrostatische Kräfte werden entsprechend stärker oder schwächer, was für die Erklärung entsprechender Wechselwirkungen eine sehr hilfreiche Angabe sein kann. Wie vorab dargestellt wurde, kann der pH-Wert einer Lösung Einfluss auf das elektrostatische Potential besitzen. Das  $\zeta$ -Potential ist daher i.a. pH-Wert-abhängig.

### van-der-Waals-Wechselwirkung

Bei fluktuierenden Ladungsverteilungen (z.B. in delokalisierten Elektronensystemen, aber auch nur schon bei gebundenen Elektronen im Atom oder bei den Elektronen in kovalenten Bindungen) führen statistisch auftretende Ladungsschwerpunkte zu transienten Dipolen, die trotz ihrer Kurzlebigkeit einen Einfluss auf Moleküle oder Atome besitzen können. Edelgase lassen sich beispielsweise deswegen verflüssigen, weil innerhalb ihrer Elektronenschalen kurzlebige Ladungsdichteschwankungen vorhanden sind. Ohne diese wären anziehende Kräfte zwischen den Atomen nicht vorhanden und die Edelgase lägen nur schwach wechselwirkend in gasförmigem Aggregatzustand vor. Die dabei wirkenden Kräfte werden im engeren Sinne als **Van-der-Waals-(vdW)-Kräfte** bezeichnet.

Im allgemeineren werden als vdW-Kräfte drei Arten von Dipolkräften bezeichnet:

- **Keesom-Kräfte:** Dipolwechselwirkungen zwischen zwei beweglichen permanenten Dipolen
- **Debye-Kräfte:** Dipolwechselwirkungen zwischen einem permanenten und einem induzierten Dipol
- **Londen-Kräfte:** Dipolwechselwirkungen zwischen zwei fluktuierenden Dipolen

Allen aufgezählten Wechselwirkungen gemein ist ihre Abstandsabhängigkeit  $\propto 1/r^6$  und der grundsätzlich attraktive Charakter. Die Abstandsabhängigkeit besitzt allerdings nur Gültigkeit



für Wechselwirkungen zwischen punktförmigen Partikeln. Werden dagegen auf der experimentellen Längenskala ausgedehnte Objekte wie Oberflächen oder (modellhaft) Kugeln betrachtet, verändert sich die Abstandsabhängigkeit, weil bei der paarweisen Berechnung der Wechselwirkung entsprechend der Dimension der betrachteten Objekte über alle beteiligten Teilchen integriert wird. Hierdurch variieren die vdW-Kräfte mit bis zu  $1/r$ -Abhängigkeit [4].

Im Gegensatz zu elektrostatischen Kräften sind vdW-Kräfte nicht durch „Gegendipole“ abschirmbar, denn zwischen Dipolen resultiert nach gegenseitiger Ausrichtung immer eine anziehende Kraft. Lediglich aufgrund größeren Abstandes können entlang einer Oberfläche die vdW-Kräfte soweit abgeschwächt werden, dass sie unbedeutend sind. Dies ist beeindruckend an Si-Proben zu beobachten, die an ihrer Oberfläche einmal mit einer dünnen und einmal mit einer dicken Oxidschicht bedeckt sind: Aufgrund der unterschiedlichen **Hamaker-Konstanten** für Silizium und Siliziumdioxid besitzen trotz chemisch gleichartiger Oberfläche ein Si-Wafer mit dicker und ein Wafer mit dünner Oxidschichtdicke ein unterschiedliches Oberflächenpotential. Diese quantitativ unterschiedlichen Oberflächen zeigen beispielsweise bei Protein-Adsorptionsexperimenten unterschiedliche Resultate [5].

Hamaker-Konstanten ergeben sich aus der jeweiligen Polarisierbarkeit benachbarter Medien, die über die Dielektrizitätskonstanten ausgedrückt werden [4].

## Hydratisierung und hydrophober Effekt

Das Einbringen hydrophober Partikel bzw. apolarer Moleküle in eine Wasserphase resultiert scheinbar in attraktiven Wechselwirkungen der eingebrachten Teilchen. Tatsächlich ist diese scheinbare Kraft ein Resultat der gegenseitigen Wechselwirkung der Wassermoleküle. Wegen der apolaren Eigenschaften der eingebrachten Fremdpartikel wird das durch die Wasserstoffbrückenbindung der Wassermoleküle erzeugte molekulare Netzwerk unterbrochen und eine Grenzschicht entsteht. An dieser Grenze müssen sich daher die Wassermoleküle umorganisieren, um untereinander wieder einen Zustand mit größtmöglicher gegenseitiger Bindung und damit geringster Energie zu erlangen. Kommen sich zwei hydrophoben Fremdpartikel hinreichend nah, dann besitzt das Wassernetzwerk die Möglichkeit durch Bildung einer für beide Partikel gemeinsamen Grenzfläche den eigenen Energiezusatz zu minimieren. Die Partikel ziehen sich durch diesen entropischen Effekt scheinbar an. Die Anziehung ist allerdings ein Resultat der Eigenschaften des polaren Wassers und der mangelnden Integrierbarkeit des apolaren Materials [6]. Zur Reichweite des hydrophoben Effektes in Lösung gibt es keine zuverlässigen Angaben. In einem Übersichtsartikel von Meyer aus dem Jahr 2006 wird allerdings dargelegt, dass die anziehende Wirkung hydrophober Partikel oder Oberflächen untereinander nur in speziellen Fällen weiter reiche als 20 nm [7].

## Sterische Wechselwirkung – Born-Abstoßung

Bisher wurden attraktive Wechselwirkungen betrachtet. Eine repulsive Kraft kann außer durch abstoßende elektrostatische Kräfte durch die **Born-Abstoßung** verursacht werden. Auslöser ist dabei das Pauli-Prinzip, nach dem sich fermionische Teilchen (also z.B. auch die Elektronen in Molekülen oder Festkörpern) in paarweise verschiedenen Zuständen befinden müssen.

Interagieren zwei Systeme, weil sie in unmittelbare Nachbarschaft gebracht werden, zwingt das Pauli-Verbot – energetisch betrachtet – Elektronen auf höhere Energien (die unteren Niveaus sind ja bereits besetzt). Dies resultiert in einer abstoßenden Kraft, aufgrund derer sich Moleküle und Teile davon eher aus dem Weg gehen als dass sie Energie aufbringen, um Elektronen auf höhere Niveaus zu heben.

Die freie Rotation einer C-C-Bindung kann beispielsweise durch den Einfluss von Seitenketten eingeschränkt sein. Stehen sich Seitenketten genau gegenüber, enthält diese Struktur eine höhere potentielle Energie als der Zustand, bei dem Seitenketten eines C-Atoms exakt zwischen die Bindungslagen des zweiten C-Atoms fallen. Eine Festkörperoberfläche, der sich ein relativ großes Molekül nähert, ist praktisch undurchdringlich, so dass das Molekül praktisch immer oberhalb der Oberfläche befindet.

Die sterische Wechselwirkung wird in Modellen näherungsweise immer mit sehr kurzer Reichweite eingearbeitet, vereinfachend beispielsweise über eine  $\frac{1}{r^{12}}$ -Proportionalität, da auch die o.g. quantenmechanischen Effekte nur auf kurzer Reichweite wirksam sind.

### Zusammenfassung

Wechselwirkungen auf molekularer oder kolloidaler Größenskala sind dominiert von elektrisch bedingten Kräften, die in vielfältiger Ausprägung das Verhalten vieler Objekte bestimmen. Neben elektrostatischen Kräften lokalisierter Ladungen oder permanenter Dipole spielen auch durch Ladungsdichtefluktuationen erzeugte Kräfte transienter Dipole eine Rolle, wie es bei den van-der-Waals-Kräften der Fall ist. Abgesehen von den Phänomenen, durch die intermolekulare Kräfte verursacht werden, haben auf die Stärke der Wechselwirkung auch die Umgebungsbedingungen einen Einfluss. Frei bewegliche Ladungsträger (z.B. Ionen in wässrigen Lösungen) führen zu einer Abschirmung statischer elektrischer Felder. Je größer die Ladungsträgerkonzentration ist umso kleiner wird die Debye-Länge. Polarisierbare Materialien mit großer Dielektrizitätskonstante (und hier insbesondere Wasser als wichtiges Lösungsmittel) haben starken Einfluss auf elektrische Felder und können dabei zu einer Schwächung wirkender Kräfte führen.

## 2.2 DLVO-Theorie

Zwei miteinander in Wechselwirkung stehende Körper können auf mehr als eine Art Kräfte aufeinander ausüben. Beispielsweise sind neben elektrostatischen Kräften auch van-der-Waals-Kräfte wirksam, die sich anders als andere Kräfte nicht abschirmen lassen. Die dabei auftretenden Kräfte können relevante Größe erreichen, so dass sie einen Einfluss auf das Verhalten der interagierenden Körper bewirken.

Eine theoretische Beschreibung aus mehreren Wechselwirkungen zusammengesetzter Potentiale liefert die nach den Entwicklern benannte **DLVO-Theorie** (Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek) [8, 9]. Sie war ursprünglich für die Beschreibung kolloidaler Systeme entwickelt worden, bewies jedoch bald darauf schon Anwendungen auch bei Oberflächenwechselwirkungen. Berücksichtigt werden bei der klassischen Beschreibung langreichweitige Wechselwirkungen, die zu einem alles umfassenden Oberflächenpotential aufaddiert werden. Hierbei können

sowohl repulsive als auch attraktive Wechselwirkungen eingehen. Abbildung 2.3 zeigt einen typischen Potentialverlauf, wie er bei der Annäherung eines geladenen Körpers an eine geladene Oberfläche in einer ionenenthaltenden Lösung vorgefunden werden kann. Die elektrostatische Doppelschicht aus Gegenionen im Bereich der Oberfläche bewirkt zunächst ein hohes Potential, bevor auf kürzerer Entfernung wirksame, attraktive Dipolkräfte dominant werden.

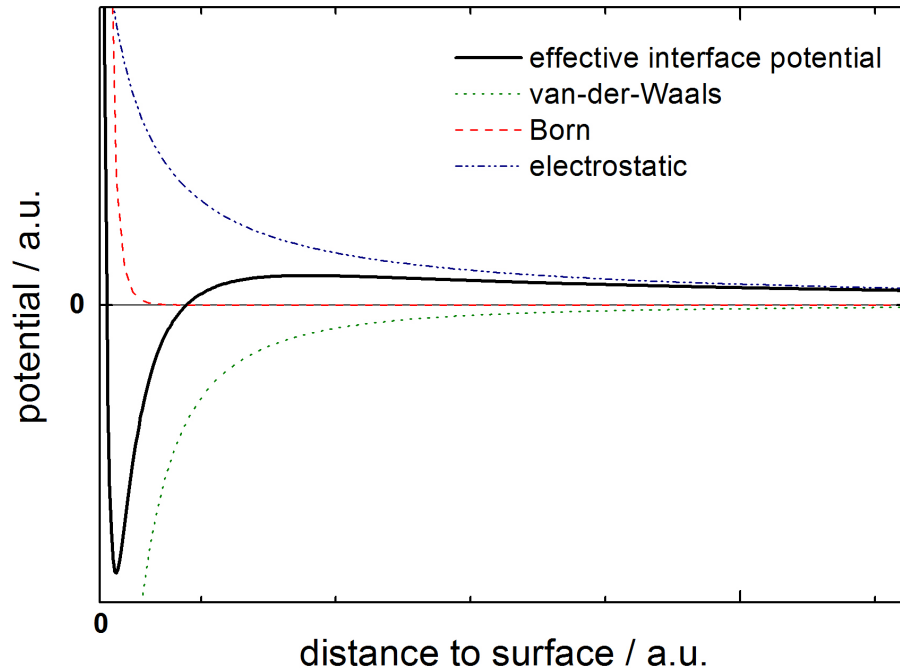


Abbildung 2.3: Schematische Veranschaulichung zur Entstehung eines komplizierten Grenzflächenpotentials als Summe der Potentiale zu berücksichtigender einzelner Wechselwirkungen.

Die DLVO-Theorie, in deren Berechnungen langreichweitige Anteile eingehen, berücksichtigt nicht die an eine Oberfläche bei sehr geringen Entfernungen relevanten repulsiven sterischen Wechselwirkungen. In der erweiterten DLVO-Theorie (XDLVO) treten sog. Elektronenakzeptor- und -donator-Wechselwirkungen auf, die die fehlende kurzreichweitige Repulsion erfassen [10]. Sie ergeben sich aus der Differenz von Oberflächenenergien, die im Kontaktfall und fernab davon in die Energiebilanz des Systems einbezogen werden. Das durch Addition aller beteiligter Wechselwirkungen erhaltene Gesamtpotential kann einen Adhäsionsvorgang in einfachen Systemen beschreiben. Wie von Loskill in seiner Dissertation [11] allerdings bereits erwähnt wird, muss im Falle lebender Organismen (hier ging es um Bakterien) aufgrund deren Verhaltens die Gültigkeit eingeschränkt werden<sup>4</sup>.

Liegen passende Verhältnisse vor, so existiert in relativer Nähe zu einer attraktiven Oberfläche ein Potentialminimum, dessen Auftreten durch die attraktiven Wechselwirkungen einerseits und die stark repulsiven sterischen Kräfte andererseits bedingt sind. Dieses Minimum bewirkt

<sup>4</sup>Ein Beispiel ist das nicht-lineare elastische Verhalten von Zellen, auf die eine Kraft ausgeübt wird.

die **Adhäsion** zwischen zwei Objekten, deren Auftreten im Oberflächenpotential anhand des erwähnten Minimums vorherzusehen ist. Seine Tiefe gibt Aufschluss über die Stärke der Adhäsion und die zum Überwinden aufzubringende Arbeit.

Für die später zu beschreibende Adhäsion von Bakterien (siehe Kapitel 7) kann mit Hilfe der DLVO-Theorie ein Erklärungsansatz für die gemessenen Ergebnisse geliefert werden. Dazu werden einzelne beteiligte Wechselwirkungen separat voneinander diskutiert und ihr Einfluss auf das resultierende Potential betrachtet.

### 2.3 Proteine

Proteine bilden die Grundlage für die Biochemie von Zellen, sogar einzelner Zellorganellen, und damit auch für die physiologischen Vorgänge des Lebens überhaupt. Proteine besitzen als Polypeptid einen einfachen Aufbau, allerdings sind die aus der Wechselwirkung der unterschiedlichen Aminosäure-Reste resultierende Struktur komplex und die Kraftwirkungen der Moleküle auf Ihre Umgebung und umgekehrt schwer vorhersagbar. Die Vielzahl verschiedener, genau auf die jeweilige Aufgabe angepasster Moleküle mit unterschiedlichsten Eigenschaften erhöht die Komplexität zusätzlich.

In diesem Abschnitt wird der grundsätzliche Aufbau von Proteinen vorgestellt. Anschließend werden die Wechselwirkungen von Proteinen untereinander wie auch zu anderen Molekülen oder Oberflächen charakterisiert.

Proteine werden in Zellen gebildet, die generell als auf die Herstellung von Proteinen spezialisierte Fabriken angesehen werden können. Proteine dienen als Bausubstanz, deren Darstellung (**Exprimierung**) von biochemischen, aber auch von physikalischen Faktoren abhängt. Beispielsweise kann die Art der hergestellten Proteine einer Zelle davon abhängen, ob sie in einem Gewebe integriert ist oder nicht. Von Bakterien ist bekannt, dass sie nur dann sog. Exopolymere (siehe Kapitel 7) erzeugen, wenn sie sich nicht im planktonischen<sup>5</sup> Zustand befinden, sie sich also in adhäsivem Kontakt mit einer Oberfläche befinden [12, 13]. Aufgrund der Verbreitung, die Proteine in biologischen Systemen besitzen, sind sie oft an Adhäsionsvorgängen beteiligt.

Proteine sind Polypeptide, deren Monomereinheiten von **Aminosäuren** gebildet und durch Peptidbindungen (-CO-NH-, s. Abbildung 2.4) miteinander verbunden werden. Das Molekulargewicht eines Proteinmoleküls wird in Biochemie und Biologie in der Einheit 1 Dalton (1 Da = 1 u) angegeben. Die Zahl der Aminosäuren innerhalb eines Proteins ist prinzipiell unbegrenzt, weshalb das Molekulargewicht sehr groß werden kann.

Von den am Bau von Proteinen beteiligten  $\alpha$ -Aminosäuren<sup>6</sup> gibt es genau zwanzig, die in biologischen Systemen vorkommen. Die unterschiedlichen Seitenketten, die sog. **Aminosäurereste**, besitzen unterschiedliche Größe, und auch ihre sonstigen physikalisch-chemischen Eigenschaften sind teilweise höchst unterschiedlich [14].

Werden die einzelnen Aminosäuren durch Peptidpolymerisation hintereinander in großer Nähe zueinander angeordnet, so wirken zwischen den Aminosäureresten sehr individuelle Kräfte,

---

<sup>5</sup>freischwimmend, nicht anhaftend

<sup>6</sup>Bei  $\alpha$ -Aminosäuren befinden sich Carboxyl- und Aminogruppe gemeinsam am ersten C-Atom

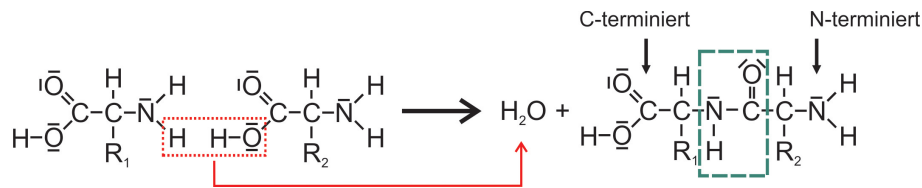


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung der Bildung einer Peptidbindung. Zwei Aminosäuremoleküle mit Säureresten R<sub>1</sub> und R<sub>2</sub> können unter Freisetzung von Wasser eine Peptidbindung (gestrichelter Rahmen rechts) erzeugen.

die durch die Art der wechselwirkenden Aminosäuren, ihre jeweilige Polarität und ihre Größe bestimmt werden. Die Reichweite elektrostatischer Kräfte wird darüberhinaus von in dem umgebenden Medium enthaltenen Ladungsträgern beeinflusst (siehe dazu den vorherigen Abschnitt). Durch Säure-Base-Reaktionen kann außerdem der Ladungszustand von Aminosäuren mit freier Amino- oder Carboxylgruppe beeinflusst werden, wie es in Abbildung 2.5 beispielhaft dargestellt ist. Die Struktur eines Proteinmoleküls ist somit von einer Vielzahl sich auch gegenseitig beeinflussender Faktoren abhängig. Welche Kräfte daher zwischen welchen Molekülteilen wirken, ist stark von der Abfolge der Aminosäuren innerhalb eines Proteins.

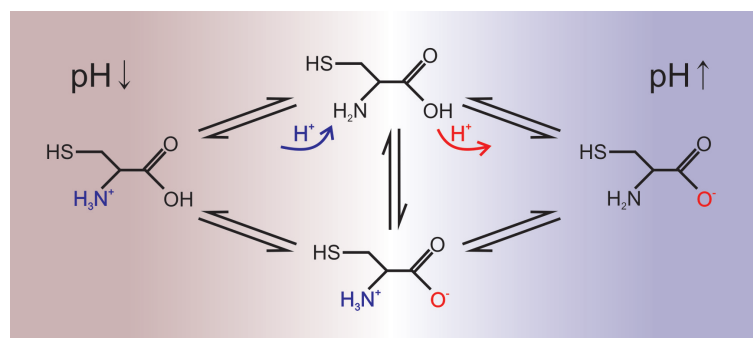


Abbildung 2.5: Protolysegleichgewicht eines einzelnen Cystein-Moleküls. In einer Umgebung mit hohem pH-Wert liegt sie an der Carboxylgruppe deprotonierte Form vor, bei niedrigem pH die an der Aminogruppe protonierte Form. Bei neutralem (und damit annähernd physiologischen) pH-Wert liegt das Cystein-Molekül als Zwitterion vor, wobei die Carboxylgruppe negativ und die Aminogruppe positive Ladung trägt.

Die Abfolge der innerhalb eines einzelnen Proteinmoleküls angeordneten Aminosäuren wird als **Aminosäuresequenz** oder **Primärstruktur** bezeichnet. Die sich einstellenden Wechselwirkungen und insbesondere Wasserstoffbrücken, die sich zwischen verschiedenen Teilen desselben Proteinmoleküls bilden, beeinflussen den Verlauf des Proteinrückgrates. Es bildet sich durch diese Wechselwirkungen die sog. **Sekundärstruktur**, die sich als Resultat der intramolekularen Wechselwirkungen ergibt. Neben flexiblen ausgestreckten Strukturen können sich durch diese Wechselwirkungen u.a. schrauben- oder tonnenförmige (sog. Helices) oder flächige An-

ordnungen (sog. Faltblätter) ausbilden. Es entstehen jeweils größere Strukturelemente, deren Stabilität durch die große Nähe der Aminosäurereste zueinander und der daraus folgenden Interaktion gewährleistet ist. Die Aminosäurereste werden sich so anordnen, dass das Molekül minimale freie Energie besitzt [14, 15].

Die gegenseitige Anordnung von Sekundärstrukturelementen zueinander wird als **Tertiärstruktur** bezeichnet. Bilden darüber hinaus mehrere Proteinmoleküle (nicht notwendigerweise desselben Proteins) miteinander noch größere Strukturen, so bezeichnet man diese Anordnung als **Quartärstruktur**. Solche großen Strukturen kommen beispielsweise bei der Blutgerinnung (Prothrombinasekomplex) [16] oder bei der ATP-Synthese in den Mitochondrien von Zellen [17] vor. Auch können sich Oligomere, physikalisch gebundene Anordnungen mehrerer Moleküle desselben Typs, bilden. Die Antrieb bei diesen Ordnungsprozessen stammt von den intermolekularen Kräften, die zwischen Strukturelementen oder ganzen Molekülen wirken.

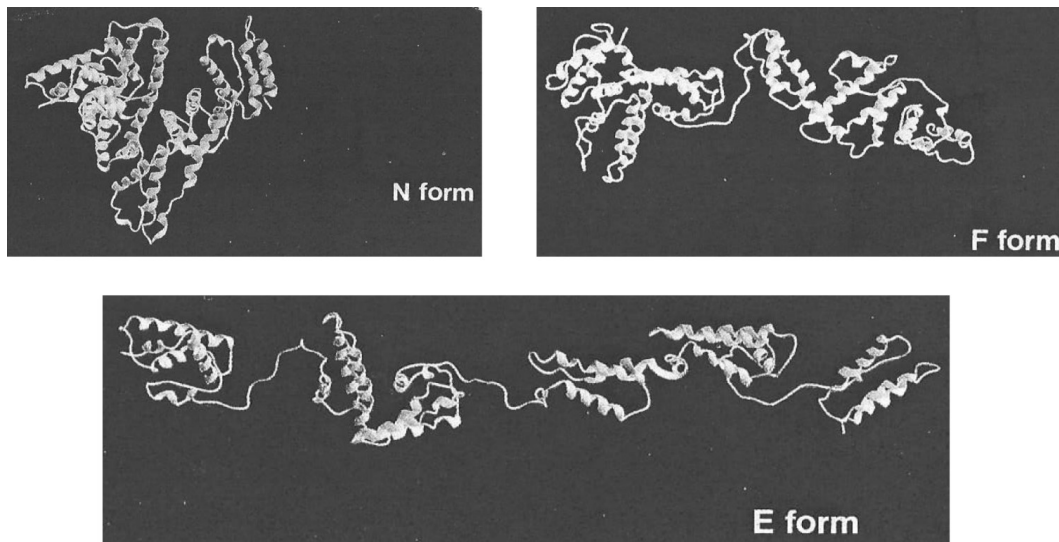


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der drei unterschiedlichen Konformationen des BSA-Moleküls, die sich je nach herrschendem pH-Wert einstellen. (Reprint from [18] with permission from Elsevier)

Ein bei gegebenen Umgebungsbedingungen (pH, Ionenstärke) stabiler Molekülzustand kann sich durch eine Veränderung der Umgebung in einen instabilen Zustand verwandeln [19]. Eine vorliegende Version aus der Gesamtheit aller möglichen Anordnungen eines Proteinmoleküls wird allgemein als **Konformation** oder **Faltung** bezeichnet. Diese kann sich auf reversible oder irreversible Weise einstellen. Der irreversible Übergang in einen Zustand ohne biologische Funktion wird als **Denaturierung** bezeichnet. Rinder-Serumalbumin (engl. bovine serum albumin, BSA) kommt beispielsweise in Abhängigkeit des äußeren pH-Wertes in drei unterschiedlichen Konformationen vor [18], die in Abbildung 2.6 gezeigt sind. Von den Änderungen durch äußere Parameter können alle Strukturebenen außer der Primärstruktur betroffen sein [20]. Neben den internen Wechselwirkungen können Änderungen der äußeren Parameter auch die Interaktion der Proteine untereinander oder zu Grenzflächen beeinflussen. Beispielsweise

kann der pH-abhängige Ladungszustand zu einem pH-abhängigen Verhalten der Proteine untereinander oder entlang geladener Oberflächen führen. Zu beachten ist, dass eine Konformationsänderung nicht zwangsläufig mit einer Denaturierung eines Proteinmoleküls gleichzusetzen ist.

Kommen Proteine in den Einflussbereich von Oberflächen, so werden die intramolekularen Kräfte durch die dann wirkenden äußeren Kräfte und die evtl. vorliegende Änderung der Ionenkonzentration beeinflusst, wodurch am Protein lokalisierte Ladungen eine veränderte Abschirmung erfahren<sup>7</sup>. Auch kurzreichweitige und entropisch getriebene Kräfte können zu Veränderungen der Proteinkonformation führen (beispielsweise wenn hydrophobe Aminosäurereste sich bevorzugt entlang einer hydrophoben Oberfläche anordnen und die Struktur des Proteins dadurch verändert wird). Dies kann erheblichen Einfluss auf die Struktur der Proteine haben. So konnte anhand von röntgenreflektometrischen Daten adsorbierter Proteine gezeigt werden, dass die Dicke der Proteinschicht auf hydrophoben Oberflächen erheblich dünner ist als diejenige auf hydrophilen Oberflächen [3]. Zu einer erheblichen Verformung passt auch die herabgesetzte Diffusionsgeschwindigkeit, die Proteine an hydrophoben Oberflächen gegenüber solchen auf hydrophilen zeigen [21].

Die Temperatur kann je nach Stärke der zwischen den unterschiedlichen Strukturelementen eines Proteins auftretenden Bindungsenergien zu temperaturbedingten Unterschieden im Verhalten führen. Das betrifft Löslichkeit und Diffusionsgeschwindigkeit des Moleküls, aber auch dessen eigene Stabilität. Ein Erhitzen über einen bestimmten Temperaturwert kann zu Denaturierung führen, da Bindungen durch den höheren Energieinhalt einzelner Atome oder Molekül in vermehrtem Maße aufbrechen können.

Es existieren kaum Oberflächen, die beim Kontakt mit einer proteinhaltigen Lösung nicht mit einem Proteinfilm überzogen werden. Ursächlich dafür ist eine **unspezifische Adsorption**, die keinerlei besonderer Strukturen Bedarf, sondern aufgrund immer vorhandener intermolekularer Kräfte auftritt. Zu unterscheiden ist sie von der **spezifischen Adsorption**, bei der es sich um eher kurzreichweitige Wechselwirkungen handelt. Auf ihr beruht das für viele biochemische Phänomene verantwortliche Schlüssel-Schloss-Prinzip, bei dem die Aktivität eines Proteins durch die Bindung mit einem zweiten oder gar mehreren weiteren Proteinen ausgelöst wird. Die spezifische Adsorption ist hauptsächlich in der Physiologie von Bedeutung, während die unspezifische grundsätzlich auf allen Oberflächen möglich ist.

Von besonderem Interesse ist der funktionale Zustand, in dem sich die adsorbierten Proteine auf einer Oberfläche befinden. Entlang hydrophober Oberflächen wird häufig von auffällig dünnen denaturierten Proteinfilmen berichtet [3, 22, 23]. Die auf hydrophoben Oberflächen auf Proteine wirkenden Kräfte sind offenbar so groß, dass sie häufig denaturierenden Einfluss auf die Proteinmoleküle besitzen. Auf einer hydrophilen Oberfläche hingegen können die von ihr bewirkten Kräfte geringer ausfallen. Das Verhalten eines Proteinmoleküls hängt dann von dessen Stabilität ab: Lysozym ist z.B. aufgrund seiner internen, sehr rigiden Struktur sehr stabil, und eine Adsorption auf hydrophilen Oberflächen führt nicht zu einer Deaktivierung. Die Lysozym innewohnenden antibakteriellen Eigenschaften bleiben insofern ebenfalls erhalten, unabhängig von Adsorptionszustand des Moleküls [24]. Anders ist dies bei BSA, dessen Molekül

<sup>7</sup>Bestimmte Aminosäuren (z.B. Asparagin- oder Glutaminsäure) besitzen die Möglichkeit zu Säure-Base-Reaktionen am Aminosäurerest, wodurch Ladungen an den beteiligten Molekülgruppen lokalisiert werden

sich sehr leicht verformen kann. Die während und/oder nach einer Adsorption wirkenden Kräfte führen zu Strukturänderungen und können dadurch Eigenschaften des BSA-Moleküls besonders stark verändern [25].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zur Beschreibung des Verhaltens von Proteinen eine Vielzahl von Parametern zu berücksichtigen sind. Durch Änderungen des pH, der Temperatur oder der Salzkonzentration können Veränderungen der intra- und intermolekularen Kräfte auftreten. Konformationsänderungen können dadurch ausgelöst und damit die Funktion eines Proteins gestört oder unterbunden werden. Mit der Anlagerung im Bereich einer Grenzfläche entstehen neue Möglichkeiten von konformatorischen Veränderungen. Eine umfassende Einführung in das Themengebiet der unspezifischen Proteinadsorption liefert das Buch vom Malmsten [26] und die Dissertation von Hähl [3].

## 2.4 Hydroxylapatit und Hartgewebe

Hydroxylapatit ist das Mineral, aus dem Hartgewebe wie Knochen oder Zähne ihre Festigkeit beziehen. Seine allgemeinen Eigenschaften und sein Vorkommen werden in diesem Kapitel kurz vorgestellt.

### Apatite

Apatite sind in großer Vielfalt vorkommende Mineralien der Gruppe der „Phosphate, Arsenate und Vanadate“. Ihre Zusammensetzung kann nach Baikié [27, 28] mit der nachfolgenden chemischen Summenformel angegeben werden:



Hierbei repräsentieren  $A^I$  und  $A^{II}$  große Metallionen, also z.B. Alkali- oder Erdalkalimetallionen,  $B$  Metalloide (C, P, As, Te) und  $X$  beliebige Anionen, verbreitet Halogenid- oder Hydroxidionen. Apatite zeigen bei hohen pH-Werten niedrige Löslichkeiten in Wasser, mit sinkendem pH steigt diese Löslichkeit allerdings an. Apatite treten verbreitet in hexagonaler Kristallstruktur auf, und es kommt – je nach genauer chemischer Zusammensetzung und Temperatur – häufig zu Phasenübergängen zu anderen Kristallstrukturen [29].

Hydroxylapatit kommt in der Natur häufig als Bestandteil von Kalkgesteinen vor [30]. Seine große biologische Bedeutung allerdings erwächst aus seinem Vorkommen in Hartgeweben von Säugetieren (z.B. in Knochen oder Gebiss). Sein Massenanteil variiert dabei je nach Gewebe: Grob geht ein Zuwachs in der Härte mit einem Zuwachs des HAP-Anteils einher [31].

In Knochengewebe wird Hydroxylapatit in Form flacher Plättchen in ein Kollagengeflecht eingebaut (vgl. Abbildung 2.7) und sorgt damit für die Festigkeit des Gewebes. Der Massenanteil von HAP am Gesamtgewebe beträgt hierbei etwa 45% und hängt unter anderem von Alter und Spezies ab. Der zweitgrößte Anteil am Knochengewebe wird zu einem knappen Drittel von Proteinen dargestellt. Daneben sind noch Zellen und Wasser vorhanden [31]. Während



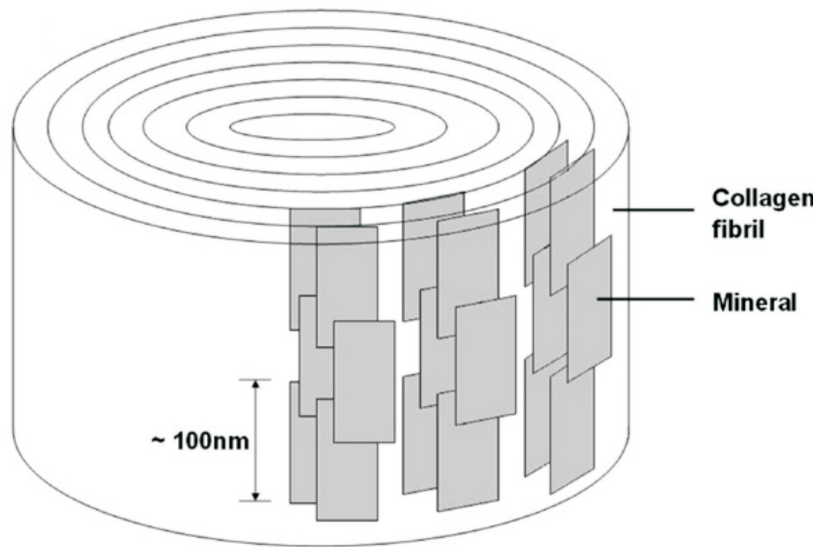
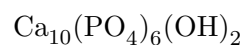


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des Aufbaus von Knochengewebe. Hydroxylapatit ist in Form dünner, geordneter Plättchen im Gewebe vorhanden. (Reprint from [31] with permission from Elsevier)

Knochengewebe also noch zelluläre und somit lebende Anteile enthält, handelt es sich bei Zahnschmelz um ein unbelebtes Gewebe. Zahnschmelz besteht zu 95% aus HAP, und nur der restliche kleine Teil seiner Gesamtmasse ist aus organischen Bestandteilen und Wasser aufgebaut. Zelluläre Bestandteile sind nicht enthalten [32].

### Eigenschaften von Hydroxylapatit

Bei Hydroxylapatit (HAP) befinden sich auf beiden Metallionenplätzen I und II in Formel 2.4 Calciumionen, als Metalloid ist Phosphor und als weiteres Anion das Hydroxidion in einer Einheitszelle enthalten. Die Summenformel dieser Verbindung lautet somit



Bei neutralen pH-Werten ist Hydroxylapatit ein in Wasser schwer lösliches Salz. Wie bereits oben allgemein erwähnt, nimmt auch für HAP die Löslichkeit mit abnehmendem pH-Wert deutlich zu. Daher verwendet man Hydroxylapatit als Füllung von Trennsäulen bei der Analyse pH-neutraler oder alkalischer Lösungen in der HPLC<sup>8</sup> [33]. Die in der chemischen Formel 2.4 ausgedrückte Variabilität der Zusammensetzung bei Apatiten bedingt auch Übergänge und Ersetzungsreaktionen zwischen unterschiedlichen Arten von Apatiten. HAP findet daher auch als Ionenabsorber Anwendung, beispielsweise für zweiwertige Schwermetallionen [34] oder für

<sup>8</sup>engl. *High Performance Liquid Chromatography*, Hochleistungs-Flüssigchromatografie, Auftrennverfahren für Mischlösungen von Proteinen

Fluoride [35]. Verunreinigungen können Strukturänderungen induzieren, etwa durch den Einbau zweiwertiger Fremdionen in das Gitter. Strontium- oder Zinkionen können so beispielsweise die Calciumionen ersetzen.

Für Hydroxylapatit existieren zahlreiche artifizielle Synthesewege. Einen Überblick liefert hierbei eine Veröffentlichung von Narasaraaju und Phebe [36], in der gängige nass- und trockenchemische sowie hydrothermale Herstellungsmethoden aufgezählt sind. Auch im Buch von Elliot [30] werden einige Verfahren geschildert, wobei dort in Kapitel 3.5 („Growth of hydroxyapatite single crystals“) Syntheseverfahren vorgestellt werden, die auf eine maximierte Kristallitgröße abzielen. Um HAP im Bereich einiger Kilogramm herzustellen bieten sich nasschemische Ausfällungsmethoden an, durch die feine Pulver entstehen (Korngröße zwischen einigen 10 und mehreren 100 nm). Andere Methoden haben andere Vorzüge, entweder verbesserte chemische Reinheit oder aber besondere strukturelle Eigenschaften (etwa besonders große oder kleine Kristallite, besonders einheitliche Korngrößenverteilung). Sofern Kontrolle über den Syntheseprozess vorhanden ist, gilt es im Einzelfall dasjenige Verfahren zu finden und anzuwenden, das für die anschließende Aufgabenstellung die besten physikalisch-chemischen Stoffeigenschaften liefert.

Syntheseverfahren zur direkten Erzeugung makroskopischer Kristalle in der Größenordnung von Zentimetern sind unbekannt. Der größte, direkt erzeugte Einkristall hatte Abmessungen von 3 mm × 3 mm × 7 mm und wurde unter hydrothermalen Bedingungen (großer Druck, Wasserdampfsättigung, hohe Temperaturen) erzeugt [30].

Die Kristallstruktur von HAP wird in der Literatur in zwei Modifikationen dargestellt, monoklin und hexagonal. Tabelle 2.1 zeigt die geometrischen Eigenschaften der zugehörigen Einheitszellen, wie sie beispielhaft aus zwei Veröffentlichungen entnommen wurden.

Tabelle 2.1: Vergleich publizierter kristallografischer Strukturmerkmale der HAP-Einheitszelle. Trotz der unterschiedlichen Eingruppierung durch verschiedene Autoren sind die Längen sehr ähnlich

	monoklin[37]	hexagonal[38]
a / Å	9,4214(8)	9,430(5)
b / Å	18,8428(16)	9,430(5)
c / Å	6,8814(7)	6,880(5)
∠ (a,b)	120,000(8)°	120,0(5)°

Die Unterschiede sind klein, so dass, obwohl von unterschiedlichen Strukturen die Rede ist, deren Abweichung voneinander je nach angewandeter Messmethode in den Fehlergrenzen der jeweils anderen Größenangabe aufgehen. Der Faktor zwei entlang der Richtung *b* resultiert aus den verschiedenen Definitionen der Kristallsymmetrien: Während monokline Kristallsysteme nach Definition keinerlei Bedingungen bei die Wahl der Raumrichtungen der Einheitszelle erfüllen müssen, ist im Falle der hexagonalen Struktur gefordert, dass die hier als *a* und *b* bezeichneten Seiten der Einheitszelle identische Länge besitzen.

An anderer Stelle wurde beschrieben, dass die Umwandlung beider Modifikationen ineinander durch Heizen oder Abkühlen geschehe und dass dieser Vorgang durch kalorimetrische (latente

Wärme) und Röntgenbeugungsmessungen (Verschiebung von Maxima im Spektrum) zu beobachten sei. In das Material eingelagerte Halogenidverunreinigungen seien aber bereits zu solchen Strukturänderungen imstande, dass die Möglichkeit zur Unterscheidung der beiden Modifikationen verneint wird, wenn nicht absolut reines Material vorliege. Die Niedrigtemperaturphase unterhalb etwa 200 °C sei hierbei die monokline Phase [39]. Haverty und Kollegen schließen in ihrer Studie von 2005 aus theoretischen Berechnungen, dass die vorbeschriebene Phasenunwandlung nicht durch eine Änderung der Kristallstruktur entstehe, sondern in einer Reorientierung der in der HAP-Struktur enthaltenen Hydroxidionen bestehe. Weiterhin kommen die Autoren zum Ergebnis, dass am Vorhandensein der hexagonalen Struktur Zweifel angebracht seien, da sie energetisch unvorteilhafter sei. Die hohe Symmetrie widerspreche auch einigen experimentellen Beobachtungen, die gemacht worden seien und deren Existenz niedrigsymmetrische Systeme voraussetzen würden. Es wird daher eine Koexistenz zweier monokliner Phasen vorgeschlagen, die sich durch eine gleichsinnige bzw. eine alternierende Anordnung der Hydroxidgruppen unterscheiden [40].

Die sich in allen Fällen ergebende Anisotropie hat Auswirkungen auf die Wechselwirkungen des Materials mit seiner Umgebung. So konnte anhand von HPLC-Untersuchungen gezeigt werden, dass die Proteinadsorption an unterschiedlichen Kristallitfacetten verschieden ausfällt, und zwar abhängig vom isoelektrischen Punkt der verwendeten Proteine, also ihrem elektrischen Ladungszustand [33]. Dies legt wiederum nahe, dass die an einer Kristalloberfläche wirkenden Kräfte abhängig von der betrachteten Kristallfacette sind.

### Zähne, Zahngewebe und Zahnoberflächen

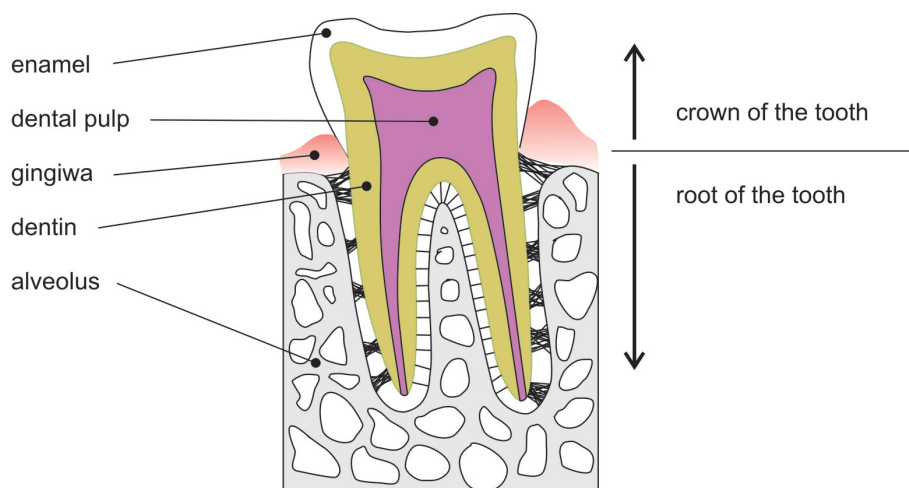


Abbildung 2.8: Schematischer Querschnitt durch einen einzelnen Zahn im Kieferknochen.

Die bisher dargelegten Eigenschaften von Oberflächen gelten natürlich speziell auch an Zahnoberflächen. Wie nachfolgend kurz dargestellt wird, hat Zahngewebe eine im Vergleich mit einer Si-Oberfläche deutlich größere Komplexität. Der Einfluss von Struktur und Zusammensetzung

des Gewebes auf oberflächliche Wechselwirkungen stellt sich daher komplizierter dar. Eine ausführliche Darstellung der Entstehung des Zahngewebes und seiner Struktur findet sich in Anhang A.

Am Aufbau der Zähne sind wesentlich zwei Materialien beteiligt: Zahnbein und Zahnschmelz. Zahnbein, auch **Dentin** genannt, ist dabei die weichere Substanz. Aus ihr bestehen die Zahnwurzeln und das Innere des Zahnorgans. Es ist vom Zahnschmelz leicht durch die im Gewebe vorhandenen Dentinkanäle zu unterscheiden.

Die äußere Schicht des Zahnes, der **Zahnschmelz** (engl. *enamel*), dient durch seine Härte als mechanische Schutzschicht. Es handelt sich um ein in hierarchischer Weise aufgebautes Material. Die kleinste Struktureinheit bilden nadelförmige HAP-Kristallite, die einen Durchmesser von einigen 10 nm haben und Längen von mehreren 100 nm besitzen können. Durch die Art ihrer Entstehung (Details dazu in Anhang A) verlaufen diese Kristallite in einem etwa 5  $\mu\text{m}$  durchmessenden, zylindrischen Raumbereich allesamt parallel zueinander. Dieser Gewebeanteil wird als prismatischer Schmelz bezeichnet. Parallel dazu verläuft ein Volumen, innerhalb dessen die Orientierung der Kristallite annähernd um  $90^\circ$  gedreht verläuft. Dieses Gewebe wird als interprismatischer Schmelz bezeichnet. Beide zusammen bilden ein **Zahnprisma**, innerhalb dessen die Kristallite über mehrere Millimeter Länge die parallele Orientierung beibehalten können. Die Zahnprismen zeigen untereinander ebenfalls einen parallelen Verlauf, weshalb sich prismatischer und interprismatischer entlang eines Schnittes durch den Schmelz in kurzen Abständen abwechseln.

Die nicht prismatisch strukturierte, nativ vorhandene Zahnoberfläche verändert sich durch den erosiven Einfluss der Mundflora und durch mechanische Beanspruchung. Entlang der Zahnoberfläche findet sich daher normalerweise<sup>9</sup> ein Schnitt durch die beschriebene dreidimensionale Prismenstruktur des Gewebes.

An Zahngewebe treten einige Effekte auf, die auf die chemische Zusammensetzung und die Struktur des Zahngewebes zurückzuführen sind. Anstatt der Calcium- und Hydroxidionen werden während des Wachstums leicht andere zweiwertige Metallionen oder Halogenidionen in den Schmelz eingebaut. Die zur Gewebsentstehung vorhandenen Konzentration eines Elements entscheidet dann über den Grad dieses Austausches, und so unterliegt die tatsächliche chemische Zusammensetzung des Zahnschmelzes unkontrollierten Schwankungen. Dazu trägt insbesondere die strukturelle Toleranz der Apatitstruktur bei, die beim Austausch einzelner Atome häufig erhalten bleibt. Das führt allerdings trotzdem zu Veränderungen in den Oberflächenwechselwirkungen, die durch die unkontrollierte chemische Zusammensetzung des Schmelzes zwischen verschiedenen Proben, ja sogar zwischen unterschiedlichen Stellen ein und derselben Probe variieren können [41].

Die geschilderte Struktur des Schmelzes besitzt je nach Größenordnung Auswirkungen auf die entlang einer Oberfläche wirkenden Kräfte: Auf makroskopischer Skala wirkt eine gemittelte Summe aus den an unterschiedlichen Stellen aufgrund der Kristallitorientierung verschiedenen Wechselwirkungen. Für sehr kleine Objekte hingegen (Proteine, nanoskalige Teilchen, Bakterien), deren Durchmesser nicht größer als die unterschiedlich strukturierten Bereiche sind,

---

<sup>9</sup>Siehe Anhang . Die ursprüngliche Oberfläche eines neu eruptierten Zahnes wird durch sehr regelmäßig angeordnete sog. Imbrikationsfurchen gebildet. Sie ist in den seltensten Fällen langfristig nachweisbar.

kann ein Teil der Oberfläche signifikant andere Eigenschaften besitzen als ein anderer. Dadurch verliert das Gewebe auf dieser Größenordnung seine Homogenität.

Zwischen den Kristalliten existieren in geringem Umfang organische Verbindungen aus der Wachstumsperiode des Gewebes. Neben den anorganischen Bestandteilen des Gewebes haben auch sie Einfluss auf die entlang der Oberfläche wirksamen Kräfte. Da es sich dabei um nicht näher bestimmte Bruchstücke größerer Moleküle handelt, ist über die wahre Zusammensetzung kaum etwas auszusagen. An der Gewebeoberfläche lokalisiert bewirken diese Proteine pH-Abhängigkeiten der Oberflächenladung. Auch sind die hervorgerufenen Dipolkräfte andere als im Falle der rein anorganischen Gewebephase. Die Konformation der Proteine ist abhängig von Ionenstärke und pH-Wert, so dass erwartet werden kann, dass an der Oberfläche adsorbierende Proteine von den Gewebeproteinen zumindest beeinflusst werden.

Die vorstehenden Aussagen verdeutlichen, dass die Kontrolle von Experimenten an Zahnschmelzoberflächen aus verschiedenen Gründen sehr schwierig oder gar unmöglich ist. Die vielfältigen Einflüsse der Bestandteile des Gewebes auf die Wechselwirkungen an der Oberfläche spielen eine zu große Rolle, so dass unterschiedliche Teilsysteme vom Gesamtsystem nicht zu isolieren sind. Daher können einzelne Parameter ohne Einfluss auf einen Zweiten kaum variiert und die spezifischen Einflüsse von Teilsystemen nicht gemessen werden.

## 2.5 Protein- und Biofilmbildung

Auf vielen Oberflächen kommt der Proteinfilmbildung eine besondere Bedeutung zu: Sie stellt den ersten Schritt bei der Entstehung von Biofilmen dar. In vielen technischen Anlagen, in denen diese Filme meist störend in Erscheinung treten, wird die Bildung eines Biofilmes mit dem negativ besetzten Begriff **Biofouling** bezeichnet. Beispielsweise gehören Wärmetauscher, in denen der aufgewachsene Film den Energieaustausch behindert, genauso zu betroffenen Systemen wie beispielsweise Schiffe, bei denen am Rumpf entstehende Besiedelungen mit Algen und Krustentieren den Strömungswiderstand erhöht. [42, 43].

In medizinischen Bereichen haben Biofilme ebenfalls Bedeutung, beispielsweise auf den oben vorgestellten Zahnoberflächen, aber auch entlang von Implantatoberflächen. Solche Biofilme enthalten häufig Bakterien, die für Infektionsprozesse verantwortlich sind. Ob und wie leicht ein Immunsystem solche in Biofilmen enthaltene Bakterien abtöten kann, hängt vom Entwicklungsgrad dieses Biofilmes ab. Dasselbe gilt für die Wirksamkeit von Antibiotika.

Die Entstehung eines Biofilms gliedert sich in mehrere Phasen. In aller Regel beginnt sie mit der bereits angesprochenen Bildung eines initialen, azellulären Proteinfilmes, der als Zwischenschicht zwischen dem Untergrund und sekundären Adsorbaten oder Mikroorganismen fungiert ([44, 45], vgl. Abbildung 2.9 A). Dabei sind es relativ leichte Moleküle, die aufgrund ihrer großen Diffusionsgeschwindigkeit zuerst die Oberfläche erreichen. Proteine unterliegen entsprechend der bereits gemachten Ausführungen sowohl gegenseitigen Wechselwirkungen als auch solchen mit ihrer Umgebung. Moleküle oder einzelne Teile in der Nähe einer Grenzfläche können je nach deren Eigenschaften entweder angezogen oder abgestoßen werden, beispielsweise durch entsprechende elektrische Ladungen. Hinzu kommt der Einfluss von Eigenschaften anderer an

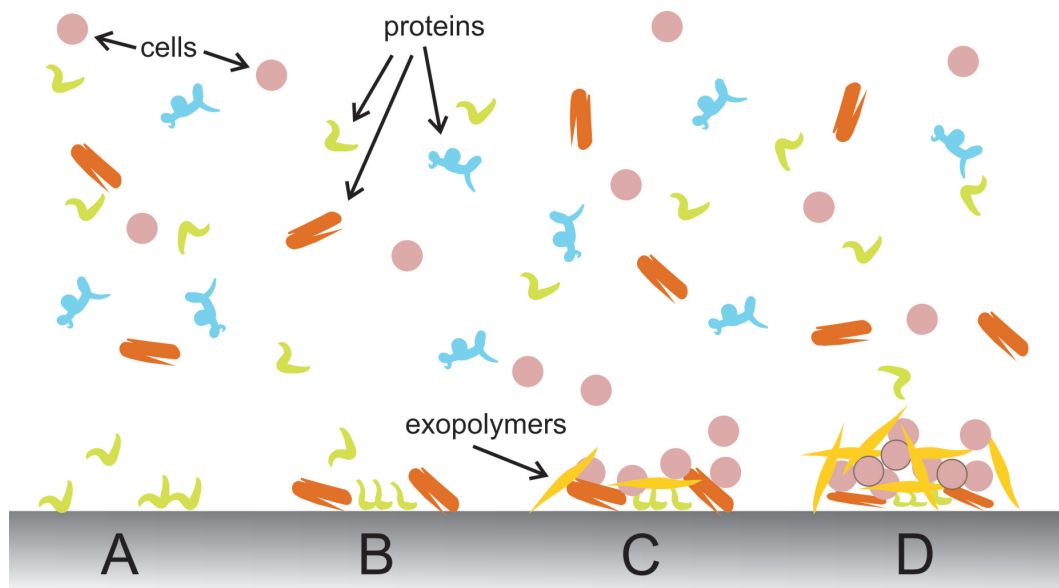


Abbildung 2.9: Schematische Darstellung der Entstehung eines bakteriellen Biofilms. A: Einzelne Proteinmoleküle adsorbieren an der Oberfläche; B: Weitere Moleküle adsorbieren entweder auf dem initialen Proteinfilm oder auf der Oberfläche, ggf. kompetitiv zu bereits vorhandenen; C: Erste Zellen adherieren auf dem Proteinfilm, wodurch sich deren Stoffwechsel ändert - es werden Exopolymere exprimiert; D: Ein herangereifter Biofilm ist entstanden.

Wechselwirkungen beteiligter Systemkomponenten, etwa der Einfluss im umgebenden Medium gelöster Ionen oder die Polarisierbarkeit dieses Mediums. Dass ein Proteinmolekül in Abhängigkeit von der angebotenen Oberfläche auf unterschiedliche Weise adsorbiert, wurde z.B. in einer Studie von Smith et al. nachgewiesen [46]. Unterschiedliche Adsorptionskinetiken von Proteinen auf chemisch gleichwertigen Oberflächen allerdings unterschiedlichem Schichtaufbau zeigen auch die Bedeutung langreichweitiger van-der-Waals-Wechselwirkungen für derartige Vorgänge [5, 47]. Bellion et al. machen in ihrer Arbeit [47] die filigranen Verhältnisse zwischen intermolekularen Kräften und solchen zwischen Grenzfläche und Protein für das beobachtete, schrittweise unterschiedliche Adsorptionsverhalten verantwortlich.

Nimmt die Dichte der Proteinmoleküle zu und wird dadurch ihr gegenseitiger Abstand kleiner, so bekommen die Wechselwirkungen dieser Moleküle untereinander eine immer größere Bedeutung für deren Verhalten. Welche Vorgänge entlang der Oberfläche dabei genau ablaufen, hängt von den sich anlagernden Proteinen und den Eigenschaften der Oberfläche ab. Hier kann es durch den stärker werdenden Einfluss der Proteine untereinander zu dadurch bedingten Konformationsänderungen kommen, oder die Moleküle drehen sich und orientieren in dicht gepacktem Zustand ein anderes Moleküle der Oberfläche entgegen (side-on- bzw. end-on-Orientierung) [19]. Auf der der Oberfläche abgewandten Seite eines annähernd geschlossenen Proteinfilms bilden diese Proteinmoleküle eine neue Grenzfläche, deren Eigenschaften von den Proteinen im Film und deren Konformation bestimmt wird. Wie im Abschnitt über Proteine ausgeführt wurde, können der pH-Wert der Lösung und die Ionenkonzentration entscheidenden Einfluss auf das Wechselwirkungspotential von Proteinen untereinander oder zu Grenzflächen nehmen. Hinzu kommt ein möglicher Einfluss der hydrophoben Wechselwirkung und eine dadurch bedingte starke konformatorische Änderung adsorbierter Proteine. Insgesamt wird die eigentliche Oberfläche zunehmend mit Proteinmolekülen überzogen, und der entstehende Proteinfilm besitzt i.a. andere Eigenschaften als die ursprüngliche nicht-bedeckte Oberfläche oder nur eine Schicht aus Proteinen, die sich nicht unter dem Einfluss einer Oberfläche verändert haben.

Je nach Art der adherierenden Proteine gibt es attraktive Kräfte zwischen diesen und weiteren Bestandteilen des auf oder über der Oberfläche befindlichen Mediums. Im nachfolgend geschilderten zweiten Stadium der Biofilmentstehung (vgl. Abbildung 2.9 B) lagern sich immer mehr dieser Bestandteile an der Oberfläche an. Es kann auch zu kompetitiven Vorgängen zwischen Bestandteilen des initialen Proteinfilms kommen, wenn die Adsorption zur ursprünglichen Oberfläche größer ist als die leichterere Bestandteile. Welche Prozesse hier genau ablaufen, ist sehr stark von der Zusammensetzung des Systems abhängig.

Planktonische zelluläre Bestandteile des überstehenden Mediums können sich an der Proteinoberfläche anlagern (Abbildung 2.9 C). Das sind je nach Umgebung z.B. Algen, Zellen oder Bakterien. Der bereits auf der Oberfläche befindliche Proteinfilm beeinflusst durch die Veränderung der Oberflächenchemie das Adhäsionsverhalten dieser zellulären Bestandteile.

Adherierende Bakterien und andere Zellen können in adhäsivem Kontakt mit einer Oberfläche ihren Stoffwechsel umstellen und z.B. sog. **Exopolymere** ausschütten (gelb in Abbildung 2.9 C und D), die die eigene oder die Anlagerung weiterer Bakterien fördern. Durch die Freisetzung derartiger Substanzen werden Bakterienkolonien auf Oberflächen außerdem stabilisiert. Damit ist die Reifung eines **Biofilmes** abgeschlossen, der sich nicht nur durch die Anwesenheit

biologischer Materialien sondern auch durch in ihm enthaltene lebende Zellen und deren Stoffwechselftigkeit auszeichnet. Der weitere Charakter und die Vorgänge innerhalb des Biofilms sind erneut stark abhängig von der Zusammensetzung des Biofilms.

Pathologisch treten bakterielle Biofilme bei Infektionen auf, wo die vorab beschriebenen Vorgänge zu einem starken Wachstum einer Bakterienkolonie führen können. Dabei teilen sich die adherierten Bakterien und bilden große Kolonien, sog. **Konsortien**, deren Angreifbarkeit wegen einer verminderten Wirksamkeit des Immunsystems oder von Antibiotika sehr gering ist. Die in Biofilmen enthaltenen Organismen können regelrecht kooperatives Verhalten und Zeichen von Differenzierung entwickeln [48].

### Biofilme auf Zahnschmelz

Die vorab geschilderten Eigenschaften und Entstehungsszenarien von Biofilmen gelten im speziellen natürlich auch in der Mundhöhle und auf Zahnoberflächen. Es zeigt sich dabei, dass die speziellen Eigenschaften des Zahngewebes und seine chemische Zusammensetzung hauptsächlich aus Hydroxylapatit für die Vorgänge an der Oberfläche besondere Bedeutung haben. Die Oberfläche der Zähne im Mund ist in ständigem Kontakt mit dem **Mundspeichel** und darin enthaltenen Proteinen und Mikroorganismen, so dass sich die Zahnoberfläche im Laufe der Zeit mit der **Plaque**, einem Biofilm, überzieht. Der Zahn ist insofern ein System, an dem die vorab allgemein vorgestellte Biofilmbildung stattfindet. Eine ausführliche Darstellung der Vorgänge insbesondere unter oberflächenphysikalischen Gesichtspunkten ist in dem Buchbeitrag von Arnebrant [49] verfügbar.

Durch Untersuchungen und Vergleich der Proteinadsorption auf Gold- und Hydroxylapatitoberflächen konnten für diese Vorgänge signifikante Unterschiede festgestellt werden [50]. Die Beobachtungen dabei belegen, dass Hydroxylapatit als Substrat auf adsorbierende Proteine einen speziellen Einfluss haben kann. Wie bei den kristallografischen Eigenschaften bereits aufgezeigt wurde, besitzt HAP anisotrope Eigenschaften zwischen unterschiedlichen Kristallrichtungen. Kandori konnte durch Adsorptionsexperimente zeigen, dass Proteine auf unterschiedlichen Kristallitfacetten synthetischen HAPs unterschiedliches Adsorptionsverhalten zeigen [51]. Molekulardynamik-Simulationen von Proteinen in der Nähe von HAP-Oberflächen von Shen et al. zeigen weiterhin, dass die geladene Oberfläche von HAP bevorzugt mit geladenen oder polaren Gruppen innerhalb des Proteinmoleküls interagiert [52]. Diese Spezifität ist im Gegensatz zu bisher untersuchten Modelloberflächen ein Unterschied. Der Anteil dieser Interaktion an der gesamten Wechselwirkungsenergie des Moleküls mit der HAP-Oberfläche betrage demnach mehr als 90%, und entsprechende Bedeutung muss dem Ladungszustand von Oberfläche und Protein bei der Adsorption eines Proteinmoleküls auf einer HAP-Oberfläche eingeräumt werden. Ein ähnliches Ergebnis liefern zwei weitere theoretische Veröffentlichungen von Rimola et al. [53, 54], in denen mit Hilfe quantenmechanischer Simulationen das Adsorptionsverhalten der Aminosäure Glycin auf einer HAP-Oberfläche untersucht wurde. Dabei sind es wiederum die pH-aktiven und somit geladenen Gruppen des Moleküls, die die stärksten Bindungen erzeugen.

Mundspeichel, aus dem ein Großteil der in der Mundhöhle verfügbaren Proteine stammt, ist eine komplizierte Mischung unterschiedlichster Proteine und Proteasen in wässriger Lösung,



beispielsweise Amylase, Lysozym und Serumalbumin, um nur drei zu nennen. Beim Menschen wird er in mehreren um den Mund herum angeordneten Drüsen gebildet, von denen die größten die Ohr- und die Unterzungspeicheldrüsen sind. Eine unvollständige Übersicht der enthaltenen Substanzen liefert die schematische Darstellung in Abbildung 2.10, aus der auch grob die Funktion der enthaltenen Stoffe hervorgeht.

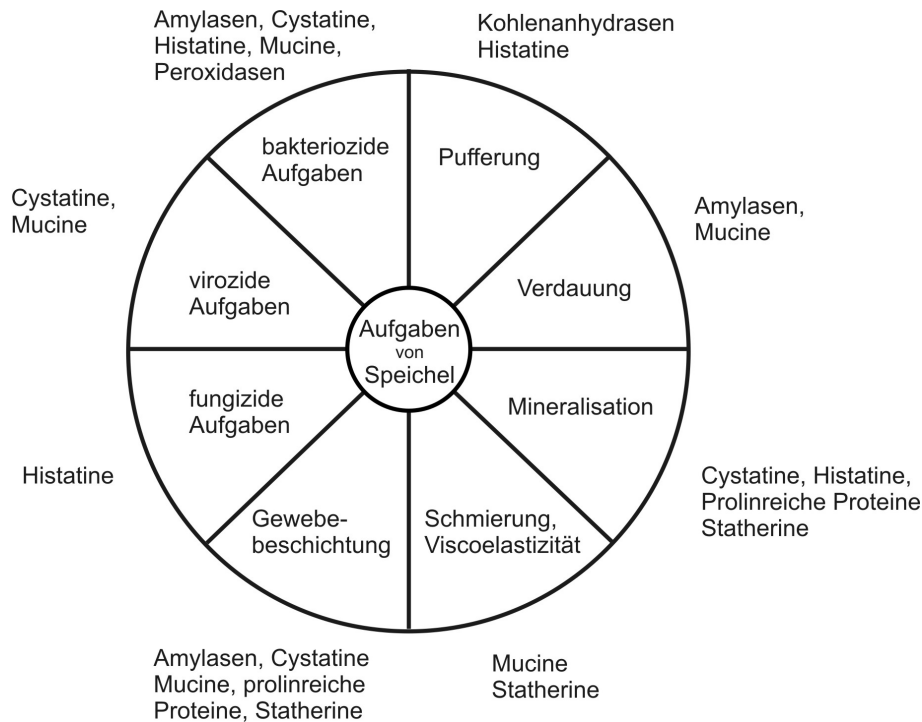


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der Zusammensetzung von menschlichem Speichel und der Aufgaben, die die einzelnen Komponenten ausüben [55].

Der erste Schritt bei der oralen Biofilmbildung ist die Entstehung des sog. **Pellikel**, also dem initialen, azellulären Proteinfilm, der eine saubere Oberfläche eines Zahnes innerhalb weniger Minuten bedeckt [44, 45]. Die chemische Zusammensetzung des Pellikels verändert sich mit der Zeit: Initial besteht es zum Großteil aus leichten Molekülen, die aufgrund ihrer relativ großen Diffusionsgeschwindigkeit die Oberfläche schnell bedecken. Mit der Zeit dominieren dann aber größere Moleküle, die eine stärkere Bindung zur Oberfläche aufweisen. Wegen der unterschiedlichen Eigenschaften der jeweils adherierten Moleküle verändert die Oberfläche entsprechend ihre Eigenschaften. Die Änderung bereits einer einzelnen Aminosäure eines Proteinmoleküls kann übrigens während der Adsorption zu geänderten Adsorptionskinetiken führen [56]. Dies betont erneut den starken Einfluss, den die Primärstruktur der Proteine auf ihr Verhalten hat.

An der Bildung des oralen Pellikels initial beteiligte Proteine sind unter anderem Lysozym, Amylase, Cystatine, Albumin und prolinreiche Proteine (PRPs). Lysozym kann  $\beta$ -(1,4)-glycosidische Bindungen spalten, wie sie in den bakteriellen Zellwänden in den Peptidoglykanschichten vorkommen, wodurch es eine antibakterielle Wirkung und Bedeutung hat. Amylase

kann  $\alpha$ -(1,4)-glycosidische Bindungen spalten und spielt deswegen eine besondere Rolle in der Verdauung von Stärke und anderer Polysaccharide. Cystatine wirken als Cysteinproteinase-Inhibitoren. Sie binden an HAP-Oberflächen und hemmen dadurch das Wachstum von HAP-Kristallen [57]. PRPs sind im Gegensatz zu den drei zuvor genannten Molekülen nicht globulär, sondern ungefaltet. Sie bestehen aus einer N-terminalen phosphorylierten Domäne, die zu einer Wechselwirkung mit der HAP-Oberfläche in der Lage ist. Das C-terminale Ende hingegen kann eine bakterielle Adhäsion begünstigen. PRPs sind darüberhinaus auch in der Lage ein Ausfallen von Calciumsalzen oder ein Kristallwachstum in einer entsprechenden Lösung zu verhindern [58], wodurch sie eine gewisse Ähnlichkeit zu Caseinmolekülen in Milch zeigen, die Calcium binden und durch die Bildung von Mizellen auch in Lösung halten können. Im Mund hat die Anwesenheit der PRPs daher einen Einfluss auf die Regulation der freien Calciumkonzentration, was bei allen Arten von Mineralisationsprozessen von Bedeutung sein kann [59].

All die im Speichel befindlichen Proteine können nicht nur mit der Oberfläche des Zahnschmelzes interagieren, sondern auch miteinander. So sind z.B. Proteinkomplexe aus PRP und Albumin beobachtet worden. Proteinmoleküle können außerdem Multimere bilden. In hinreichend hoher Konzentration gilt dies z.B. für Lysozym und Albumin. Schlussendlich können auch Substanzen anderer Stoffklassen für bestimmte Wechselwirkungen und Komplexbildungen verantwortlich sein: Lipide beispielsweise kommen in unterschiedlichen Bindungsverhältnissen je nach Speicheldrüse vor [49].

Die Oberfläche von Zahnschmelz besteht aus HAP als mineralischer Komponente, das in eine organische Matrix unter anderem aus Wasser, Amelogenin, Enamelin und Proteasen eingebettet ist [60]. Diese komplizierte Umgebung und ihre Eigenschaften sind in erheblichem Maße von den genauen Umgebungsbedingungen abhängig: Das mineralische Material ist je nach Zusammensetzung unterschiedlich geladen.  $\zeta$ -Potentialmessungen liefern für Zahnschmelz einen isoelektrischen Punkt (IEP) bei pH 4,4 - 5. Dieser Wert differiert signifikant von der synthetisch gewonnenen, reinen Phase von HAP, die zwischen pH 7,5 und 7,6 ungeladen ist. Wird reines Fluorapatit untersucht, so liegt dessen IEP zwischen pH 4 und 6 [61]. Der IEP von Zahnschmelz zeigt im Vergleich mit den anderen Werten für die synthetischen Materialien bereits, dass sich Zahnschmelz grundsätzlich anders verhält und ein direkter Vergleich daher schwierig ist. Neben der mineralischen Phase sind auch die Eigenschaften der organischen Materials entlang der Oberfläche stark von den Umgebungsbedingungen abhängig. Wie vorher dargelegt wurde, unterliegt der Ladungszustand auch der Proteine einer pH-abhängigen Variation. Der IEP, der für die Zahnschmelzoberfläche angegeben ist, ergibt sich aus dem Einfluss der Ladung der mineralischen Phase und der organischen Matrix. Welche Konsequenzen für von der Oberfläche ausgehende Wechselwirkungen bestehen, hängt darüberhinaus von der Konzentration freier Ladungsträger ab, die sich im Speichel befindet. Da sich das mineralische HAP-System im Mund in einer steten Abfolge von De- und Remineralisation befindet, ist auch die Ionenstärke von Speichel starken Schwankungen unterworfen.

Eine Zahnoberfläche zeigt in der Regel eine gewisse Strukturierung, wie sie in Anhang A dargestellt wird. Auch diese Struktur kann einen Einfluss auf von der Oberfläche ausgehende Wechselwirkungen besitzen, beispielsweise bereits durch unterschiedliche Wechselwirkungen entlang unterschiedlicher Kristallorientierungen des mineralischen Materials.

Der entstehende initiale Proteinfilm ist nach derzeitigem wissenschaftlichen Verständnis einerseits an der Entstehung vieler Erkrankungen des Gebisses beteiligt, unter anderem die Bildung von Karies. Andererseits kann er allerdings auch antibakteriell wirken, nämlich indem Lysozym in aktiver Konformation auf der Oberfläche gebunden ist und adherierende Bakterien angreift [1].

Der Mechanismus der Kariesentwicklung wird dabei wie folgt verstanden: Auf der Zahnoberfläche haben nach der Bildung eines initialen Proteinfilms Bakterien gute Möglichkeiten zum Adhieren. Die Proteine Amylase und Mucin beispielsweise haften gut an der Schmelzoberfläche und fungieren für Bakterien sogar als spezifischer Rezeptor [1]. Im Speichel enthaltene Bakterien können auf derartig belegten Oberflächen adherieren. Bei der Nahrungsaufnahme gelangen Kohlenhydrate in den Mundraum, die von den an den Zähnen anhaftenden Bakterien verstoffwechselt (oxidiert) werden können. Die dabei als Stoffwechselprodukte auftretenden Säuren senken den pH-Wert in der Mundhöhle ab, so dass die Löslichkeit des mineralischen Hydroxylapatits ansteigt. Lokal kommt es dabei auf der Schmelzoberfläche zu Bereichen herabgesetzten Mineralgehalts. Die immer wiederkehrende Absenkung des pH-Wertes durch den Bakterienstoffwechsel verursacht schließlich signifikante Schäden am Zahnschmelz, indem auf das Lösungsgleichgewicht von Hydroxylapatit Einfluss genommen wird [62].

## 2.6 Wechselwirkung von Zahnoberflächen mit Proteinen und Bakterien

Die undefinierten chemischen Verhältnisse in der Mundhöhle und die komplizierte Struktur des Zahngewebes führen zu Problemen bei der Präparation definierter experimenteller Bedingungen. Hierzu einige Beispiele:

- Die Struktur einer Zahnoberfläche und des Zahnschmelzes sind genetisch bestimmt<sup>10</sup>. Ernährungsgewohnheiten, individuelle Abnutzung, Schwankungen beim Wachstum und zufälligen Schäden führen allerdings zu unterschiedlichen Ausprägungen, so dass die tatsächlich vorliegende Oberfläche einen höchst individuellen und annähernd zufälligen Aufbau besitzt. Da Hydroxylapatit entlang unterschiedlicher Kristallachsen unterschiedliche Wechselwirkungen aufweist [33], ist eine grundlegende Beschreibung einer natürlichen Zahnoberfläche kompliziert, denn die geringe Größe der Strukturen lässt kaum eine orts aufgelöste Charakterisierung der Oberfläche zu, die aber aufgrund der bekannten spezifischen Wechselwirkungen des HAP mit Proteinen angezeigt ist.
- Unterschiedliche Zahnflächen und Zahnpositionen erfahren aufgrund verschiedener Exposition und Nutzung unterschiedliche Beeinflussung. Die Zahnstruktur variiert somit zwischen unterschiedlichen Zähnen oder gar unterschiedlich orientierten Flächen ein und desselben Zahnes. Als Beispiel sei hier die unterschiedliche Abnutzung der Kauflächen im Vergleich zu den Zahnzwischenräume an einem Mahlzahn genannt.

---

<sup>10</sup>Eine genetische Abhängigkeit ist bei der Zahngewebbildung gegeben aufgrund des Einflusses der an der Gewebbildung beteiligten Proteine. Durch Selbstorganisation wird durch sie eine Strukturvorgabe gebildet, die die Struktur des Zahngewebes beeinflusst.

	anziehend	abstoßend
kurzreichweitig ( $d < 1 \text{ nm}$ )	Hydrophobe WW chemische Bindungen (kovalent, ionisch) WW durch Wasserstoffbrücken	Born-Abstoßung
langreichweitig ( $d > \text{ca. } 100 \text{ nm}$ )	Coulomb-WW van-der-Waals-WW Dipol-WW	Coulomb-WW

Tabelle 2.2: An einer Zahnoberfläche relevante Wechselwirkungen (WW), unterschieden nach Repulsion und Attraktion, nach kleiner oder großer Reichweite [1].

- Der Verzicht auf die natürliche Oberfläche zugunsten einer geschliffenen Geweboberfläche ändert nichts an den bereits genannten strukturellen Problemen bei der Nutzung der Gewebeprobe als Modellmaterial zur Charakterisierung von Wechselwirkungen, denn die Prismenstruktur des Zahnschmelzgewebes zeigt auch in seinem Inneren die geschilderte, hochkomplexe Struktur.
- Der Fluoridgehalt im Zahngewebe ist abhängig von der Fluoridkonzentration im Organismus zum Zeitpunkt der Gewebsentstehung [63]. Die chemische Zusammensetzung des Zahngewebes variiert damit zwischen Zähnen und unterschiedlichen Zahnflächen eines Zahnes. Sie variiert außerdem auch noch entlang der Wachstumsrichtung und spiegelt damit den zeitlichen Verlauf der während des Gewebswachstums vorhandene Fluoridkonzentration wieder. Eine äußerliche Anwendung nach Abschluss der Gewebsentstehung führt zu einem hohen Fluoridgehalt im Oberflächenbereich. Der Fluoridgehalt ist damit höchst variabel und im Vorhinein nicht generell bestimmbar.

Daher ist eine Beschreibung eines Adhäsions- oder Adsorptionsvorganges oder gar der Bildung eines Biofilms auf einer Zahnoberfläche ein nicht-triviales Unterfangen. Die individuelle Struktur, in der das Gewebe vorliegt, müsste für eine quantitative Untersuchung zunächst umfassend charakterisiert werden, und zwar sowohl in chemischer als auch in morphologischer Hinsicht. Welche Komponente(n) des Gewebes sind an einer Wechselwirkung aktuell bezeichnet? Beeinflussen sich diese Wechselwirkungen gegenseitig? Zu diesen Fragen gesellt sich im physiologischen Falle die komplexe Umgebung der Mundhöhle, in der sich das Gewebe befindet. Allein Speichel besteht aus einigen Dutzend Komponenten, deren Wirkung und gegenseitige Beeinflussung die Beschreibung von Grenzflächenvorgängen am Zahnschmelz sehr erschwert [55].

Trotz aller Komplexität bei der Beschreibung von Adsorptionsvorgängen auf einer Zahnoberfläche kann zunächst davon ausgegangen werden, dass wie bei einer sehr einfachen Modelloberfläche eine Beschreibung im Rahmen der DLVO-Theorie zulässig ist: Die Adsorbate (z.B. Proteinmoleküle) befinden sich in einem effektiven Potential der Oberfläche, das sowohl abstoßende als auch anziehende Kräfte berücksichtigt. Weiterhin sind kurzreichweitige von langreichweitigen Kräften zu unterscheiden. Einen Überblick bietet Tabelle 2.2. Die vorhandenen Wechselwirkungen sorgen für ein bestimmtes Wechselwirkungspotential einer Zahnoberfläche. Neben der ggf. auftretenden gegenseitigen Beeinflussung dieser Wechselwirkungen ist es insbe-

sondere die komplizierte Struktur der Zahnoberfläche und ihre chemische Zusammensetzung, die die Bestimmung dieses Potentials entlang der Oberfläche erschwert. Dazu zwei Beispiele:

- Die Rauigkeit der Zahnoberfläche und die chemischen Variationen des Gewebes sind nur mit großen Aufwand zu bestimmen. Sie spielen aber ggf. für Adhäsions- und Adsorptionsprozesse eine wichtige Rolle. Das Oberflächenpotential ist abhängig von chemischer Zusammensetzung und Morphologie, so dass zur Beschreibung beides entlang der Oberfläche bestimmt werden muss.
- Im Gewebe enthaltene Proteine ändern in erheblichem Maße die von einer Oberfläche ausgehenden Wechselwirkungen. Diese können außerdem von weiteren Größen abhängig werden, oder eine gegebene Abhängigkeit verändert sich durch die Anwesenheit der Proteine. Da beispielsweise der Ladungszustand eines Proteins pH-abhängig ist, kann eine proteinhaltige Oberfläche ihren Ladungszustand ändern, selbst wenn dies bei Vernachlässigung der Proteine nicht der Fall wäre. Das resultierende Oberflächenpotential variiert hierdurch in entsprechend komplizierter Weise. Die Zahl der Abhängigkeiten von äußeren Parametern steigt somit an.

Selbst falls reklamiert wird, dass die Relevanz eines vereinfachten Probensystems für die medizinische Alltagsarbeit gering sei [1], so ist doch aus physikalischer Sicht der Versuch der exakten Beschreibung einer natürlichen Zahnoberfläche ohne vorhergehende Charakterisierung der sie aufbauenden Komponenten zum Scheitern verurteilt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der Struktur und der chemischen Eigenschaften des Zahngewebes der Verwendung einer natürlichen Gewebeprobe eine aufwändige Charakterisierung dieser Probe vorauszugehen hätte. Der Erkenntnisgewinn allein aus der Verwendung der natürlichen Probe für eine zukünftige Modellierung der Oberflächenvorgänge ist als gering einzuschätzen. An der komplizierten Zahnoberfläche gibt es für die sinnvolle Durchführung von Messungen zuviele nicht-kontrollierte Parameter, so dass selbst bei hinreichender Charakterisierung der Probe die quantitative Beschreibung aller oberflächlichen Vorgänge und ihrer gegenseitigen Beeinflussung derzeit unmöglich ist.

Um trotzdem Experimente mit größerem Bezug zu dem natürlichen Gewebe durchführen zu können, kann ein Ansatz in der Verwendung synthetischer Proben bestehen, die einige wenige Eigenschaften des Zahngewebes nachstellen. Zahnschmelz besteht zum Großteil aus HAP, so dass ein naheliegender Schritt zur experimentell kontrollierten Simulation eines Zahnes in der Verwendung einer HAP-Probe besteht. Alle anderen Bestandteile des Zahngewebes können in einem ersten Ansatz vernachlässigt werden, denn sie bedingen strukturell und chemisch weit größere Anforderungen als die Verwendung des anorganischen Zahnmaterials alleine. Auch Carbonatanteile können in einem ersten Schritt vernachlässigt werden.

Naheliegende Anforderungen für synthetische Ersatzproben können wie folgt lauten:

- **Die Modellprobe soll aus Hydroxylapatit bestehen.**  
Die Probe sollte bezüglich der chemischen Zusammensetzung dem Zahngewebe möglichst ähnlich sein. Das ist nach der vorangehenden Argumentation offenbar näherungsweise der Fall.

- **Die Probe soll in ihrer Struktur einfach und beeinflussbar sein und dabei eine hohe Dichte besitzen.**

Die Untersuchung von Oberflächenwechselwirkungen wird durch eine möglichst homogene Oberfläche frei von Poren, Stufen etc. vereinfacht. Eine Facette eines Einkristalls besitzt derartige Eigenschaften. Makroskopische Einkristalle sind allerdings aus Hydroxylapatit nur schwierig herzustellen.

- **Es sollen keine Halogenide enthalten sein.**

Um mit Hilfe der Proben auch den Effekt der Fluorierung von HAP zu untersuchen, ist ein kontrollierter Fluoridgehalt, aber auch ein geringer Anteil von anderen Halogeniden notwendig. Um Vergleichsmessungen vor bzw. nach einer Fluorierung zu erlauben, sollten daher keine oder nur sehr wenige Halogenide enthalten sein.

- **Die Probe soll kontrolliert und reproduzierbar herzustellen sein.**

Diese Anforderung stellt sicher, dass auch bei der Verwendung mehrerer Proben grundsätzlich gleiche Ergebnisse zu erwarten sind.

Mit Hilfe synthetischer Proben kann im Prinzip den am natürlich gewachsenen Gewebe auftretenden größten Problemen ausgewichen werden. Der Einfluss eingebauter Proteine auf Oberflächenvorgänge ist nicht vorhanden, und ebenso wenig spielt deren Beeinflussbarkeit durch den pH-Wert eine Rolle. Gelingt es, die Untersuchung auf einer synthetischen Oberfläche auf hinreichend großen einkristallinen Oberflächen durchzuführen, so sind die Oberflächenvorgänge auch nicht mehr durch unterschiedliche Kristallitorientierungen beeinflusst.

Zwar muss für eine Übertragung der Ergebnisse der Messungen an Pellets auf reale Zahngebe auch der Einfluss der anderen Gewebebestandteile berücksichtigt werden, es ergibt sich jedoch die Möglichkeit, ein völlig kontrolliertes System in genau definierten Bedingungen zu untersuchen. Das resultiert in einem grundlagenwissenschaftlichen Ansatz, der eine schrittweise Anpassung des Messsystems in Form zunehmender Komplexität erlaubt. Einfluss und Wechselwirkung jeder einzelnen Komponente des natürlichen Gesamtsystems mit den anderen Komponenten werden prinzipiell zumindest zugänglich und messbar.

Herstellung und Charakterisierung den obigen Anforderungen entsprechender synthetischer Hydroxylapatit-Pellets sind in den nachfolgenden Kapiteln dieser Arbeit dargestellt. Für die Proben sind außerdem Anwendungsbeispiele gezeigt, in denen anhand von Experimenten Eigenschaften von Hydroxylapatit herausgestellt werden. Das betrifft im nächsten Kapitel beispielsweise die Verteilung von Fluorid nach der Anwendung auf eine HAP-Peltoberfläche.

## 3 Allgemeines zu den angewendeten Messmethoden

### 3.1 Photoelektronenspektroskopie – XPS

#### Grundlagen

Das Verfahren der Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (kurz: XPS, engl. *X-ray Photoelectron Spectroscopy*) beruht auf dem photoelektrischen Effekt: Bestrahlt man einen Festkörper mit elektromagnetischer Strahlung ausreichend hoher Energie  $h\nu$ , so können Elektronen des Festkörpers soweit angeregt werden, dass sie diesen unter Überwindung der Austrittsarbeit  $\Phi_a$  verlassen. Befindet sich die Probe dabei in einem Vakuum ausreichender Güte, so erlaubt die daraus resultierende, große freie Weglänge der Elektronen nach Verlassen des Festkörpers die Analyse ihrer kinetischen Energie  $E_{\text{kin}}$ . Bei Verwendung einer bestenfalls monochromatischen Röntgenquelle bekannter Energie (Synchrotronstrahlung, charakteristische Röntgenstrahlung) lässt die Analyse die Bestimmung der jeweiligen Bindungsenergie der Elektronen vor der Anregung zu. Zugrunde liegt hierbei die photoelektrische Gleichung nach Einstein

$$E_{\text{kin}} = h\nu - E_0 \quad (3.1)$$

Die Energieskala wird an der Fermi-Energie zu Null definiert. Im einfachen Fall eines metallischen Festkörpers sind kernnahe Rumpfelektronen bezogen auf die Energieskala unterhalb der Valenzelektronen und der Fermienergie zu finden, sie liegen energetisch somit im Negativen. Die Differenz von Fermienergie und potentieller Energie eines Elektrons wird als seine Bindungsenergie  $E_B$  definiert. Zum Verlassen des Festkörpers ist über die Fermienergie hinaus noch eine Austrittsarbeit  $\Phi_a$  aufzubringen, mit der das Elektron dem attraktiven Regime des Festkörpers entflieht. Die Austrittsarbeit ist dabei eine Stoffkonstante, die abhängig vom Probenmaterial ist.

Auf der Detektorseite ist das Energieniveau der Austrittsarbeit  $\Phi_a^{\text{Analysator}}$  im Allgemeinen unterschiedlich von demjenigen auf der Probenoberfläche  $\Phi_a$ . Die vom Detektor registrierte kinetische Energie eines Elektrons  $E_{\text{kin}}^{\text{Analysator}}$  weicht daher um einen konstanten Betrag von der tatsächlichen Energie beim Austritt aus der Oberfläche ab. Der Energiebetrag lässt sich allerdings leicht bestimmen, da ähnlich der Verhältnisse bei der Probenaufladung (s.u.) Linienintensität und -lage relativ zueinander erhalten bleiben.

Nicht-leitende Materialien laden sich durch das sukzessive Entfernen von Elektronen aus dem Festkörper zunehmend positiv auf. Elektronen erfahren beim Austritt aus der Probe daher eine mit der Zahl der emittierten Elektronen kontinuierlich zunehmende, anziehende Kraft, die vom aktuellen Ladezustand der Probe abhängig ist. Die attraktive Kraft wirkt auf Elektronen egal welcher kinetischen Energie gleich, so dass die resultierenden Spektren um einen Energiewert  $E_C$  hin zu höheren Bindungsenergien verschoben werden. Anhand der relativen Lage der

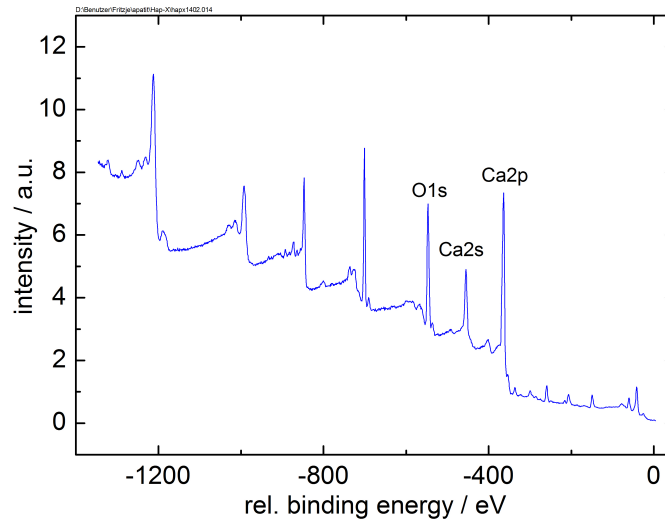


Abbildung 3.1: Übersichtsspektrum einer HAP2-Probe. Beginnend bei der Fermi-Energie  $E_F$  (definitionsgemäß bei relativer Bindungsenergie  $E_B = 0$ ) am rechten Rand werden bei abnehmender relativer Bindungsenergie  $E_F - E_B$  die Rumpfelektronen-Niveaus der in der Probe enthaltenen Elemente sichtbar. Die Fe-2p-Linie wird durch den Probenhalter erzeugt.

Maxima zueinander und der (unter Verschiebung invarianten) Intensität der Linien lassen sich die einzelnen Beiträge der in der Probe enthaltenen Elemente dennoch bestimmen.

Die einzelnen Energiebeiträge werden anhand des in Abbildung 3.2 dargestellten Energie-Diagramms verdeutlicht. Der Energiebetrag  $E_0$  aus Gleichung 3.1 setzt sich aus den vorgeannten Beträgen zusammen, so dass am Analysator gilt:

$$h\nu = E_{\text{kin}}^{\text{Analysator}} + E_B + \Phi_a^{\text{Analysator}} \quad (3.2)$$

Elektronen, die sich mit einer gegebenen Energie durch einen Festkörper bewegen, können inelastisch mit weiteren Elektronen oder Atomrümpfen zusammenstoßen. Die Häufigkeit dafür hängt u.a. von der Länge der Strecke ab, die ein Elektron innerhalb eines Festkörpers zurücklegt. Elektronen maximal möglicher kinetischer Energie nach Gleichung 3.2 stammen daher zum größten Teil nur aus einer dünnen Oberflächenschicht des Festkörpers. Elektronen, die durch einen Stoßvorgang Energie verloren haben, werden lediglich als Untergrundintensität bei höheren Bindungsenergien erfasst. Aus diesem Zusammenhang resultiert die große Oberflächenempfindlichkeit der XPS.

Die große Oberflächenempfindlichkeit bedingt allerdings ebenfalls die Empfindlichkeit auf nicht zur Probe gehörender, allerdings darauf sitzender Verunreinigungen. Solche **Adsorbate** sind in Ultrahochvakuum-Anwendungen keine Seltenheit und ein bekanntes Phänomen. Die Verunreinigungen können durch Sputtern oder Heizen der Probe beseitigt werden. Verbreitete Adsorbate sind z.B. Kohlen-Wasserstoff-Verbindungen, Wasser und Kohlenstoffmonoxid.



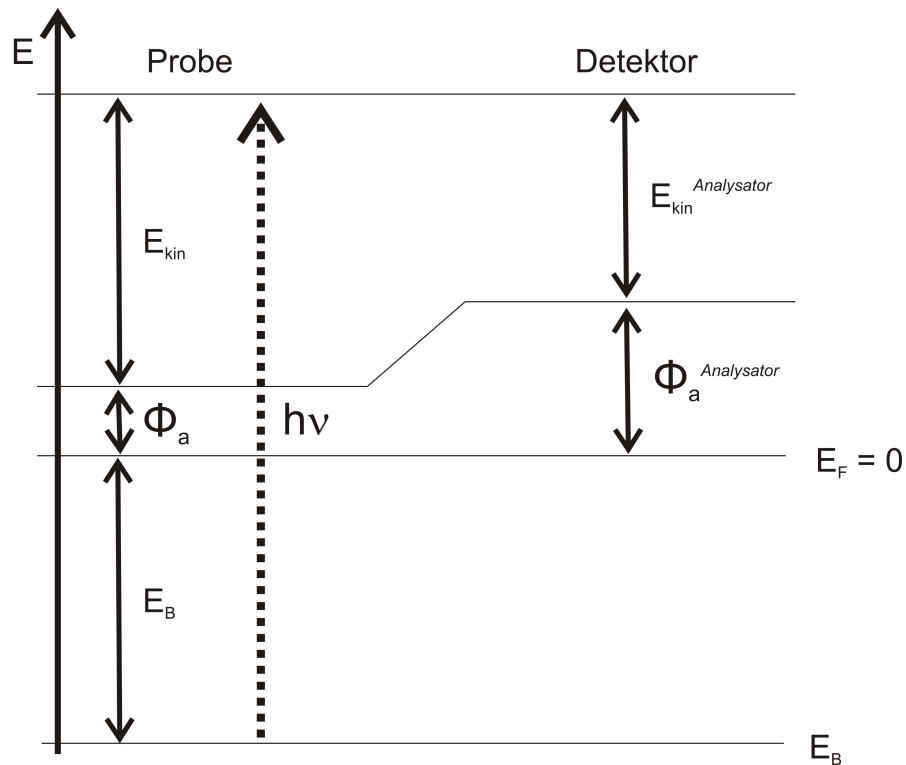


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der energetischen Verhältnisse während einer XPS-Spektroskopie. Durch die Anregung  $h\nu$  wird ein Elektron mit Bindungsenergie  $E_B$  auf eine bestimmte kinetische Energie angehoben. Bei der Messung am Analysator wird eine von der dortigen Austrittsarbeit abhängige kinetische Energie gemessen.

## ESCA - Chemische Analyse mit Hilfe von XPS

Die Abkürzung ESCA steht für den englischen Begriff *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*. Aus der Lage der Maxima im XPS-Spektrum lassen sich die Bindungsenergien der Rumpfelektronen und damit die in einer Probe enthaltenen Elemente bestimmen. Um auch die atomaren Anzahlverhältnisse der enthaltenen Elemente und damit weitgehende Aussagen zur chemischen Zusammensetzung der Probe treffen zu können, werden aus den Spektren die Intensitäten der gemessenen Maxima bestimmt, die durch die Fläche unterhalb der Maxima gegeben ist. Nach Abzug des Untergrundes ist die gemessene Intensität  $I$  einer solchen Spektrallinie proportional zu einer Reihe von Parametern:

$$I \propto n \cdot \sigma \cdot (E_{\text{kin}})^{\alpha_1 \alpha_2} \quad (3.3)$$

Dabei ist  $n$  die Zahl der Atome und  $\sigma$  der spezifische Wirkungsquerschnitt für den Photoemissionsprozess des jeweiligen Orbitals eines bestimmten Elements.  $E_{\text{kin}}$  ist die kinetische Energie, mit der sich ein Elektron innerhalb des Festkörpers bewegt. Die darauf wirkenden Exponenten  $\alpha_1$  und  $\alpha_2$  berücksichtigen eine nicht-lineare Abhängigkeit der gemessenen Intensität von der Energie des Elektrons. Hier gehen die Energieabhängigkeit der mittleren freien Weglänge sowie der Analysatortransmission ein. Die Dicke der Oberflächenschicht, aus der Elektronen gemessen werden, ist daher elementweise energieabhängig, und damit ist auch die Zahl der „sichtbaren“ Atome eines Elements und die daraus resultierende Gesamtintensität energieabhängig. Weiterhin ist der Wirkungsquerschnitt ebenfalls energieabhängig. Da jedoch die Anregung mit einer (annähernd) monochromatischen Quelle erfolgt, spielt die Variation keine Rolle.

Um von zwei Elementen 1 und 2 das relative Atomzahlverhältnis und damit Informationen zu den vorliegenden chemischen Verbindungen zu erhalten, werden die Intensitäten  $I_i$  der zu den jeweiligen Atomen  $i$  gehörenden XPS-Linien miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die Wirkungsquerschnitte monoenergetischer Röntgenstrahlung mit den jeweiligen Orbitalen sind elementspezifisch tabelliert [64]. Dann gilt

$$\begin{aligned} \frac{I_1}{I_2} &= \frac{\sigma_1}{\sigma_2} \cdot \frac{n_1}{n_2} \\ \Leftrightarrow \frac{n_1}{n_2} &= \frac{I_1}{I_2} \cdot \frac{\sigma_2}{\sigma_1} \end{aligned} \quad (3.4)$$

In Gleichung 3.4 wurde die Energieabhängigkeit aufgrund der mittleren freien Weglänge und der Analysatortransmission vernachlässigt. Diese Vorgehensweise ist gerechtfertigt, falls die betrachteten Photoelektronen annähernd gleiche kinetische Energien besitzen. Aus dem Intensitätsverhältnis der gemessenen Elemente lassen sich dann nach Gleichung 3.4 die relativen Anzahlverhältnisse der Atome der in der Oberflächenschicht enthaltenen chemischen Elemente bestimmen.

Die Bestimmung der Intensität einer Spektrallinie geschieht nach dem Verfahren von Shirley [65]. Hierbei wird die Gesamtfläche unterhalb eines Maximums mit der Zahl emittierter Elektronen dieses Elements identifiziert: Je höher die Intensität an einem bestimmten Energiewert

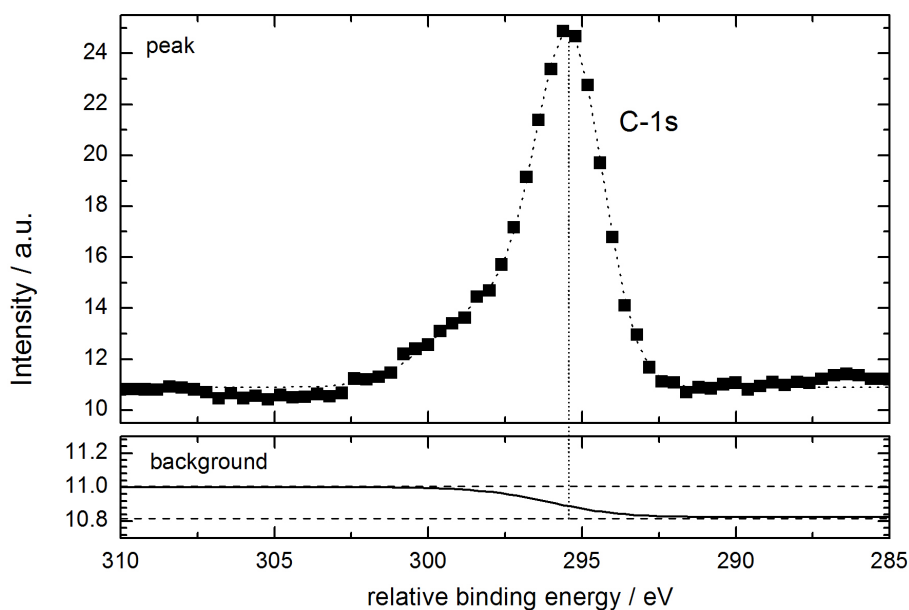


Abbildung 3.3: Untergrundbestimmung bei XPS-Messungen nach Shirley verdeutlicht anhand einer C-1s-Spektrallinie.

ist, umso mehr Elektronen dieser Energie werden emittiert. Da die Spektrallinie eine gewisse Breite besitzt, steigt mit zunehmender Anregungsenergie stetig die Elektronen-Emission an, und zwar bis das Maximum erreicht ist. Ab dann nimmt die Zahl der Emittierten Elektronen zwar noch immer zu, der Zuwachs an emittierten Elektronen aus dieser Linie nimmt allerdings ab.

Als Maß für die Änderung der Untergrundintensität von Niveau rechts zum Niveau links des Maximums (also von niedrigeren zu höheren Bindungsenergien) wird die Änderung der Zahl emittierter Elektronen mit zunehmender Anregungsenergie verwendet. Ihren maximalen Wert erreicht sie im Intensitätsmaximum dieser Spektrallinie. Danach nimmt parallel zur Zahl emittierter Elektronen auch die Untergrundintensität nur noch langsamer zu. Anhand der ermittelten Zuwachsraten wird dann ein stetiger Übergang von Niveau bei niedrigeren zu dem bei höheren Bindungsenergien modelliert.

In Abbildung 3.3 ist anhand einer C-1s-Linie der Verlauf der Untergrundintensität im Vergleich zum Intensitätsverlauf der emittierten Photoelektronen entlang der Spektrallinie verdeutlicht. Die Steigung des Untergrundintensität ergibt sich dabei aus der Zuwachsrate der emittierten Photoelektronen.

### Verschiebung der Bindungsenergie bei Variation des chemischen Bindungszustandes

Die bisher geschilderten Methoden zur Analyse der Probenchemie stützen sich auf die Bestimmung der Bindungsenergien von Rumpfelektronen (sog. **core levels**) und der Zuordnung

der entsprechenden Elemente aus Tabellenwerken oder Datenbanken. Dabei variieren die Bindungsenergien im Bereich einiger hundert Elektronenvolt zwischen verschiedenen Elementen.

Bei höherer energetischer Auflösung der *core-level*-Energien ergeben sich weitere Hinweise auf die genauen chemischen Bindungsverhältnisse der enthaltenen Atome. Dabei wird ausgenutzt, dass die Elektronenkonfiguration der Valenzelektronen (Hybridisierung, Ionisierung, Bindungspolarität) Einfluss auf die Bindungsenergie der Rumpfelektronen besitzt. Werden beispielsweise in einer kovalenten Fluor-Kohlenstoff-Bindung die Elektronen aufgrund der Polarität stärker auf der Seite des Fluors lokalisiert, so führt dies zu einer stärkeren Bindung der Rumpfelektronen am Kohlenstoff. Die beobachtbare Abweichung der Energie des Rumpfelektrons im gebundenen gegenüber dem ungebundenen Zustand wird als **chemical shift** bezeichnet.

Eine Ionisation kann als Grenzfall vollständiger Polarisierung einer kovalenten Bindung angesehen werden, bei dem die für den kovalenten Fall beschriebene Vertiefung des Atompotentials folglich am stärksten auftritt. Sie führt folglich zur größten Steigerung des Betrages der Bindungsenergie der Rumpfelektronen.<sup>1</sup>

## Tiefenprofilierung mit XPS

Die Photoelektronenspektroskopie erlaubt eine sehr genaue, quantitative Bestimmung der relativen Stoffmengenanteile einer Probe. Diese Genauigkeit wird dabei auf einer im Vergleich zu anderen Methoden sehr dünnen Oberflächenschicht erreicht.

Bei näherer Betrachtung macht die Oberflächenempfindlichkeit einen der größten Vorteile der XPS aus: Oberflächenanalytische Methoden besitzen im Vergleich zu volumenbasierten Messmethoden gewöhnlich erheblich geringere Signalintensitäten bzw. schlechtere Signal-zu-Rausch-Verhältnisse. Die Signalintensität im Falle der XPS hat ihren Ursprung bereits in den direkt emittierten Photoelektronen: Die von oberflächennahen Atomen emittierten Elektronen erreichen ohne weitere Beeinflussung den Detektor, während dies für tiefer liegende Schichten nicht der Fall ist. Für diese Elektronen besteht eine mit der Tiefe des emittierenden Atoms zunehmende Wahrscheinlichkeit für inelastische Wechselwirkungen mit anderen Elektronen, wodurch tiefer liegende Schichten ausgeblendet werden .

Die XPS erlaubt somit die genaue Bestimmung der relativen Stoffmengenkonzentrationen in einem sehr kleinen Bereich direkt an der Probenoberfläche. Dieser Detektionsbereich kann nun als Messfenster aufgefasst werden, über das hinweg ein (lateral und in die Tiefe) gemittelt Messergebnis bestimmt wird. Wird die Oberfläche nach einer Messung gleichmäßig um einen konstanten Wert abgetragen, ergibt sich eine neue Oberfläche, deren chemische Zusammensetzung nun ebenfalls mit Hilfe der XPS vermessen werden kann. Durch die fortgesetzte Anwendung von Messung und Abtrag wird das Messfenster in fortlaufend tieferliegende Schichten der ursprünglichen Probe gesetzt (wie in Abbildung 3.4 dargestellt). Die Bestimmung der Intensitäten einzelner Spektrallinien für *Core-Level* erlaubt in dieser schrittweisen Technik die

---

<sup>1</sup>Zwischen den F-1s-Bindungsenergien von Fluoridionen in verschiedenen Verbindungen gibt es darüber hinaus auch kleine Unterschiede, die sich auf unterschiedliche Kristallgeometrien zurückführen lassen, sie sind aber nur schwer signifikant zu messen.

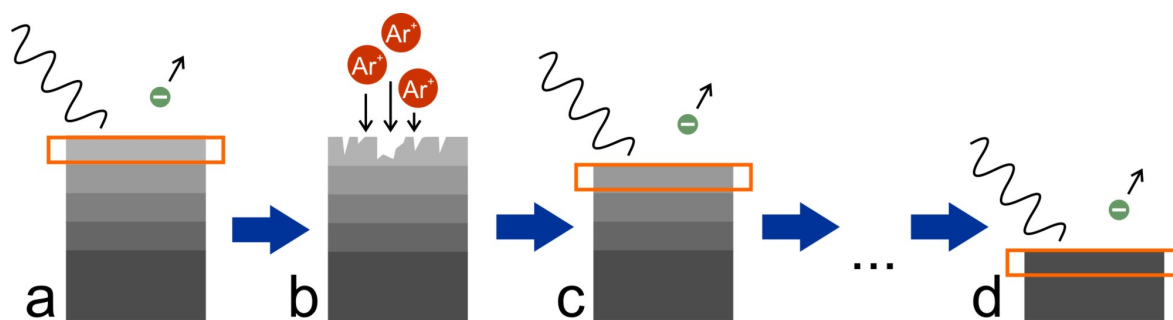


Abbildung 3.4: Schematische Verdeutlichung der prinzipiellen Vorgehensweise zur Gewinnung eines XPS-Tiefenprofils. Schrittweises Messen (a bzw. c) und Abtragen der obersten Festkörperschicht (b) erlauben die Anwendung der XPS auch auf tieferliegende Schichten. Das Messfenster (in der Zeichnung als orangenes Rechteck angedeutet) liegt in jedem neuen Messschritt in einer tieferen Schicht.

Bestimmung der chemischen Zusammensetzung in unterschiedlichen Abständen von der ursprünglichen Oberfläche der Probe im Sinne einer elementspezifischen Tiefenprofilierung. Auf diese Weise können Variationen der chemischen Zusammensetzung mit einer Tiefenauflösung von wenigen Atomlagen detektiert werden. Der Abstand der jeweils gemessenen Ebene von der ursprünglichen Oberfläche wird im weiteren als **Tiefe** bezeichnet.

Kritisch bei dieser Art Messung ist der kontrollierte Abtrag der ursprünglichen Oberfläche. Als Methode der Wahl bietet sich ein Argonionen-Beschuss der Oberfläche an. Die schweren Argonionen werden ionisiert und mit einer möglichst konstanten Spannung in einer bestimmten Rate auf die abzutragende Oberfläche zu beschleunigt. Leicht variierende Beschleunigungsspannungen oder variierende Drücke bei der Versorgung der Argonkanone können zu signifikanten Variationen bei der Abtragsrate führen. Eine einfache Messung der Beschusszeit ist daher für die Charakterisierung des Vorganges unzureichend. Um dieses Problem zu umgehen, wird für die hier gezeigten Messungen eine **Ionendosis** ermittelt, die ein absolutes Maß der Zahl der auf die Probe geschossenen Ionen darstellt.

Handelt es sich bei der Probe um einen Isolator, dann werden die die Probe treffenden Ar-Ionen nach Kontakt nicht direkt entladen, sondern sich im Vakuum der Präparationskammer zu einem Punkt auf Erdpotential hinbewegen, beispielsweise den geerdeten Probenhalter aus Stahl. Der über den Probenhalter fließende Entladungsstrom wird detektiert, möglichst linear verstärkt und dann einem Frequenzgenerator zugeführt. Je höher der Entladungsstrom ist, umso höher ist die Frequenz, die dieses Gerät zur Verfügung stellt. Ein schlichter Zähler registriert dann die Zahl der gelieferten Impulse, die durch den Aufbau ein direktes Maß der Zahl entladener Ar-Ionen ist. Diese Zahl ist proportional zur Gesamtzahl der Ionen, die die beschossene Probe tatsächlich getroffen haben. Die so bestimmte Ionendosis ist selbst für eine stark variierende Beschussrate noch eine dem Abtrag proportionale Größe und erlaubt bestmögliche Kontrolle der tatsächlichen Beschussrate mit Ar-Ionen.

Die Isolatoreigenschaft der Probe hat Bedeutung für die Eichung der Abtragsmethode. Eine hierfür notwendige Annahme besteht in der Homogenität des Beschusses entlang der gesamten

Probenoberfläche. Wird in diesem Fall die Oberfläche mit einer Maske aus ebenfalls nichtleitenden Material abgedeckt, so entspricht die Ionenzählrate noch immer dem Fall der unmaskierten Probe.<sup>2</sup> In der Maske befindet sich ein kleines Loch, durch das hindurch Ar-Ionen nach wie vor die Probenoberfläche abtragen. Nachdem eine bestimmte Ionendosis auf die Oberfläche abgegeben wurde, wird das auf der Probenoberfläche durch die Maske hindurch entstandene Loch mit Hilfe oberflächenmetrologischer Methoden vermessen. Bei den hier vorgestellten Experimenten wurden Weißlichtinterferometrie und Rasterkraftmikroskopie dafür verwendet.

In Abbildung 3.5 ist ein nach oben beschriebener Prozedur entstandenes Loches mit Hilfe der Weißlichtinterferometrie abgebildet. Durch die Bestimmung der Lochtiefe und Kenntnis der zum Erzeugen dieses Loches aufgewendeten Ionendosis kann eine ionendosisbezogene Abtragsrate berechnet werden. Unter der Annahme der Homogenität des Ionenbeschusses ist diese Rate ein für gegebenes Probenmaterial und festgelegte Beschleunigungsspannung konstanter Präparationsparameter.

Durch den Ar-Ionen-Beschusses kann prinzipiell auch die Probenoberfläche plastisch verändert werden, wie dies in an Si-Oberflächen bereits beobachtet wurde. Die mit der Zeit zunehmende Rauigkeit der Oberfläche ist neben dem Abtrag ein weiteres Resultat dieser Behandlung. In geringem Maße werden außerdem Ar-Ionen in die Probenoberfläche implantiert, was ebenfalls zu Gitterveränderungen führen kann. Dies führt zu dem in Abbildung 3.1 beobachteten Ar-2p-Signal.

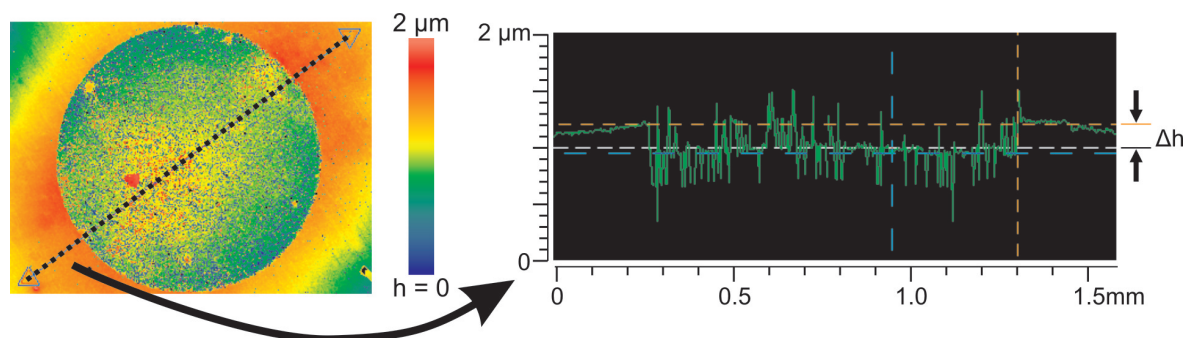


Abbildung 3.5: Bestimmung von Durchmesser und Tiefe eines unter kontrollierten Bedingungen in der Probenoberfläche erzeugten Loches mit Hilfe von Weißlichtinterferometrie. Mit Hilfe der in Falschfarben dargestellten Höheninformation (a) wird ein zusammenhängendes Bild dargestellt, während für die quantitative Auswertung an einem Querschnitt der dargestellten Struktur geschieht (b).

Die XPS stellt sich zusammenfassend gesagt als eine entlang einer Probenoberfläche höchst empfindliche Messmethode heraus. Aus prinzipiellen Gründen sind die zum Messsignal beitragenden Bereiche auf die ersten Atomlagen einer Oberfläche begrenzt, so dass bereits Adsorbate bei der Interpretation von Messergebnissen berücksichtigt werden müssen. Aus den Ergebnissen

<sup>2</sup>Im Falle einer elektrischen Strom leitenden Probe müsste die verwendete Maske ebenfalls leitend sein, um für die Messung des Entladestroms gleiche Voraussetzungen zu gewährleisten. Die Ionenzählraten entsprechen dann wiederum dem unmaskierten Fall.

lassen sich unter Berücksichtigung von Wirkungsquerschnitten Atomzahlverhältnisse zwischen einzelnen Elementen gewinnen, aus denen sich chemische Verbindungen in der Probe begründen lassen. Aufgrund der an der Oberfläche konzentrierten Empfindlichkeit der XPS können durch fortgesetztes Messen und Abtragen einer Oberfläche Tiefenprofile erstellt werden, aus denen die chemische Zusammensetzung für unterschiedliche Abstände von der ursprünglichen Probenoberfläche in höherer Auflösung als mit einer anderen Messmethode resultiert.

## 3.2 Röntgenbeugung - XRD

### Grundlagen

Kristalline Festkörper zeichnen sich gegenüber amorphen Festkörpern durch die über weite Strecken regelmäßige Anordnung der Atome oder Moleküle aus. Die sich wiederholende, periodische Abfolge bestimmter Atome innerhalb des Festkörpers bezeichnet man als **Gitter**. Das Gitter, das nach Modellanschauung in alle Raumrichtungen unendlich weit ausgedehnt ist, wird durch Verschiebevektoren charakterisiert, die es in sich selbst überführen. Relative Länge und Richtung dieser Verschiebungsvektoren bestimmen die Kristallstruktur, in der ein Festkörper vorliegt. Das Volumenelement, das aus den zur Beschreibung eines dreidimensionalen Gitters benötigten drei primitiven Verschiebungen besteht, bezeichnet man als **Einheitszelle**. Innerhalb dieser Volumina befinden sich die Atome oder Moleküle immer an der gleichen Position, so dass zur Beschreibung der Atomposition die Lagebeschreibung innerhalb des Volumens der Einheitszelle ausreichend ist. Sieht man von Gitterfehlern ab, so besteht ein Festkörper aus einer Aneinanderreihung solcher primitiver Einheitszellen bzw. der darin enthaltenen Atome.

Die regelmäßige Anordnung der Atome in einem Kristall führt zu Beugungserscheinungen, wenn eine einlaufende elektromagnetische Welle mit hinreichend kleiner Wellenlänge mit dem Material interagiert. Röntgenstrahlen können insbesondere von Elektronen elastisch gestreut oder reflektiert werden, und sie sind von ausreichend kurzer Wellenlänge. Konstruktive Interferenz der von einem Material zurückgestreuten Wellen tritt dann auf, falls es sich beim Streuvektor (also dem Differenzvektor zwischen dem Impulsvektor der einlaufende und der auslaufenden Welle) in einer bestimmten Richtung um einen reziproken Gittervektor handelt (**Laue-Bedingung**). Aus der Lage der Beugungsmaxima lässt sich dann unter Umkehrung dieser Bedingung auf die die Beugung hervorrufende Struktur zurückschließen. Das ist das Prinzip hinter der Röntgenbeugung als Messmethode, aus deren Ergebnissen sich bei entsprechend genauen Messungen viele Eigenschaften eines Kristalls ableiten lassen. Die strukturellen Informationen der Einheitszelle erlauben auch Aussagen über die Größe und damit über die Art an ihrem Aufbau beteiligter Atome. Entscheidenden Einfluss auf die Anordnung der Teilchen im Festkörper haben Atom- oder Ionenradien.

Das Ergebnis eines solchen Beugungsexperiments ist ein **Diffraktogramm**, in dem die unter einem bestimmten Winkel detektierte Intensität als Funktion des Beugungswinkels  $2\theta$  aufgetragen ist. Je einfacher und symmetrischer der beugende Kristall, umso geringer ist die Zahl der detektierten Maxima. Für polykristalline Systeme ungeordneter Orientierung (Pulver oder sonst polykristallin aufgebaute Systeme) treten die Beugungsmaxima in einer rotations-symmetrischen Richtung relativ zum einfallenden Strahl auf. Durch die ungeordnete Struktur

resultiert nicht ein einzelner Reflex (wie etwa im Falle eines Einkristalls), sondern die zufällige Orientierung der Kristallite lenkt den Strahl folglich ebenso unorientiert unter einem gleichbleibenden Ablenkwinkel entlang eines Kegels in alle Richtungen. Für pulverförmige Proben resultiert daher ein vereinfachter experimenteller Aufbau, denn es ist für die Durchführung des Experiments unerheblich, wie genau der Einfallswinkel der Röntgenstrahlung relativ zu den Kristallachsen verläuft.

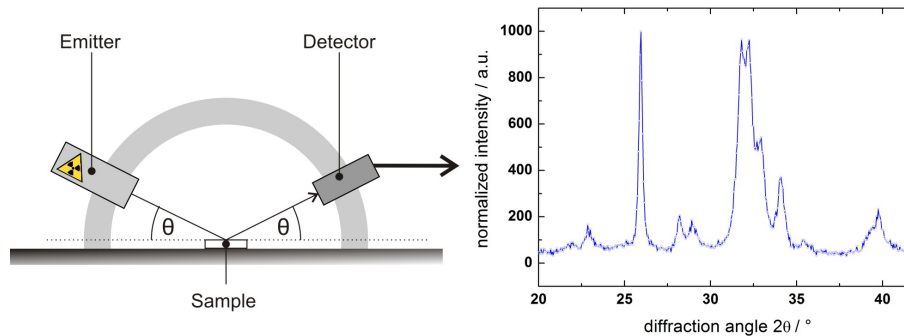


Abbildung 3.6: Schematischer Aufbau eines Röntgendiffraktometers. Das von der Methode gelieferte EDiffraktogramm zeigt für jeden Winkel die am Detektor empfangene Intensität. Aus der Position der Maxima lassen sich Aussagen zum Kristallbau eines untersuchten Festkörpers ableiten.

Praktisch werden XRD-Untersuchungen heute immer in Reflektionsgeometrie durchgeführt, wie sie schematisch in Abbildung 3.6 dargestellt ist. Über ein Goniometer wird konstruktiv sichergestellt, dass die Stellung von Röntgenemitter und Detektor zu jedem Zeitpunkt durch denselben Winkel  $\theta$  gegeben ist. Schmale Schlitzblenden sorgen für eine Emission und Detektion der Röntgenstrahlung mit hinreichender Genauigkeit: Je kleiner die Blende, umso definierter die Winkelangaben, aber umso geringer auch die Intensitäten. Dies kann durch längere Messzeiten ausgeglichen werden. Beim Einsetzen der Probe in die Apparatur wird sichergestellt, dass die Probenoberfläche sich im Goniometerzentrum befindet und sich die Scheitel von Detektor- und Emitterwinkel damit entsprechend der Skizze einstellen. Für jede Winkelstellung des Goniometers wird dann am Detektor die Intensität empfangener Röntgenstrahlung dokumentiert. Das Ergebnis ist ein Diffraktogramm, wie es rechts in Abbildung 3.6 gezeigt ist. Für eine bessere Vergleichbarkeit mehrerer Messungen werden die stärksten Linien in dieser Arbeit jeweils auf 1000 Einheiten normiert. Die Intensitäten schwächerer Maxima des Diffraktogramms werden relativ hierzu angepasst. Anhand von Lage und Intensität der Maxima lassen sich die zugrundeliegenden Kristallstrukturen bestimmen.

Dank informationstechnischer Verfahren lassen sich zu einem bestimmten Beugungsbild aus Datenbanken die zugehörigen Kristallstrukturen und damit die Materialien anhand der charakteristischen Lage der Maxima identifizieren. Sind mehrere Strukturen enthalten, überlagern sich die Beiträge entsprechend. In solchen Fällen kann eine Rietveld-Anpassung [66] zur Aufklärung der jeweiligen Anteile der verschiedenen Verbindungen sinnvoll sein.



### 3.3 Rasterkraftmikroskopie und Kraftspektroskopie

#### Grundlagen

Optische Mikroskopiemethoden erlauben dem Beobachter lediglich den Zugriff auf solche Strukturen, deren Abmessungen sich in der Größenordnung der Lichtwellenlänge oder darüberhin- aus bewegen. Um kleinere Strukturen abzubilden, sind andere Methoden notwendig. Neben der Elektronenmikroskopie, die im nachfolgenden Abschnitt 3.4 kurz beleuchtet wird, ist es die Rasterkraftmikroskopie (engl. *atomic force microscopy*, AFM), die seit Mitte der 1980er Jahre die Beobachtung kleinster Strukturen erlaubt [67]. Das Messprinzip beruht auf der Interaktion einer an einem Federbalken montierten, sehr feinen Spitze (wie sie in Abbildung 3.7 zu sehen ist) mit einer Oberfläche.

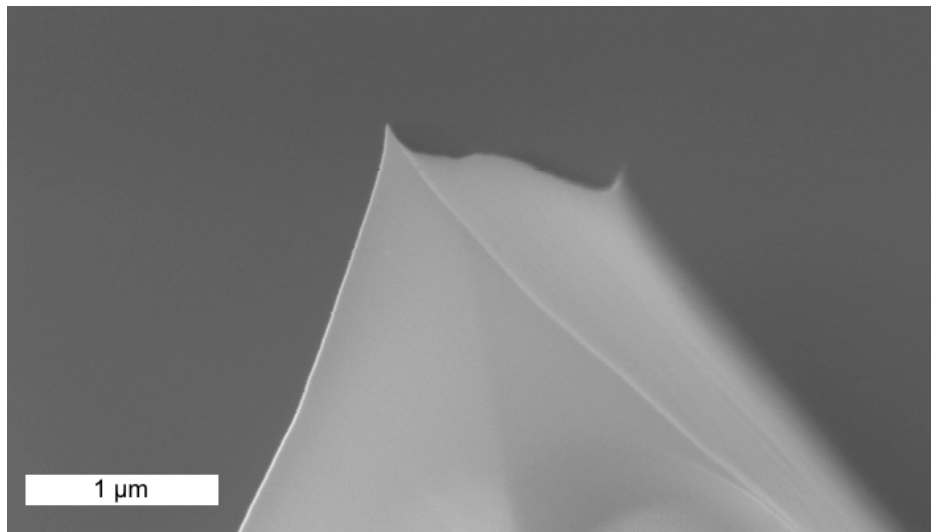


Abbildung 3.7: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Si-Spitze für den Einsatz in einem Rasterkraftmikroskop. Der die Spitze tragende Federbalken ist nicht abgebildet.

Rasterkraftmikroskope können in der Regel in unterschiedlichen Betriebsmodi verwendet werden. Diese lassen eine angepasste Abbildung der Oberfläche unter Berücksichtigung der Eigenschaften der Probe zu.

Beim sogenannten **Kontaktmodus** verbiegt sich unter dem Einfluss der Oberfläche der Federbalken, da Oberfläche und die Spitze miteinander in Wechselwirkung stehen. Je nach Paarung von Spitzen- und Substratmaterial sind sowohl repulsive als auch attraktive Kräfte denkbar. Für einen gegebenen Abstand der Spitze von der Oberfläche stellt sich zwischen der Federkraft des Federbalkens und der Kraft zwischen Oberfläche und Spitze ein Kräftegleichgewicht ein, das zu einer Verbiegung des Federbalkens führt. Diese Verbiegung kann z.B. mit Hilfe einer Laseroptik verstärkt (Lichtzeigerprinzip) und registriert werden. Dazu wird auf das freie Ende des Federbalkens, der an der anderen Seite gewöhnlich an einem Silizium-Wafer hängt, ein Laserpunkt fokussiert. Dessen Reflexion wird auf die Mitte einer Fotodiode gelenkt, die aufgrund

ihrer Bauart in der Lage ist, sowohl Abweichungen aus dieser Normalposition in horizontaler wie auch in vertikaler Richtung zu registrieren. Variiert bei Änderung der Kräfte zwischen Oberfläche und Spitze die Gleichgewichtslage des Systems und damit die Verbiegung des Federbalkens, so wandert die Reflexion des Lasers auf der Fotodiode entsprechend aus. Da beim Kontaktmodus eine konstante Kraft auf die Oberfläche ausgeübt wird, eignet er sich besonders für die Abbildung inelastischer, stabiler Proben.

Beim sogenannten **intermittierenden Modus** (auch Tapping Mode<sup>®</sup>) ist die direkt auf die Oberfläche ausgeübte Kraft geringer, weswegen sich dieser Modus insbesondere für weiche Oberflächen oder solche mit instabilen Strukturen eignet. Dabei wird die Spitze am Federbalken in Schwingungen auf die Oberfläche zu und zurück versetzt. Der Einfluss der Spitze-Oberfläche-Wechselwirkung ist in diesem Fall wiederum abstandsabhängig. Anstatt einer statischen Verbiegung des Federbalkens kommt es hier allerdings zu einer Änderung seines Schwingungsverhaltens: Die durch Dämpfung bedingte Änderung der Schwingungsamplitude und der Phasendifferenz zwischen Antrieb und Spitzenbewegung sind die direkten Messinformationen in diesem Modus.

Wird das AFM in einem dieser beiden abbildenden Modi verwendet, wird die Spitze in einem Zeilenmuster über die Oberfläche bewegt („gescannt“). Entlang der Zeilen ermittelt das Gerät an einzelnen Messpunkten eine Regelgröße und die Abweichung der Regelgröße von einem vorher festgelegten Sollwert. Diese Regelgröße kann im Kontaktmodus z.B. die Verbiegung des Federbalkens sein, im intermittierenden Modus kann das eine bestimmte Phasenabweichung oder eine festgelegte Amplitude der Federbalkenschwingung sein. Um den Sollwert der Regelgröße wieder zu erreichen, reagiert die schnelle Steuerung des Kraftmikroskops mit einer Abstandsänderung der Spitze von der Probenoberfläche, die den gewünschten Sollwert der Regelgröße wieder herbeiführt. Beim Kontaktmodus wird z.B. die Verbiegung auf einem konstanten Wert gehalten. Die Spitze befindet sich somit immer an derselben Position relativ zum Oberflächenpotential [68].

Daraus, wie das Gerät die Spitze näher oder weiter entfernt zur Oberfläche positioniert, kann für jeden Messpunkt innerhalb des abgerasterten Bereiches eine relative Höheninformation gewonnen werden. Grafische Darstellungen dieser Information wie in Abbildung 3.8 erwecken dann einen plastischen Eindruck des abgetasteten Oberflächenstücks.

Aus anderen Messgrößen (seitliche Verkipfung eines Federbalkens, Phasenänderung bei gleichbleibender Amplitude, Amplitudenänderung bei gleicher Phase) können Rückschlüsse auf Materialeigenschaften der Probe gezogen werden. Ein Phasenkontrast zwischen zwei benachbarten Oberflächenbereichen kann beispielsweise ein Hinweis auf unterschiedliche Elastizitäten darstellen. Bei systematischer Anwendung der Rasterkraftmikroskopie können somit neben der reinen Strukturinformation noch weitere Daten erhoben werden.

Das die Messanordnung umgebende Medium hat nur einen geringen Einfluss auf die Verwendbarkeit der Methode. So sind die vorab geschilderten Verfahren nicht an ein Probe und abtastende Spitze umgebendes Vakuum gebunden. Messungen können an Luft und sogar in wässrigen Umgebungen durchgeführt werden. Damit eröffnet sich ein großer Vorteil der Kraftmikroskopie für biologische Proben: Gewebe oder einzelne Zellen können ohne Gefahr der Veränderung auch für längere Zeit beobachtet werden.

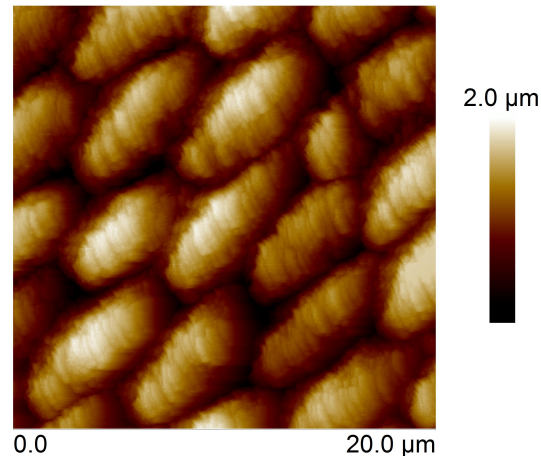


Abbildung 3.8: Rasterkraftmikroskopisch erstelltes Höhenbild einer geätzten Rinderzahnschmelzprobe, aufgenommen im intermittierenden Modus. Nach Politur wurde die Probe *in situ* für insgesamt 15 s mit 1M Phosphorsäure geätzt und erneut abgebildet. Die Struktur ergibt sich aus der Anordnung der Kristallite im Zahnschmelz und deren anisotropen Ätzverhalten.

## Rauigkeit

Die große Genauigkeit, mit der Oberflächen mit Hilfe des Kraftmikroskops quantitativ vermessen werden können, eröffnet umfangreiche Möglichkeiten zur morphologischen Charakterisierung einer Oberfläche. Dabei kommt es immer auf Fragestellung und System an, wie ein geeignetes Maß hierfür aussehen kann. Bei Rauigkeiten vergleicht man immer Höhenvariationen einer Oberfläche mit einer idealen Geometrie, beispielsweise eine völlig ebenen Fläche. Je größer solche Variationen, umso größer ist i.d.R. ein angewendetes Rauigkeitsmaß. Da Rauigkeitsmaße unterschiedliche Qualitäten besitzen, muss angegeben werden, welche Rauigkeit für eine Beschreibung verwendet wird.

In den nachfolgenden Kapiteln dieser Arbeit bezieht sich eine Rauigkeitsangabe immer auf eine **RMS-Rauigkeit**  $R$  (engl. *root mean square roughness*), die sich aus kraftmikroskopischen Messungen nach folgender Beziehung ergibt:

$$R = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (z_i - \bar{z})^2}{n}}$$

Die  $z_i$  sind Höhenwerte der Bildpunkte, deren quadratischer Abstand zu den Höhenwerten einer Bestebene  $\bar{z}$  bestimmt werden. Die zu bildende Summe läuft über alle Bildpunkte. Die zugrunde liegenden AFM-Bilder besitzen dabei immer eine Auflösung von  $512 \times 512$  Punkten und eine laterale Größe von  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$

## Kraftspektroskopie

Während in abbildenden Modi mit Hilfe des Kraftmikroskops Oberflächen sehr genau untersucht werden können, gibt es darüber hinaus noch weitere, nicht abbildende Modi, bei denen die sehr genau positionierbare Spitze und die Eigenschaften des Federbalkens zur Kraftmessung verwendet werden. Dabei wird die Spitze an einer einzelnen Position an die Oberfläche angenähert und die Verbiegung des Federbalkens während der gesamten Bewegung aufgezeichnet. Wie bereits weiter oben erwähnt wurde, ändert sich bei Annäherung der Spitze an die Oberfläche die Wechselwirkung zwischen Spitze und Oberfläche. Die im Verlauf der Annäherung wirkenden Kräfte erlauben also eine Charakterisierung der Oberflächenwechselwirkungen an der Stelle der Oberfläche, an der die Messung stattfindet.

Praktisch wird die Spitze solange der Oberfläche genähert, bis eine vorgegebene Verbiegung des Federbalkens erreicht wird. Dieser Triggerwert ist gewöhnlich größer als der Wert auftretender repulsiver Kräfte in relativer Ferne zur Oberfläche. Erst wenn die Spitze tatsächlich in Kontakt mit der Oberfläche gerät, kann eine sehr große repulsive Kraft durch Born-Wechselwirkungen entstehen und den vorgegebenen Triggerwert erreichen. Die Bewegungsrichtung der Spitze wird dann umgekehrt. Die dann in Kontakt mit der Oberfläche stehende Spitze befindet sich in dieser direkten Nähe zur Oberfläche in einem Minimum des Oberflächenpotentials, so dass beim Zurückziehen gewöhnlich adhäsive Kräfte die Spitze zunächst in der Nähe der Oberfläche halten.<sup>3</sup> Erst wenn der Federbalken des Kraftmikroskops ausreichend verbogen ist und dadurch die rückziehenden Kräfte größer werden als die Adhäsionskräfte zwischen Federbalken und Spitze, löst sich die Bindung, und die Spitze entfernt sich von der Oberfläche. Die sich bei dieser Art Messung ergebende grafische Darstellung der wirkenden Kraft als Funktion der Distanz zwischen harter Probenoberfläche und Spitze am Federbalken - eine sog. **Kraft-Distanz-Kurve** - ist modellhaft in Abbildung 3.9 A<sup>4</sup> gezeigt [69].

Anhand der Darstellung lassen sich die vorgenannten Phasen der Spitzenbewegung und die resultierende Federkraft in jeder Bewegungsphase an einem idealisierten Beispiel leicht identifizieren: Die schwarze Kurve, mit Quadraten bezeichnete Kurve zeigt den Kraftverlauf bei Annäherung der Spitze an die Oberfläche. Sie verläuft insofern von rechts nach links und zeigt nach Kontakt mit der harten Oberfläche für weitere Annäherung die Elastizität des Federbalkens und die zunehmende, auf die Oberfläche ausgeübte Kraft. Die rote, mit Kreisen gekennzeichnete Rückzugskurve zeigt auf einer harten Oberfläche einen zunächst mit der Annäherungskurve deckungsgleichen Verlauf, bis die ausgeübte Kraft negativ wird, es sich also um eine Zugkraft handelt, die der Federbalken auf die Oberfläche ausübt. Während sich die Piezomechanik weiter von der Oberfläche entfernt, verbleibt die Spitze in Kontakt mit der Oberfläche, und zwar, bis die sich einstellende Rückstellkraft des Federbalkens gleich der Adhäsionskraft ist. Beim kleinsten weiteren Rückzug der Spitze wird diese schlagartig auf die Gleichgewichtslage zu beschleunigt, was durch den sehr steilen Anstieg zwischen dem Minimum

---

<sup>3</sup>In bestimmten Fällen, in denen beispielsweise gleichnamige elektrische (Oberflächen-)Ladungen an Spitze und Oberfläche auftreten, kann es zu tatsächlich rein repulsiven Potentialen kommen. Bei den hier untersuchten Systemen ist dies allerdings nicht der Fall.

<sup>4</sup>Die hier angegebene Distanz ist eigentlich eine relative Längenänderung der Piezomechanik. Nullpunkt ist diejenige Lage der Piezomechanik, bei der die Spitze am Federbalken im Kräftegleichgewicht mit der Oberfläche und gleichzeitig in Kontakt mit der Oberfläche steht.

der roten Kurve und der Gleichgewichtslage ( $F=0$ ) repräsentiert wird. Die **Adhäsionskraft** wird definiert als die Tiefe dieses Kraftminimums relativ zur Gleichgewichtslage.

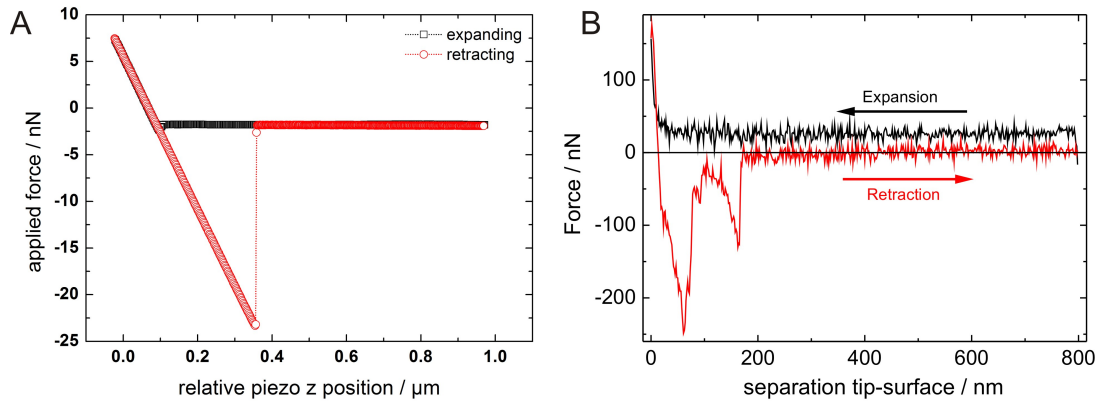


Abbildung 3.9: Beispiele für Kraft-Distanz-Kurven. A: idealisierter Fall ohne Störungen an einer harten Oberfläche; B: Realer Verlauf mit einer bakterienfunktionalisierten Spitze, wobei mehrfache Adhäsionen auftreten.

Damit aus der Verbiegung<sup>5</sup>  $\Delta U$  des Federbalkens die wirkende Kraft bestimmt werden kann, sind allerdings zwei weitere Parameter zu bestimmen. Aufgrund der geometrischen Verhältnisse von Spitze und Detektor und des daraus resultierenden optischen Wegs zwischen beiden Komponenten, besitzt jede Spitze eine für sie individuelle **Verbiegungsempfindlichkeit**  $D$  (engl. *deflection sensitivity*). Sie ist ein Maß für die Positionsänderung des Federbalkens pro Spannungssignal an der Fotodiode. Ihr Wert kann beispielsweise aus der Steigung der Annäherungskurve abgelesen werden, solange die Spitze im Kontakt mit einer harten Oberfläche steht. Die zweite Größe, die zur Berechnung der Kraft aus der gemessenen Verbiegung notwendig ist, ist die Federkonstante des Federbalkens. Sie lässt sich aus Schwingungen ableiten, wenn der Federbalken in Luft oder Wasser frei hängend gelagert wird und die auftretenden spontanen Lagevariationen als Folge Brownscher Molekularbewegung untersucht werden. Daraus kann die Eigenfrequenz ermittelt und über ein harmonisches Oszillatormodell die Federkonstante  $k$  abgeleitet werden.

Die wirkende Kraft lässt sich dann einfach als Produkt von Verbiegung, Verbiegungsempfindlichkeit und Federkonstante berechnen:

$$F = \Delta U D k$$

Abbildung 3.9 B zeigt eine Kraft-Distanz-Kurve einer Bakterien Spitze, bei der die normalerweise aus Si oder SiN bestehende AFM-Spitze durch eine Bakterienzelle ersetzt wurde. Die

<sup>5</sup>Ändert sich die Lage des Federbalkens und damit die der Laserreflexion auf der Fotozelle, dann entstehen Spannungsunterschiede, die zwischen paarweisen Hälften der Fotozelle gemessen werden können. Eine Verbiegung ist im weiteren immer als eine elektr. Spannung zu interpretieren, die zwischen gegenüberliegenden Hälften der detektierenden Fotodiode durch Lageänderung der Laserreflexion entsteht.

Präparation dieser Spitzen wird ausführlich in Kapitel 7 beschrieben. Hier soll lediglich gezeigt werden, dass im Gegensatz zur „Idealkurve“ aus Abbildung A die Rückzugskurve mehrere Minima zeigt, die auf die schrittweise Belastung einzelner Spitzen-Oberflächen-Kontakte zurückzuführen sind. In solchen Fällen wird das absolute Minimum im Verlauf der Rückzugskurve als Adhäsionskraft interpretiert. Insgesamt ist der Verlauf dieser Kurve komplizierter, weil neben den mehrfachen Oberflächenbindungen auch andere Faktoren eingehen, z.B. die Verformbarkeit der Bakterien oder adhärierte Makromoleküle.

Nachteile dieser Kraftmikroskopie sind die beschränkte laterale Auflösung und die relativ geringe Abbildungsgeschwindigkeit, mit der die Bilder einer Oberfläche erzeugt werden. Abbildungen größerer Bereiche, die größer sind als der maximale Hub der Piezo-Mechanik, sind unmöglich. Weiterhin sind andere als mechanische Eigenschaften mit Hilfe des AFM ohne weiteres nicht zugänglich. Durch Ergänzungen des Messaufbaus können allerdings weitere Eigenschaften einer Oberfläche detektiert werden (z.B. Oberflächenpotential oder magnetische Eigenschaften).

Kraftmikroskopische Untersuchungen bieten sich hingegen immer dann an, wenn auf Mikro- oder Nanometerskala quantitative Fragestellungen entlang einer Oberfläche zu beantworten sind. Messungen sind anders als bei der Elektronenmikroskopie bei fast beliebigen Umgebungsbedingungen möglich, so dass insbesondere biologische und damit wasserenthaltende Proben abgebildet werden können. Die laterale Auflösung der abbildenden Modi in der Größenordnung des Radius der verwendeten Spitze (typisch 10 nm) genügt häufig zur Abbildung von Oberflächenvorgängen, während die Technik in der Höhenauflösung eine prinzipielle Messgenauigkeit von unter einem Nanometer besitzt: Ausgedehnte oder isoliert voneinander angeordnete Strukturen können mit dem AFM daher sehr genau abgebildet und vermessen werden. Sehr kleine Oberflächenstrukturen unterhalb des Spitzenradius sind wegen der relativ geringen Lateralaufklärung dagegen nicht zugänglich.

Daneben können durch die Kraftspektroskopie die Eigenschaften eines Oberflächenpotentials zwischen AFM-Spitze und Oberfläche bestimmt werden. Messungen zum Adhäsionsverhalten unterschiedlichster Materialien an annähernd beliebigen Oberflächen können durch eine entsprechende Präparation der interessierenden Materialien als Spitze oder Oberfläche realisiert werden. Die Verwendung von Bakterispitzen, wie sie in Kapitel 7 beschrieben wird, erlaubt auch die Einbeziehung von Mikroorganismen in diese Experimente und erlaubt dadurch „zellgenaue“ Messungen.

## 3.4 Elektronenmikroskopie und elektronenspektroskopische Methoden

### Grundlagen

Nicht-selbstleuchtende Objekte unterliegen bei mikroskopischer Beobachtung einer prinzipiellen Abbildungsgrenze, die sich aus den an diesem Objekt gestreuten, es beleuchtenden Lichtwellen ergibt. Um eine Abbildung zu realisieren, müssen daher nach Abbe neben den Maxima 0. Ordnung auch mindestens durch die Struktur des Objekts erzeugte Beugungsmaxima

1. Ordnung vom Objektiv eingefangen werden und zur Bildentstehung beitragen. Mit dieser Überlegung ergibt sich für das Auflösungsvermögen eines Mikroskops der Ausdruck

$$U = \frac{A}{\lambda} = \frac{n \sin(\alpha)}{\lambda} \quad (3.5)$$

$A$  ist dabei die numerische Apertur eines Objektivs, die sich als Produkt der Brechzahl  $n$  und dem Sinus des von einem punktförmigen Objekt ausgehenden, maximal abbildbaren Öffnungswinkels  $\alpha$  ergibt.  $\lambda$  ist die für diese Abbildung verwendete Lichtwellenlänge [70]. Um Strukturen kleiner als die Lichtwellenlänge (ca. 400 nm) trotzdem optisch betrachten zu können, müssen daher andere Verfahren als die normale Mikroskopie angewendet werden.

1924 formulierte deBroglie die Vermutung, dass sich Materieteilchen auch als sog. **Materiewellen** auffassen lassen, deren Wellenlänge  $\lambda$  sich ergebe als Quotient aus dem Planckschen Wirkungsquantum  $h$  und dem jeweiligen Teilchenimpuls  $p$ : [71]

$$\lambda = \frac{h}{p}$$

Damit lässt sich Teilchen eine energieabhängige **deBroglie-Wellenlänge** zuordnen, und es zeigt sich, dass für Abbildungen wichtige Eigenschaften wie Beugung oder Interferenz mit Teilchenstrahlung ebenfalls anwendbar sind [72]. Mit Hilfe beschleunigter Elektronen und dazu passenden Linsen- und Abbildungssystemen lassen sich so ausreichend kurzwellige Materiewellen erzeugen, so dass damit das Auflösungsvermögen nach Gleichung 3.5 vergrößerte Abbildungen auch von Strukturen im Subnanometerbereich zulässt. Die Analogie von Licht und Materiewellen führte 1932 schließlich zur Entwicklung des Elektronenmikroskops, das ein bis dahin unerreichtes Auflösungsvermögen zuließ [73].

### Transmissionselektronenmikroskop - TEM

Beim TEM wird ein Strahl beschleunigter Elektronen auf eine dünne Probe geleitet. Die Elektronen werden dabei an der Probe gebeugt. Ein Elektronen-Linsensystem sorgt zunächst für eine parallele „Beleuchtung“ der Probe und fügt nach Durchgang durch die Probe die einzelnen Beugungsordnungen des Elektronenstrahls wieder zu einer Abbildung zusammen. Auf diese Weise entsteht (ggf. über Zwischenbilder) eine vergrößerte Realraumabbildung des ursprünglichen Objektes.

Elektronen besitzen beim Durchgang durch Festkörper nur eine geringe freie Weglänge, so dass Abbildungen mit den TEM auf Fälle beschränkt sind, bei denen die zu untersuchende Materialschicht hinreichend dünn ist. Diese Proben müssen u.U. aufwändig präpariert werden, wodurch die Verwendung dieser Abbildungsmethode zeitaufwändig sein kann. Neben der Bildinformation lassen sich aus der Beugung der Elektronen bei Durchgang durch das Material auch weitere Informationen über das durchstrahlte Material entnehmen.

### Rasterelektronenmikroskop - REM

Während das TEM in Analogie zu einem Durchlichtmikroskop die Probe durchleuchtet, wird beim REM nur ihre Oberfläche abgebildet. Dazu rastert der gebündelte Elektronenstrahl über

das Objekt. Die Rückstreuung der Elektronen wird mit einem oberhalb der Probe sitzenden Detektor registriert. Dessen Signal gibt einen Helligkeitswert zurück, der mit der aktuellen Lage des anregenden Elektronenstrahls in Beziehung gesetzt wird. Für jede Position wird auf diese Weise ein Helligkeitswert erzeugt, der positionsabhängig als Pixel des gesamten Bildes dargestellt eine Abbildung der Oberfläche erzeugt.

Da Kanten im Vergleich zu einer glatten Fläche eine andere Sekundärelektronenemission zeigen, tritt zwischen diesen beiden Strukturmerkmalen ein Kontrast auf. Kanten erscheinen daher z.B. immer etwas heller als die umgebenden Oberflächen. Daneben treten weitere Kontraste auf, die insgesamt zu einem Bildeindruck der Oberfläche führen, auch wenn in einem REM keine aufwändigen Linsenarrangements zur Abbildung zu finden sind wie etwa beim TEM.

Das Abrastern der Oberfläche erfordert, dass die untersuchte Probe elektrisch leitend ist. Anderenfalls akkumulieren sich die Ladungen auf dem Objekt und verzerren oder verhindern die Abbildung. Nichtleitende Keramiken und andere Nichtleiter werden daher mit einer Schicht aus Gold oder Kohlenstoff bedampft. Hinreichend dünne Schichten verändern nicht die Oberflächenmorphologie, sie verhindern aber effektiv die Probenaufladung.

## Energiedispersive Röntgenspektroskopie - EDX

Der in einem REM erzeugte Strahl beschleunigter Elektronen, der die Oberfläche abrastert, erzeugt rückgestreute Elektronen, deren Gesamtintensität zusammen mit den Positionsdaten des anregenden Strahls ein Bild aufbaut. Bei der Wechselwirkung der Elektronen mit der Probe entsteht Röntgenstrahlung, deren Emissionsspektrum Intensitätsmaxima bei bestimmten Wellenlängen zeigt. Diese entstehen beim Übergang von Elektronen, die aus einer kernnahen Schale durch den einfallenden Elektronenstrahl aus ihrem Bindungszustand herausbefördert werden und nachfolgend durch Elektronen auf einer höheren Umlaufbahn ersetzt werden. Die frei werdende Energie wird in Form von Röntgenstrahlung emittiert und kann mit Hilfe entsprechender Detektoren analysiert werden. Auf diese Weise entsteht ein **EDX-Spektrum**<sup>6</sup>.

Die spektralen Maxima sind für Atome desselben Elements immer bei derselben Energie gelegen, so dass die in einer Probe enthaltenen Elemente daran identifiziert werden können. Die relativen Intensitäten der Linien können ähnlich wie bei der XPS wiederum bei Gewichtung mit den Wirkungsquerschnitten zur relativen Konzentrationsbestimmung der enthaltenen Elemente verwendet werden.

Je nach Anregungsenergie beträgt die Eindringtiefe in die Probenoberfläche bis zu einigen Mikrometern. Um gebundene Elektronen jedoch aus ihren Atom zu befördern und die Röntgenemission bei der Rekombination zu sehen, muss der Elektronenstrahl eine ebenso große Energie besitzen. Je nach interessierendem Element muss daher eine bestimmte Mindestenergie aufgebracht werden. Damit einher geht auch ein laterales Aufweiten des Detektionsvolumens hin zu einem birnenförmigen Bereich. EDX ist daher bei hinreichend hohen Anregungsenergien keine gut ortsaufgelöste Methode.

---

<sup>6</sup>EDX: *energy dispersive x-ray spectroscopy*



### Electron Backscatter Diffraction - EBSD

Wenn der Strom aus rückgestreuten Elektronen nicht nur anhand seiner Intensität zur Abbildung im REM verwendet wird, sondern eine orts aufgelöste Detektion der rückgestreuten Elektronen möglich ist, dann lassen sich räumliche Variationen in der Rückstreuintensität nachweisen. Ähnlich wie bei der Röntgenbeugung sind die entstehenden Muster von der streuenden Struktur abhängig, und damit kann umgekehrt das Kristallgitter, seine Orientierung und das Material selber bestimmt werden. Die an einem planaren Detektor entstehenden Muster, wie in Abbildung 3.10 gezeigt, werden als **Kikuchi-Figuren** bezeichnet. Das Verfahren, bei dem durch Auswertung der Abstände und der Winkellagen der abgebildeten Muster die zugrundeliegenden Strukturen identifiziert werden, heißt EBSD.

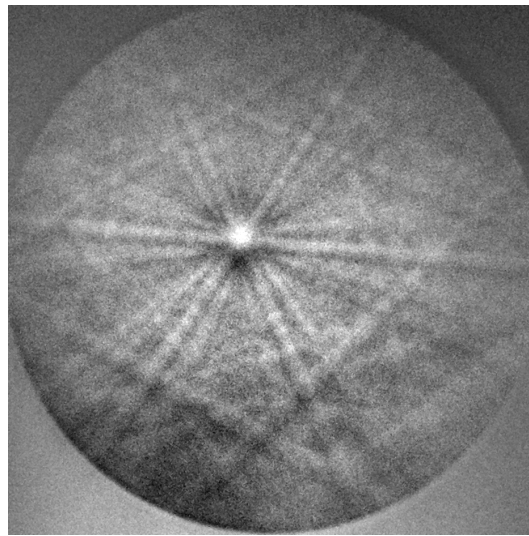


Abbildung 3.10: Beispiel für eine Kikuchifigur auf der Sensorfläche eines EBSD-Detektors. Das hier dargestellte Rückstreumuster stammt von der Hydroxylapatit-Oberfläche einer HAP3-Probe (vgl. Kapitel 6).

Die Detektionstiefe dieser REM-Anwendung liegt zwischen einigen zehn und 100 Nanometern. Die laterale Auflösung ist eng begrenzt auf den Auftreffort des Elektronenstrahls auf die Probe, und daher lässt sich die Oberfläche einer Probe umfassend mit Hilfe dieser Methode charakterisieren. Für jeden Punkt erlaubt diese Methode daher die Bestimmung der kristallografischen Orientierung entlang der Probenoberfläche.

Ausführliche Details über die Rasterelektronenmikroskopie, Betriebsmodi, die Theorie, Detektorarten oder praktisch auftretende Fehler finden sich an einigen Stellen, z.B. im Optik-Band der Bergmann-Schäfer-Reihe, Kapitel 11 [72], in dem einführenden Buch von Fuchs, Opholzer und Rehme [74] oder im Buch von Goldstein [75].



## 4 Sintervorgänge

Sintervorgänge werden in vielen einschlägigen Lehrbüchern ausführlich dargelegt. Die im folgenden Abschnitt geschilderten Vorgänge lehnen sich an die Darstellungen im Lehrbuch von Callister und Rethwisch [76]. Darin finden sich auch weitergehende Aussagen zur werkstoffwissenschaftlichen Sichtweise. Aussagen über morphologische Änderungen während des Sinterns (z.B. zu Kornwachstum und Sinterhalsbildung) finden sich im Buch von Schatt [77].

Sintervorgänge spielen in der Werkstoffkunde eine große Rolle und haben während des Herstellungsprozesses vieler Werkstücke einen entscheidenden Einfluss auf die Materialeigenschaften. Sintern kann z.B. die Probendichte erhöhen oder eine Probe verfestigen. Dabei sind derartige Ziele nicht zwangsläufig kommensurabel. Eine Erhöhung der Dichte könnte beispielsweise eine geringere Duktilität<sup>1</sup> zur Folge haben.

Wie sich das Sintern auf die Eigenschaften einer Probe auswirkt, hängt in hohem Maße von den verwendeten Sinterparametern ab. Hierzu gehören der Temperatur- und ggf. Druckverlauf während des Sinterns, Sinteratmosphäre, und das angewendete Sinterverfahren. Die spezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials haben Auswirkungen auf die Wahl der Parameter wie auch das Ziel des Sinterns. Somit ist für jeden Sintervorgang und für jedes Material die Wahl der Sinterparameter ein individueller Vorgang. Ist ein Material bei hohen Temperaturen instabil, so verbietet sich außerdem ein Sintern bei zu hohen Temperaturen, um nicht chemische Änderungen auszulösen.

Zur Erklärung des Sintervorganges an sich spielen energetische Gesichtspunkte eine große Rolle. Der Einfachheit halber soll das Prinzip an einem Gitter bestehend aus einer Atomsorte verdeutlicht und später verallgemeinert werden.

Die Verteilung der kinetischen Energie jedes einzelnen Atoms im Festkörper wird durch die Boltzmannverteilungsfunktion beschrieben. Sie gibt an, wie groß die Häufigkeit einer bestimmten kinetischen Energie unter den Atomen des Festkörpers ist. Bei gegebener Temperatur existiert damit eine gewisse Wahrscheinlichkeit, dass ein Atom eine bestimmte kinetische Mindestenergie besitzt. Es kommen daher auch kinetische Teilchenenergien vor, die deutlich größer sind als am Verteilungsmaximum. Atome innerhalb eines Festkörpers befinden sich auf ihren Gitterplätzen für kleine Auslenkungen in einem annähernd harmonischen Potential, ähnlich wie dies schematisch in Abbildung 4.1 dargestellt ist. Um die Gitterplätze herum führen sie thermisch bedingte Schwingungen aus, wobei die kinetische Energie eines einzelnen Atoms bestimmt, wie groß dessen Schwingungsamplitude ist bzw. wie hoch es (energetisch betrachtet) in dem Gitterpotential steigen kann, bevor es wieder zurück zu seinem Gitterplatz gedrängt

---

<sup>1</sup>Die Duktilität eines Werkstoffes beschreibt sein Vermögen unter Beanspruchung nicht schlagartig zu reißen sondern sich zunächst plastisch zu verformen.

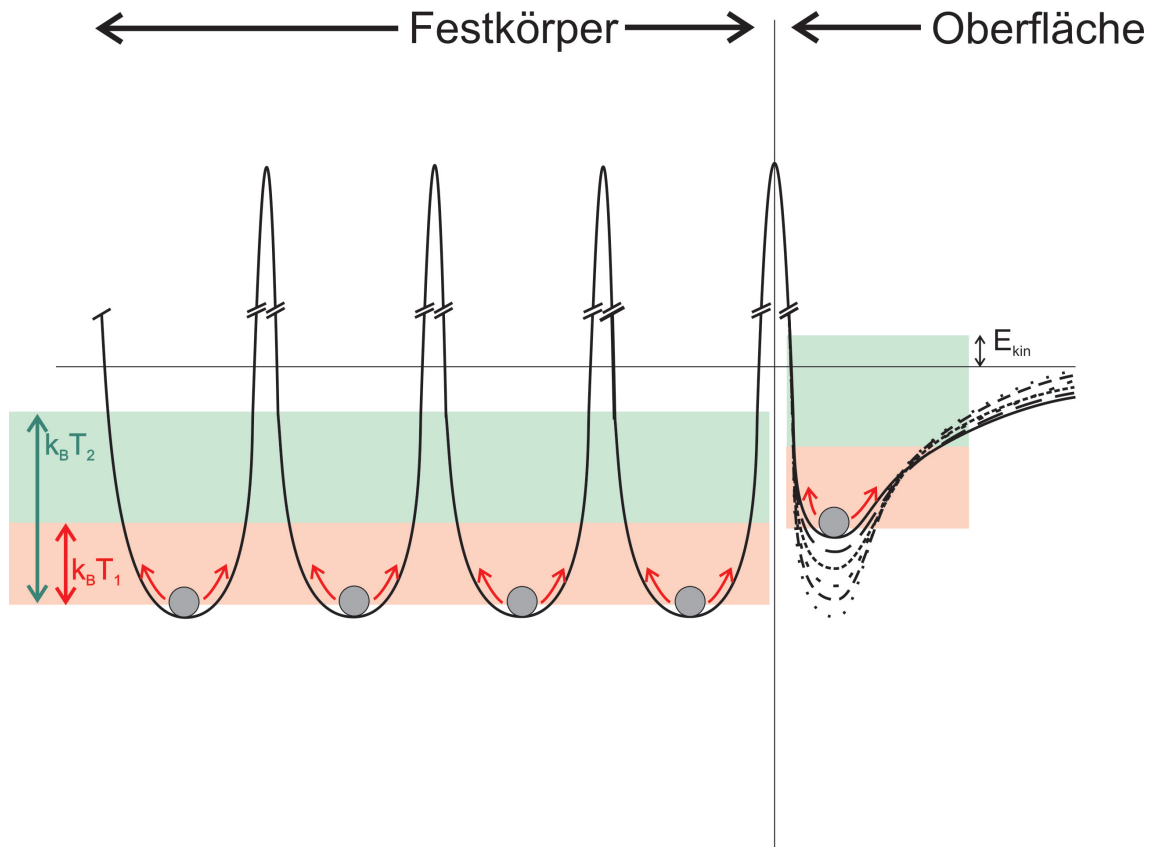


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der Bindungsverhältnisse an einer Festkörpergrenzfläche. Innerhalb des Kristallgitters des Festkörpers sitzen die Atome am Fuße regelmäßig angeordneter Potentiale. An der Oberfläche sind die Atome wegen der geringeren Koordinationszahl dagegen weniger fest gebunden. Der repulsive Potentialanteil durch direkte Nachbarn entfällt in Richtung aus dem Festkörper heraus. Dadurch steigt das Potential aufgrund des Einflusses der Bindungsenergie kontinuierlich bis auf Null an. Bei geringer Temperatur  $T_1 < T_2$  sind alle Atome in ihren Potentialminima gefangen. Wird die Temperatur gesteigert, so überwinden die Atome in dem Potential höhere Barrieren. Im Fall des randständigen Atoms reicht die so zugeführte Energie um das Atom freizusetzen. Die überschüssige Energie behält es als kinetische Energie  $E_{kin}$ .

---

wird. Das Gitterpotential besitzt für die Gitteratome bei näherer Betrachtung praktisch beliebig hohe Wände, so dass Bewegungen der Atome umeinander im Fall eines idealen Kristalls annähernd unmöglich sind.

Eine realistische Wahrscheinlichkeit zum Überwinden der Barriere gibt es hingegen im Bereich von Gitterfehlern oder an der Festkörperoberfläche, wo Atome geringer koordiniert<sup>2</sup> sind als innerhalb des regelrechten Festkörpers. Werden kinetische Energie und Höhe der Potentialbarriere vergleichbar groß (etwa durch Erhitzen, in Abbildung 4.1 beim Übergang von  $T_1$  nach  $T_2$ ), so kann die Barriere überwunden werden und das betreffende Atom wird beweglich. Können sich dadurch hinreichend viele Atome aus dem Gitterverband lösen, so beginnt der Festkörper zu schmelzen.

Aufgrund der Boltzmann-Verteilung der kinetischen Energie besitzt jedes Atom eine temperaturabhängige Wahrscheinlichkeit dafür, dass es über ausreichende Energie zum Überwinden des Gitterpotentials verfügt. Die Zahl solcher Atome steigt mit der Temperatur an. Festkörperoberflächen stellen das Ende einer (im Idealfall perfekt) periodischen Anordnung von Atomen oder Molekülen an festgelegten Positionen eines Kristallgitters dar. Die Koordination ist aufgrund der freien Oberfläche herabgesetzt. Analog sind bei Gitterfehlern freie Valenzen durch Unterbrechungen der regelmäßigen Struktur entstanden.

Im Falle der Gitterfehler tritt zu der bereits angeführten Abflachung des Gitterpotentials das Auftreten von Verspannungen innerhalb des Festkörpers. Da der Baufehler innerhalb der regelmäßigen Festkörperstruktur in ihrem Verlauf kompensiert wird und daher in einem hinreichend großen Abstand ohne weitere Auswirkung bleibt, tritt in unmittelbarer Nähe zum Gitterfehler eine Veränderung in den Bindungswinkeln oder -längen auf. Die hieraus resultierenden Verspannungen innerhalb des Gitters führen quasi zu einer Vorspannung in Bindungen, die zu einer Abflachung des Bindungspotentials in der Nachbarschaft eines Defekts führt. Zusammen mit der Verteilungsfunktion der kinetischen Energie folgt somit sowohl für die Defekt- als auch für die Oberflächenatome eine signifikant erhöhte Wahrscheinlichkeit gegenüber den restlichen Festkörperatomen, bei gegebener Temperatur den eigenen Gitterplatz verlassen zu können. Sie besitzen also eine erhöhte Beweglichkeit.

Diese vergrößerte Beweglichkeit ist die Grundlage des Sinterns. Bei der richtigen Wahl der Parameter (insbesondere der Temperatur) sind hauptsächlich Fehlstellen und Oberflächen betroffen, so dass nicht etwa neuen Defekte entstünden. Überzählige Atome können dabei offene Valenzen absättigen und sich so in das Kristallgitter einordnen. Das sorgt für eine stärkere Bindung und resultiert in einer Erhöhung der zugehörigen Potentialbarrieren. Die aufgebaute Bindung bleibt daher erhalten und Kristallfehler werden so ausgeheilt. Gitterdefekte diffundieren ganz ähnlich durch den Kristall, bis sich diese durch Zufall entweder aufheben oder eine Kristalloberfläche erreichen und sich dort auflösen. Werden Kristallfehler als Quasiteilchen betrachtet, so verursachen diese durch die in ihrer Nähe bestehenden Verspannungen polare Wechselwirkungen. Stehen sich beispielsweise zwei Versatzlinien gegenüber, kommt es auf ihre Orientierung an, ob sie aufeinander anziehend oder abstoßend wirken. Im Fall, dass sie bei Vereinigung rekombinieren können, ziehen sie sich an, im anderen Falle stoßen sie sich ab.

Durch die Mobilisierung von Oberflächenatomen tritt ein Übergang von Atomen zwischen

---

<sup>2</sup>Die Koordination gibt an, wie groß die Anzahl direkt benachbarter Bindungspartner ist.

einzelnen Kristallitkörnern im Bereich der Berührungspunkte zweier Körner auf. Es kommt zur Bildung sogenannter **Sinterhalse**, die nebeneinanderliegende Körner in ihrer Struktur miteinander verbinden können. Der dadurch entstehende Zusammenhalt zwischen den Körnern verfestigt die gesinterte Probe und verleiht ihr eine verstärkte Stabilität. Sinterhalse sind Kontaktstellen zwischen zwei Gefügekörnern unterschiedlicher Orientierung. Dort stattfindende Vorgänge können zu einer gleichsinnigen Ausrichtung der sich berührenden Körner führen und dadurch wiederum die Ordnung innerhalb der Probe erhöhen.

Bei Hydroxylapatit (und anderen ionischen Kristallen) sind unterschiedliche Ionenspezies enthalten. Sie unterscheiden sich in ihrer Art, und damit in Größe, Masse und Ladungszustand. Grundsätzlich verhalten sich die Ionen innerhalb des Kristalls so wie oben beschrieben, allerdings unterliegt das während des Sinterns freigesetzte Ion komplizierteren Potentialen: Durch seine elektrische Ladung wird die atomistische Beschreibung schwieriger. Da durch den Aufbau aus unterschiedlichen Ionen auch kompliziertere Einheitszellen möglich werden als im Falle eines strukturell einfachen Metalls, vergrößern sich die Perioden des Gitters und damit die der Kraftwirkungen und Diffusionsstrecken. Die Bildung regelrechter Kristalle benötigt dadurch eine längere Zeit als bei homogenen Kristallen. Die unterschiedlichen Massen bedingen auch unterschiedliche Beweglichkeiten und damit ionenabhängige Diffusionskonstanten.

Nicht zu vernachlässigen ist die Eigenschaft mancher Materialien, sich unter dem Einfluss von Temperatur, Druck und Atmosphäre oder durch eine Kombination aus allen Bedingungen in eine andere Modifikation zu verwandeln oder chemisch zu anderen Stoffen zu reagieren. Luft-sauerstoff kann bei den häufig hohen Sintertemperaturen von 1000 °C und mehr eine sehr aggressive Chemikalie sein, und so werden Sintervorgänge oft unter Vakuum oder in Schutzatmosphäre (Stickstoff, Edelgase) durchgeführt, um sauerstoff- oder sonst chemisch bedingte Veränderungen zu unterbinden. Es gibt andere Vorgänge, bei denen wasserdampfgesättigte Hochdruck- und/oder Hochtemperaturbedingungen zur Bildung bestimmter Strukturen notwendig sind. Solche hydrothermalen Verfahren bedürfen spezieller Gerätschaften.

Mit Hilfe eines passenden Sinterverfahrens lassen sich pulverförmig vorliegende Materialien zu Werkstoffen mit gewünschten Eigenschaften verdichten. Die Bestimmung des passenden Verfahrens und der passenden Parameter kann relativ aufwändig sein, führt aber bestenfalls zu einem reproduzierbaren Rezept, mit dem Proben gleichbleibender Qualität und bestenfalls keinen negativen Eigenschaften hergestellt werden können. Neben dem Verfahren den Sintervorgang beeinflussende Parameter sind Temperaturverlauf und Sinterdauer, Umgebungsatmosphäre und Art und Struktur des vorliegenden Ausgangsmaterials.

Da für die Produktion der Proben aus der vorliegenden Arbeit unterschiedliche Sinterverfahren verwendet wurden, werden nach dieser allgemeinen Einführung die Details zur jeweiligen Probenpräparation in den einzelnen Kapiteln besprochen.

## 5 HAP-Pellets durch uniaxiales Vorverdichten und Sintern

Die Realisation der im Kapitel 2.6 herausgestellten Anforderungen an künstlich hergestellte Proben aus Hydroxylapatit erlaubt eine Vereinfachung des Hartgewebesystems und macht damit Modellmessungen durchführbar. Eine mögliche Methode zur Herstellung solcher Proben ist das Verpressen eines pulverförmigen Ausgangsmaterials und das anschließende Sintern zu einem stabilen Probenkörper oder **Pellet**. Dafür werden in einem einfachen Fall keine besonderen Maschinen oder Werkzeuge benötigt. Diese einfache Art der Präparation wird im folgenden Kapitel präsentiert. Anhand der Ergebnisse aus XRD-, XPS-, AFM- und REM-Messungen werden die physikalischen und chemischen Eigenschaften der verwendeten Materialien und der Proben vorgestellt und die Verwendbarkeit der Pellets als Modellmaterial für zukünftige Experimente bewertet.

### 5.1 Charakterisierung des Ausgangsmaterials

Das Ausgangsmaterial für die Herstellung der Pellets war ein nachfolgend als HAP2 bezeichnetes Hydroxylapatit-Pulver, das im Chemikalienhandel erhältlich ist (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany). Während HAP bei neutralen und schwach basischen pH-Werten eine geringe Löslichkeit in Wasser besitzt, ist dies für viele von der Synthese noch immer vorhandenen Materialien nicht der Fall. Unter Ausnutzung dessen wurden diese Materialien mit dem nachfolgend geschilderten Waschprozess aus dem Pulver herausgelöst. Etwa 5 g HAP wurden wiederholt in 1 l Wasser (Millipore<sup>®</sup> Reinstwasseranlage, Leitwert  $\leq 54,95$  S/cm) vollständig dispergiert und durch ein Filter wiedergewonnen. Dabei enthaltene wasserlösliche Bestandteile wurden in Lösung zusammen mit dem Wasser aus dem Filterkuchen entfernt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, und das so erhaltene HAP wurde zum Reinigen in einen Trockenschrank gegeben (110 °C, min. 10 h). Danach wurde der getrocknete Filterkuchen mit einem Mörser wieder in ein rieselfähiges Pulver verrieben.

Das getrocknete Pulver zeigt eine gewisse Hygroskopie, weswegen es nach der Trocknung in dicht verschlossenen Gefäßen aufbewahrt wird. Dieser Schritt dient in erster Linie der Schaffung einer reproduzierbaren chemischen Zusammensetzung.

#### Pulvermorphologie

Eine geringe Menge des gewaschenen HAP2-Pulvers wurde in iso-Propanol dispergiert, und die sehr dünne Dispersion wurde auf ein TEM-Gitter aufgebracht. Nach Verdampfen des Alkohols konnten an diesen Gittern mit Hilfe eines Transmissions-Elektronenmikroskops (JEM 2011,

Hersteller JEOL, AG Birringer, Universität des Saarlandes) die strukturellen Merkmale des Pulvers anhand einzelner Kristallite oder an Agglomeraten untersucht werden.

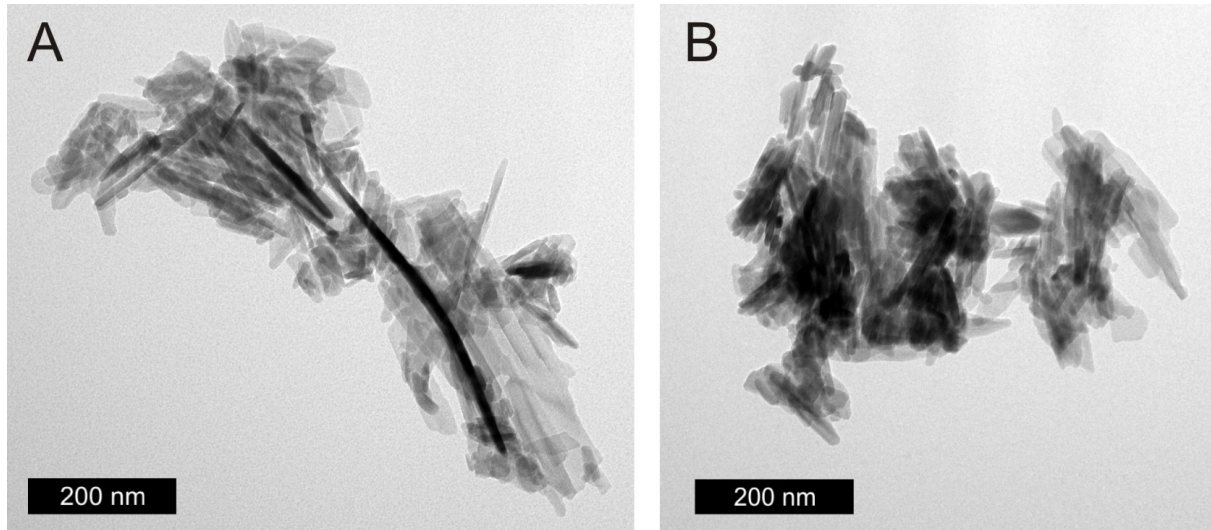


Abbildung 5.1: TEM-Aufnahmen der Kristallitaggregate in HAP2-Pulver.

Abbildung 5.1 zeigt zwei Aufnahmen solcher Kristallitagglomerate. Die in HAP2-Pulver enthaltenen Kristallite sind nadelförmig. Sie besitzen Längen bis zu 100 nm und Durchmesser von wenigen 10 nm.

### XRD an HAP-Pulver

An HAP2-Pulver wurden Röntgendiffraktometrien durchgeführt, um chemische Verunreinigungen zu detektieren. In günstigen Fällen ist die Winkelauflösung ausreichend, um im Spektrum einer Materialmischung die enthaltenen Maxima den jeweiligen enthaltenen Materialien zuzuordnen und die Anteile der beteiligten chemischen Verbindungen daran zu bestimmen. Dazu wurde ein zylindrisches Kunststoffgefäß von 1,5 cm Durchmesser und einer Höhe von 5 mm mit dem zu untersuchenden Pulver gefüllt und dieses entlang der Oberkante des Gefäßes glattgestrichen. Die so vorbereitete Pulverprobe wurde so in den Mittelpunkt eines  $\theta$ - $2\theta$ -Goniometers eingesetzt, dass dessen Zentrum auf der Höhe der glattgestrichenen Oberseite lag. Auf die Probe wurde dann charakteristische Röntgenstrahlung eingestrahlt ( $\text{Cu-K}\alpha$ ), deren reflektierte Intensität als Funktion von  $2\theta$  in 5 Hundertstelgradschritten mit Hilfe eines Detektors registriert worden ist.

Die nachfolgenden Ergebnisse wurden mit einem „X’Pert PRO“ Diffraktometer der Firma Panalytical mit PIXcel<sup>3D</sup>®-Detektor gewonnen.<sup>1</sup> Die Anodenspannung lag für alle in diesem Abschnitt besprochenen XRD-Messungen bei 40 kV, der Röhrenstrom jeweils bei 40 mA. Das

<sup>1</sup>An dieser Stelle sei der AG Birringer und dort insbesondere Manuel Grewer und Michael Deckarm gedankt für die Unterstützung bei den Röntgendiffraktionsmessungen. Außerdem ist Herrn Karl-Heinz Ehes zu danken, der die ersten Röntgen-Messungen zu diesem Material noch vor seinem Ruhestand durchgeführt hat.



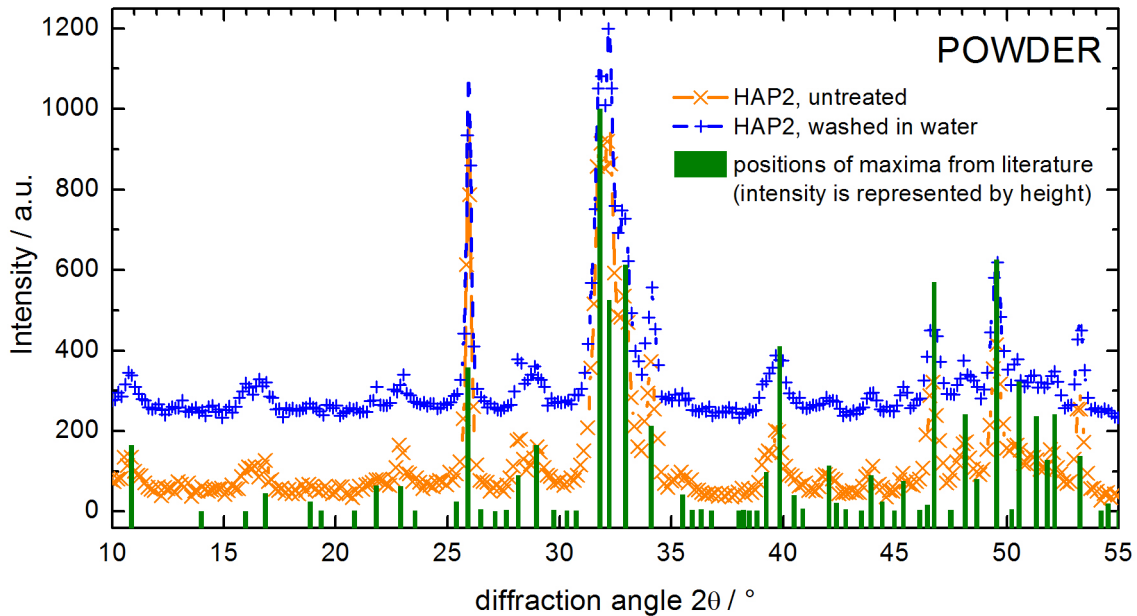


Abbildung 5.2: XRD-Spektrum einer HAP2-Pulverprobe vor ( $\times$ ) und nach ( $+$ ) Waschen mit Wasser. Die Lage der Maxima und deren Intensität in den Literaturdaten [37] ist entlang der x-Achse durch Balken und deren Höhe angegeben.

HAP2-Pulver wurde wie geliefert und nach der Waschprozedur entsprechend der obigen Schilderung charakterisiert. Die dabei auftretenden Spektren wurden auf Übereinstimmung mit den für Hydroxylapatit bekannten Spektren untersucht [37].

Das Ergebnis der Messung ist in Abbildung 5.2 dargestellt. Die für HAP tabellierten Maxima sind entlang der x-Achse durch Lage und Größe entsprechender Symbole abgebildet, die Position und Intensität einer Spektrallinie kennzeichnen. Das Messergebnis ist so skaliert, dass die maximale Intensität im Spektrum den Wert 1000 annimmt.

Der Vergleich von gemessenem und Referenzspektrum zeigt, dass signifikante Abweichungen hauptsächlich die Intensität der beteiligten Linien betreffen, nicht jedoch deren Position. Zusätzliche oder fehlende Linien sind nicht erkennbar. Damit liefert die XRD-Messung zumindest aus röntgendiffraktometrischer Sicht ein starkes Argument, dass das als Ausgangsmaterial verwendete Pulver überwiegend aus Hydroxylapatit besteht.

## 5.2 Pelletherstellung

Zur Herstellung eines kompakten Probenkörpers wurde etwa 1 g des gereinigten HAPs in eine Pressform mit einem Durchmesser von 16 mm eingefüllt. Sie wurde anschließend initial mit einer Kraft von 80 kN uniaxial belastet. Nach fünf Minuten hat die Kraft durch die Verformung der Probe in der Pressform um etwas mehr als 6 kN abgenommen. Nach dieser

Zeit wurde der Kolben entlastet und der Grünkörper aus der Pressform entfernt. Er besaß nach dieser Prozedur eine Dichte zwischen 60 und 65% der theoretischen Kristalldichte<sup>2</sup>, ausgehend von einer idealisierten Anordnung von HAP-Einheitszellen innerhalb eines perfekten Kristalls ( $\rho_{th} = 3,189 \text{ g/cm}^3$  [40])

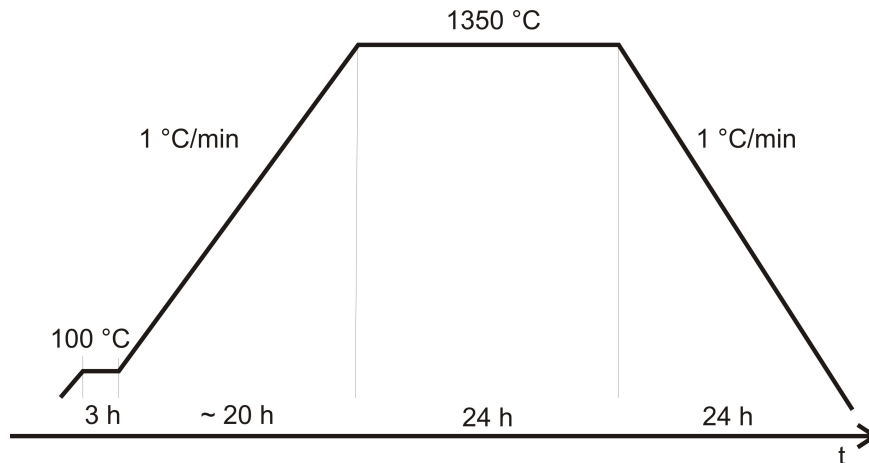


Abbildung 5.3: Temperaturverlauf während des Sinterns der HAP2-Proben.

Der Grünkörper hatte keine große Stabilität und konnte von Hand zerbrochen werden. Um die mechanische Widerstandsfähigkeit und die Dichte des Materials weiter zu erhöhen, wurde er nun in einem Hochtemperaturofen gesintert. Der vorverdichtete Grünkörper wurde dazu auf einer Korundkeramik in die Ofenkammer gelegt. Der Temperaturverlauf während des Sintervorganges ist in Abbildung 5.3 gezeigt und lehnt sich an die Prozessbeschreibung von Prokopiev [79] an. Nach Abschluss des Sintervorganges resultierte ein Pellet mit einer Dichte zwischen 85 und 90% theoretischer Kristalldichte. Seine Dicke betrug ca. 5 mm, sein Durchmesser etwa 14 mm. Die so verdichteten Proben werden nachfolgend als **HAP2-Proben** bezeichnet

Am Pellet wurde die Oberfläche geschliffen und poliert. Grobe Unebenheiten (z.B. hervorstehende Ränder oder Grate) wurden dafür zunächst mit grobem Schleifpapier (Körnung 600-800, bei allen Präparationen SiC-Schleifpapier der Firma Struers) entfernt. Die grob geebnete Oberseite wurde danach mit zunehmender Körnung (1200 - 2400 - 4000) geschliffen.<sup>3</sup>

### 5.3 Charakterisierung der Proben und ihrer Oberfläche

Mit optischer Mikroskopie (mit einem Leitz Laborlux 3.3, Wetzlar, Deutschland, mit Neoplan Fluotar Objektiven und CoolSNAP Pro CCD-Kamera) wurden die wie vorab geschildert präparierten Pellets auf ihre Oberflächenbeschaffenheit untersucht. Im unpolierten Zustand

<sup>2</sup>Die Dichte von Zahnschmelz wird zu  $2,82 \text{ g/cm}^3$  angenommen [78], was einer relativen Dichte zu HAP von 88,7% entspricht.

<sup>3</sup>Im Gegensatz zur später geschilderten Herstellungsprozedur der HAP3-Proben wurde hier keine Diamantsuspensionen zum Polieren verwendet.

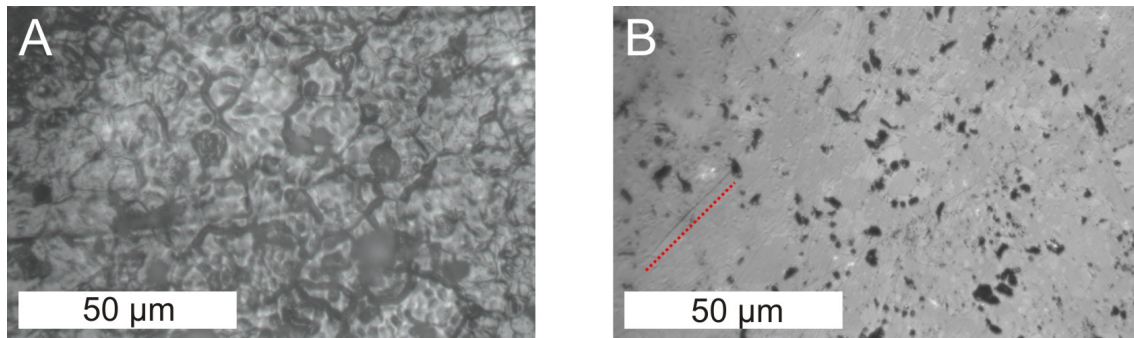


Abbildung 5.4: Optische Mikroskopie einer Pelletoberfläche vor (A) und nach (B) Schleifen und Polieren. Auf der unbehandelten Oberfläche sind sogar Poren schlecht erkennbar. Nach der Politur bleiben auf der Oberfläche Schleifriefen zurück (hier z.B. parallel oberhalb der roten Line). Es lassen sich anhand verschiedener Weißtöne zwei Phasen unterscheiden: Die etwas hellere Phase scheint dabei in der zweiten Phase eingelagert zu sein. Gleichzeitig treten in ihrer Nähe vermehrt Poren auf.

(dargestellt in Abb. 5.4 A) ist die Oberfläche sehr rau. Korngrenzen treten deutlich hervor, und auf den einzelnen Körnern gibt es konkav erscheinende Vertiefungen von einigen zehn Mikrometern Durchmesser. Bei den polierten Pellets (in Abbildung 5.4 B) lassen sich an der im Vergleich zu Teilabbildung A geglätteten Oberfläche anhand der Weißtöne mehrere mikroskopische Phasen unterscheiden. Poren treten auf der Oberfläche als schwarze und ungleichmäßig geformte Löcher auf. Darüberhinaus sind von der Bearbeitung der Oberfläche noch Polierriefen erkennbar, beispielsweise als dunkler Streifen oberhalb und parallel zu der eingetragenen rot gepunkteten Line in Abb. 5.4 B verlaufend.

Die sich während des Sinterns einstellende Gefügestruktur könnte von der Präparation beeinflusst worden sein, denn dem System wurde durch den Pressvorgang eine Anisotropie in Form der Richtung der Druckbelastung aufgeprägt. Dadurch treten möglicherweise entlang unterschiedlicher Richtungen unterschiedliche Strukturen auf, die auf die späteren Experimente einen Einfluss haben könnten. Um dies zu prüfen, wurde ein Pellet parallel zur ursprünglichen Pressachse durchgeschnitten. Die dann senkrecht zur Oberseite des Pellets verlaufende Schnittfläche wurde mit Hilfe optischer Mikroskopie mit der oben beschriebenen Struktur aus Abbildung 5.4 verglichen.

Im Vergleich mit einer Sicht auf die Pelletoberfläche senkrecht zur Pressachse (in Abbildung 5.5 A) wird in der Richtung parallel zur Pressachse (dargestellt in Abb. 5.5 B) kein Unterschied in der Beschaffenheit der Probenoberfläche festgestellt. Beide Oberflächen sind bezüglich ihres Aussehens und insbesondere in der sichtbaren Größe der angeschliffenen Gefügekörner und der Porosität vergleichbar. Anisotrope Struktureigenschaften können nicht beobachtet werden.

Für eine quantitative Analyse wurde die Pelletoberfläche mit Hilfe eines AFMs (Bruker DI3100 Dimension, Michigan, US, mit Nanoscope IV Controller) untersucht. Abbildung 5.6 zeigt den zufällig ausgewählten Bereich einer Probenoberfläche, abgebildet im *Tapping Mode*<sup>®</sup>, auf dem

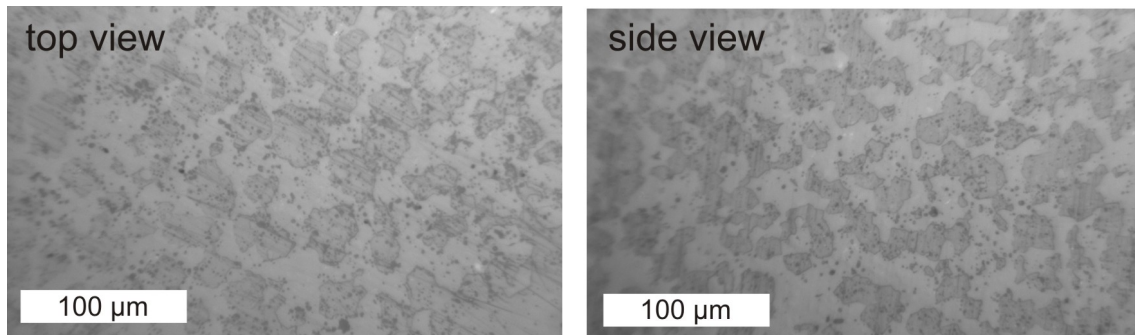


Abbildung 5.5: Vergleich der Pelletoberfläche senkrecht zur Pressrichtung und entlang einer Bruchfläche parallel zur Pressrichtung.

im linken unteren Teil diverse Poren als schwarze Bereiche erkennbar sind. Die Oberfläche selbst zeigt Schleif- und Polierriefen, und sie ist außerdem mit einzelnen, auf der Oberfläche liegenden Partikeln verschmutzt. Die rms-Rauigkeit der gesamten Oberfläche bestimmt auf einem Bereich  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$  liegt bei ungefähr 130 nm, was in Anbetracht der vorhandenen Poren und Verschmutzungen kein überraschend hoher Wert ist. Wird der Rauigkeitswert hingegen auf einer  $(10 \mu\text{m})^2$  großen Fläche fernab von Partikeln und Poren bestimmt, so sinkt er auf einen Wert von 6,8 nm (RMS). Ursache dieser verbleibenden Rauigkeit sind die Riefen, die durch das Polieren der Oberfläche entstehen.

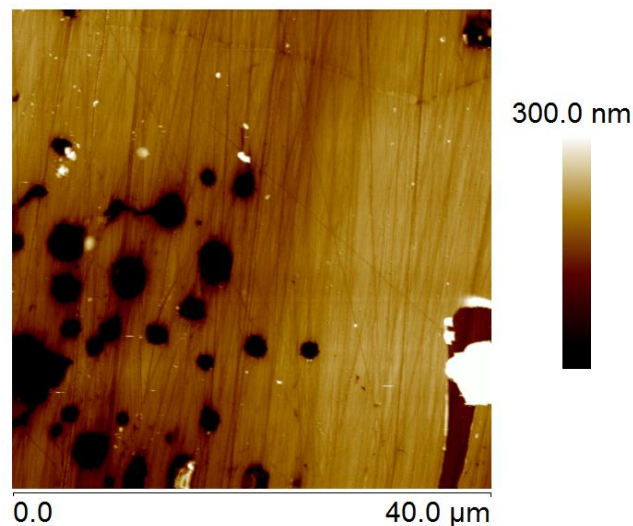


Abbildung 5.6: Rasterkraftmikroskopische Aufnahme einer Pelletoberfläche nach Schleifen und Polieren.

## Diskussion

Oberflächenexperimente erfordern eine möglichst einfache Oberflächenmorphologie der Proben. Dies wird für kristalline Materialien durch Spalten oder Sägen von Einkristallen entlang von Kristallachsen realisiert (wie etwa bei Si-Wafern), wobei die resultierende Oberfläche glatt und ihre Struktur entlang ihrer gesamten Ausdehnung homogen ist. In polykristallinen Materialien wie den hier vorgestellten HAP2-Pellets hängt die Qualität einer in diesem Sinne „einfachen“ Oberfläche von der Größe der in dem Material enthaltenen Kristallite ab. Beim Übergang von einem zum nächsten Kristallit besteht dann bereits ein Bruch in der Kristallitorientierung und damit eine veränderte Oberfläche. Je größer daher die Kristallite sind, desto eher darf von einer homogenen Oberfläche gesprochen werden. Letztlich hängt es immer von der Anwendung ab, ob eine Oberfläche für eine Messung geeignet ist oder nicht.

Schwerwiegender ist bei den vorliegenden Proben die noch verbleibende Rauigkeit der Oberfläche nach dem Schleifen einzuschätzen. Wie beschrieben wurde, ist am Ende der Bearbeitung die Rauigkeit der Oberfläche immer noch eine Größenordnung oberhalb typischer Moleküldurchmesser von Makromolekülen. Deren zweifelsfreie Detektion ist dadurch nicht möglich, so dass die Proben zum Zwecke von Einzelmolekülexperimenten ungeeignet sind. Die bei diesen Proben außerdem auftretende Porosität ist noch so hoch, dass durch das Auftreten von Poren abermals die Homogenität der Oberfläche verringert und die Anwendbarkeit der Proben eingeschränkt wird.

Für Experimente, bei denen die vorhandene Oberflächenrauigkeit oder gar die Porosität der Oberfläche nicht mehr ins Gewicht fällt, können die Proben hingegen hilfreich sein. Die im Vergleich mit Zahnschmelz hohe chemische Reinheit erlaubt ein definiertes chemisches Verhalten insbesondere der Oberfläche. Sofern für Experimente ein Ort auf der Probenoberfläche bestimmt werden kann, sind auch Messungen zwischen Poren möglich, da diese i.d.R. in Gruppen auftreten und dazwischenliegende Bereiche porenfrei sind.

Um bei Experimenten zur Charakterisierung der Proben definierte Verhältnisse zu gewährleisten, wurden die Proben nach der Reinigung trocken gehalten. Zum einen ist der trockene Zustand immer wieder leicht und reproduzierbar zu erzeugen, zum anderen ist davon auszugehen, dass Zahnschmelz aufgrund des enthaltenen Wasseranteils bei einem Aufheizen über 100 °C mehr Wasser verliert als dies bei den synthetischen Proben der Fall sein wird. Die in dem Holcomb-Papier [80] angegebenen Materialverluste von maximal 10% beim Heizen von Zahnschmelz auf 100 °C sind somit als Maximalwerte anzusehen, die von den Pelletproben nicht erreicht werden. Obwohl Zahnschmelz in seiner natürlichen Umgebung immer feucht gehalten wird (Speichel in der Mundhöhle), wurden Pulver und Pellets daher aus Gründen der experimentellen Kontrolle trocken gelagert. Der Einfluss der Lagerung – feucht vs. trocken – sollte allerdings systematisch untersucht werden: Auf HAP-Oberflächen wurden unterschiedliche Adhäsionen von Zellen jeweils auf trocken bzw. feucht gelagerten Oberflächen gefunden [62, 81], und es ist zu erwarten, dass dieses Verhalten auch bei den Experimenten mit synthetischen HAP-Proben auftritt.

Das hier zum Trocknen aufgeheizte synthetische Material enthält nominell überhaupt kein Wasser, wie es als Kristallwasser z.B. im Falle vieler Salze gebunden sein kann. Nach dem Trocknen kann allerdings ein hygroskopisches Verhalten des Pulvers beobachtet werden, das

sich durch eine Gewichtszunahme bei offener Lagerung bemerkbar macht. Hier stellt sich die Frage nach der Herkunft des Hygroskopie des HAP2-Pulvers. Einerseits könnte das nanoskalige Pulver aufgrund seiner großen Oberfläche und seiner Hydrophilie bereits Wasser an den Oberflächen der Kristallite binden. Durch das Heizen könnten allerdings aus der Kristallstruktur die relativ leicht gebundenen Hydroxidgruppen mobilisiert werden, die ihrerseits zu Wasser reagieren können (sog. **Dehydroxylierung**, [82]).

Für Zahnschmelz ist bekannt, dass er beim Aufheizen Wasser freisetzt [80], was aber aufgrund des Wassergehalts des Gewebes auch nicht weiter verwunderlich ist. Wenn allerdings durch ein Aufheizen rein synthetischen HAPs dieses danach hygroskopische Eigenschaften besitzt, kann gefragt werden, ob das an Zahnschmelzproben durch Aufheizen freigesetzte Wasser wirklich ausschließlich das physikalisch gebundene Wasser des Gewebes darstellt. Denkbar wäre auch hier eine bereits bei relativ niedrigen Temperaturen einsetzende Dehydroxylierung und die daraus resultierende Freisetzung von Wasser. Die Datenlage in Hinblick auf die langfristige Freisetzung von Wasser bei trockenen Umgebungsbedingungen der Pellets und die dadurch bedingte Umwandlung des HAP-Materials ist unzureichend für eine abschließende Bewertung.

Nachträglich wurden XRD-Messungen an gesinterten HAP2-Proben durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Anhang B gezeigt und eine entsprechende Diskussion geführt.

### 5.4 Messung der Fluoridverteilung

In der Zahnmedizin besteht ein besondere Interesse, die Eindringtiefe<sup>4</sup> und die Konzentration von Fluorid in Zahnschmelz zu bestimmen. Empirisch ist bekannt, dass die oberflächliche Anwendung fluoridhaltiger Materialien auf Zahnschmelz (z.B. durch Zahnpasta) eine geringere Zahl kariesbefallener Zähne zur Folge hat [83]. Der Mechanismus, der dieses Ergebnis bedingt, ist hingegen bis heute nicht zweifelsfrei geklärt. Damit steht ebenfalls noch die Frage offen, welches die entscheidenden Änderungen sind, die durch Fluoride hervorgerufen werden: Bekannt ist, dass sie einerseits Einfluss auf physiologische Vorgänge von Bakterien nehmen [84], sie verändern aber auch die unbelebten, mineralischen Bestandteile des Gewebes [85].

Zur Bestimmung der Eindringtiefe sind in den vergangenen Jahren einige Studien durchgeführt worden, bei denen Proben, Fluorierungsmittel und andere experimentelle Parameter häufig nicht vergleichbar sind. Tabelle 5.1 gibt darüber einen Überblick.

Um die Wirkung von Fluorid auf HAP als mineralischen Bestandteil des Zahngewebes einschätzen zu können, wurde die relative Zahl eingebrachter Fluoridionen in Abhängigkeit von der Eindringtiefe bestimmt. Eine hierfür geeignete Technik ist die tiefenaufgelöste Photoelektronenspektroskopie, die auf die vorab erläuterte Weise (s. Kapitel 3.1) zur Messung eines Tiefenprofils verwendet wird.

Sollen mit Hilfe der XPS Fremdelemente - solche chemischen Elemente also, die nominell nicht in dem Material enthalten sein sollten - in einer Probe nachgewiesen werden, dann lassen sich

---

<sup>4</sup>Der Begriff *Eindringtiefe* wird in dieser Arbeit synonym zu den Begriffen *Abklinglänge* oder *Abklingkonstante* verwendet.

Tabelle 5.1: Vergleich verschiedener experimenteller Parameter während einer HAP-Fluorierung und der daraus resultierenden Eigenschaften untersuchter Fluoridschichten in der Literatur. Die Experimente sind nach fallendem pH-Wert während der Fluorierung sortiert. (Reprint with permission from [86], Copyright 2010 American Chemical Society)

Probenmaterial	Fluorierungsmittel	pH-Wert	F <sup>-</sup> Konzentration	Einwirkzeit und Temperatur	Abklügelänge (nm)	Referenz
HAP	NaF	6,2	250 ppm	5 min, 37 °C	6	selbst gemessen
BE <sub>n</sub>	NaF	6,0	1000 ppm	10 min, 37 °C	9(S), 191(B)	[87]
BE <sub>n</sub>	NaF	6,0	30 ppm	10 min, 37 °C	325	[87]
BE <sub>n</sub>	NH <sub>4</sub> F	6,0	1000 ppm	10 min, 37 °C	46	[87]
BE <sub>n</sub> , HAP	NaF	5,5	22000 ppm	30 min, 35 °C	12(S), 60(B)	[88]
BE <sub>n</sub>	NaF	5,0	950 ppm	30 min, 37 °C	720	[89]
BE <sub>n</sub>	Aminhydrofluorid	5,0	0,1 wt.% F <sup>-</sup>	30 min, 37 °C	550	[89]
HAP	Olafur <sup>®</sup>	4,2	250 ppm	5 min, 38 °C	1,5(S), 77(B)	selbst gemessen
BE <sub>n</sub>	NaF	4,0	950 ppm	30 min, 37 °C	750	[89]
BE <sub>n</sub>	Aminhydrofluorid	4,0	0,1 wt.% F <sup>-</sup>	30 min, 37 °C	1130	[89]
BE <sub>n</sub>	NH <sub>4</sub> F	4,0	1000 ppm	10 min, 37 °C	910	[87]
HAP	Olafur <sup>®</sup>	4,0	250 ppm	1 min, 20 °C	4500	[90]

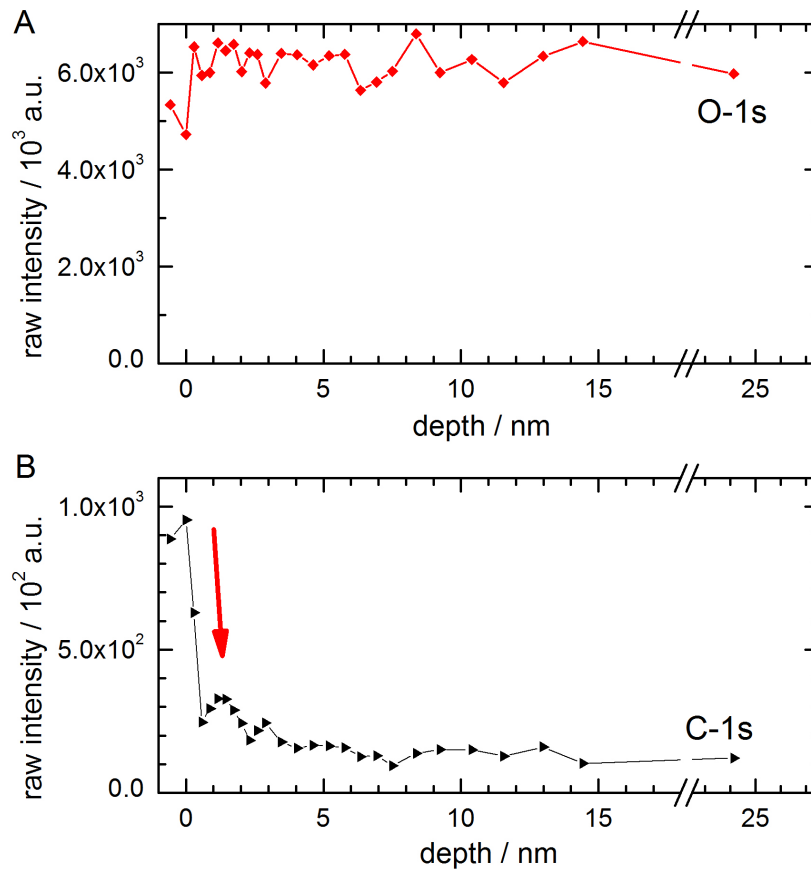


Abbildung 5.7: Auftragung von Rohdaten aus einer Tiefenprofilmessung mit XPS. Die Intensität einer Linie eines Rumpfelektrons (in A oben die einer Sauerstoff-1s-Linie) ist als Funktionswert gegen die Abtragtiefe aufgetragen. Jeder Messpunkt repräsentiert eine XPS-Messung und einen vorhergehenden Argonionenbeschuss. Der Materialabtrag als Funktion der Ar-Ionendosis kann ausgemessen werden und dient bei der gezeigten Messung als Eichgrundlage für die Schritte zwischen den einzelnen Messungen. In B unten ist beispielhaft eine Kohlenstoff-1s-Linie abgebildet. Kohlenstoff ist hauptsächlich an der Oberfläche vorhanden und besitzt daher an der Oberfläche in Tiefenprofilen einen charakteristischen, hier durch einen Pfeil angedeuteten starken Abfall der Intensität. An diesem wurde bei den Messungen die Lage der Probenoberfläche bestimmt.



deren relativen Atomzahlen sehr genau bestimmen. Dies gilt umso mehr, falls die Elektronenenergien dieser Elemente im Vergleich mit denjenigen der Probe unterschiedlich sind.

Im Falle des Fluor in fluoriertem HAP (fHAP) liegt die 1s-Linie isoliert von weiteren Spektrallinien, ihre Intensität ist jedoch wegen des geringen Fluoranteils in der Probe gering. Dadurch sind lange Messungen notwendig, um einen hinreichend großen Signal-Rausch-Abstand bei der F-1s-Energie (684.9 eV [64]) zu erhalten.

## Fluorierung

Als Fluorierungsmittel kamen an den geschliffenen und polierten HAP2-Proben in einem Fall eine Natriumfluorid-Lösung (246 ppm Fluorid, recipe 300/053, Fa. Gaba, Schweiz) mit einem pH von 6,2 zum Einsatz, im anderen Fall eine Aminfluoridlösung (Olaflur<sup>®5</sup>, 242 ppm Fluorid, recipe 297/038, Fa. Gaba, Schweiz), deren pH-Wert zu 4,2 bestimmt wurde.

Um alltägliche Bedingungen wie während der Anwendung im Mundraum zu simulieren, wurden die Lösungen während der Fluorierung in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 36 - 37 °C gebracht. Die Pellets wurden jeweils in eine der Fluorierungslösungen eingetaucht, nach 5 min wieder herausgenommen und anschließend vorsichtig mit Milli-q-Wasser aus einer Spritzflasche abgespült, um auf der Probe befindliche Reste der Fluorierungslösung zu entfernen. Während der Fluoreinwirkung entstandene Oberflächenschichten sollten aber erhalten bleiben, so dass ein zu starkes Spülen mit dem Risiko behaftet gewesen war, eine anhaftende Schicht zu entfernen. In Hinblick darauf wurde auf die Anwendung eines Ultraschallbades verzichtet. Anschließend wurden die Pellets direkt ins Vorkammervakuum des Elektronenspektrometers eingeschleust, wo noch vorhandenes Spülwasser auf der Oberfläche der Proben verdampfte.

Die Oberfläche eines fluorierten Pellets lässt sich mit bloßem Auge nicht von derjenigen eines unfluorierten unterscheiden, und zwar auf gleich welche Weise die Fluorierung durchgeführt wurde. Es kann zwar zu strukturellen Änderungen auf mikroskopischer Skala während der Fluorideinwirkung kommen (s.u.), dies hat aber keine Konsequenz für das makroskopische Erscheinungsbild der Oberfläche. Daher sieht auch die behandelte Probe weiß bis bläulich aus.

Bei Olaflur<sup>®</sup> handelt es sich um die wässrige Lösung eines Diaminfluorid, das aufgrund seiner Struktur (polare Bindungen am einem Ende, aliphatische Restgruppe am anderen Ende des Moleküls) einen stark amphiphilen Charakter besitzt. Daraus resultiert eine starke Oberflächenaktivität und eine starke Herabsetzung der Oberflächenenergie von Wasser als Lösemittel. Eine wässrige Olaflur<sup>®</sup>-Lösung benetzt annähernd alle Oberflächen, und die geringe Oberflächenspannung lässt das Mittel in alle Risse oder Unebenheiten auf einer Oberfläche eindringen. Aufgrund dessen wird Olaflur<sup>®</sup> gerne als Fluorid-Lieferant in Zahnpflegeprodukten eingesetzt, da es wegen seiner Amphiphilität in kleinste Ritzen eindringt, wodurch es auch dort zu einer Fluorierung des Zahngewebes führt.

<sup>5</sup>Es handelt sich dabei um eine wässrige Lösung von N,N,N'-Tris(2-hydroxyethyl)-N'-octadecyl-1,3- diaminopropanidhydrofluorid

## Messung

Alle Messungen wurden mit einem ESCA Lab Mk II Photoelektronen-Spektrometer (Vacuum Generators, Hastings, UK) im Ultrahochvakuum bei Drücken um  $10^{-10}$  mbar in Normalemission durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit charakteristischer Röntgenstrahlung einer Aluminium-Anode ( $K_{\alpha}$ , 1487 eV). Die Zusammensetzung der Pelletoberflächen wurde anhand der folgenden Spektrallinien untersucht: Ca-2s, Ca-2p, O-1s, P-2s, P-2p, F-1s und C-1s. Darüberhinaus wurde die Na-1s-Linie untersucht, deren Intensität im Falle der NaF-Fluorierung ein weiteres Maß für die Eindringtiefe des Fluorierungsmittels darstellt. Die zusätzlich untersuchte N-1s-Linie im Falle der Olaflur<sup>®</sup>-präparierten Oberfläche ist ein Maß für das Vorhandensein des stickstoffhaltigen Aminfluorids auf der untersuchten Oberfläche.

Zur Bestimmung der relativen atomaren Zahlenverhältnisse der beteiligten Elemente wurden die spektralen Linienintensitäten zum jeweiligen orbitalen Wirkungsquerschnitt nach Yeh und Lindau [64] normiert. Das Atomzahlenverhältnis ergibt sich dann unter Vernachlässigung der Energieabhängigkeit aus Gleichungen 3.3 und 3.4. Für Calcium und Phosphor wurde es aus den Ergebnissen beider gemessener Orbitale (jeweils 2s und 2p) der Mittelwert bestimmt. Details zur Erstellung der Tiefenprofile und zum genauen Ablauf der Messung finden sich in Kapitel 3.1.

## Ergebnisse

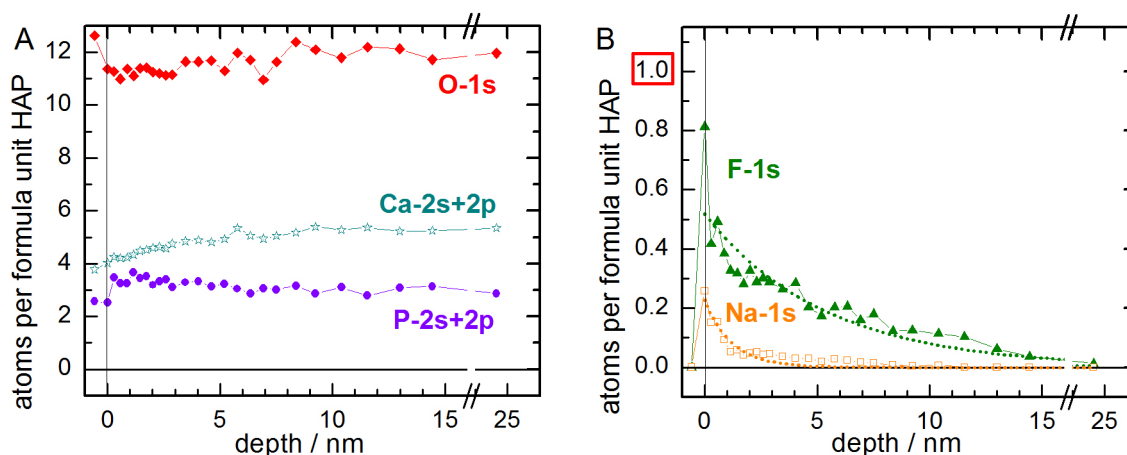


Abbildung 5.8: Verlauf der Tiefenprofile der relativen Atomanzahl von Calcium, Sauerstoff, Phosphor sowie Natrium und Fluor, jeweils bezogen auf in einer Formeleinheit HAP mit drei Phosphoratomen, nach der Anwendung einer Natriumfluoridlösung. Die gepunkteten Linien in Abbildung B sind als exponentiell abfallend angenommene Anpassungsfunktionen für die Zahl von Natrium- und die Fluoratomen.

Das Ergebnis einer XPS-Untersuchung kann für unterschiedliche Atomsorten berechnet werden,

wenn dafür bestimmte Annahmen gemacht werden. Dazu zählt, dass die Zahl der Phosphoratome pro Formeleinheit HAP für große Tiefen zu drei angenommen werden darf. Nach Chairat [91] ist der Phosphat-Tetraeder wichtiger Bestandteil der HAP-Struktur. Während durch Ersetzungsreaktionen sowohl das Metallion wie auch das Hydroxid- bzw. das Halogenidanion strukturerhaltend ersetzt werden kann, ist dies beim Phosphation nicht möglich. Wird also angenommen, dass es sich in großer Tiefe um Hydroxylapatit handelt, so muss der Phosphatanteil und damit auch die Zahl der Phosphoratome in dem tiefliegenden Material pro Formeleinheit gerade drei betragen.<sup>6</sup>

Die Fluorierung betrifft in erster Linie die chemische Zusammensetzung oberflächennaher Schichten, innerhalb derer eine Abweichung von den stöchiometrischen Verhältnissen reinen Hydroxylapatits nach Fluorierung zu erwarten ist. HAP zeichnet sich durch ein summarisches Atomzahlverhältnis von Ca:P:O wie 5:3:13 aus, und auf dieses Verhältnis müssen somit auch die XPS-Messwerte asymptotisch mit zunehmender Tiefe zulaufen. Die in großen Tiefen ermittelten XPS-Intensitätsverhältnisse repräsentieren somit die stöchiometrische Zusammensetzung von reinem HAP. Die gemessenen Intensitäten aller Elemente können daher auf einen Atomanteil des Phosphor von drei in großen Tiefen bezogen werden. Für Calcium oder Sauerstoff ergeben sich bei stöchiometrischem HAP bei dieser Skalierung für tiefe Schichten Werte von 5 bzw. 13. Abweichungen von den stöchiometrischen Atomzahlverhältnissen treten hingegen dann ein, falls entweder der Phosphatanteil oder der Anteil eines anderen Elementes sich ändert. Ein gemessener Überschuss eines Elements A kann daher auch einen Mangel an Phosphat oder eine Kombination aus Phosphatmangel und Elementüberschuss von A bedeuten.

Nach der Fluorierung ist zu erwarten, dass sich die Zusammensetzung der Probe an der Oberfläche geändert hat. Daher werden sich auch die Atomzahlverhältnisse ändern. Für alle gemessenen Profile werden daher die in großer Tiefe bekannten Verhältnisse als maßgebend betrachtet. Abweichungen davon werden in einem weiteren Schritt anhand der aufgetretenen Atomzahlverhältnisse zur Modellbildung herangezogen werden, so dass am Ende in unterschiedlichen Schichten die zu den gemessenen Verhältnissen passenden chemischen Verbindungen gefunden werden können.

Abbildung 5.8 zeigt den Verlauf relativer Atomzahlen der ausgemessenen Atomsorten pro Formeleinheit als Funktion der Tiefe (vgl. Kapitel 3.1) nach der Fluorierung mit der NaF-Lösung. Der Nullpunkt der Tiefenskala - die Position der ursprünglichen Oberfläche also - ist als senkrechte Linie in die Darstellung eingetragen. Er wird aus der vermessenen C-1s-Spektrallinie bestimmt, da das Kohlenstoff-Signal ein charakteristischer Indikator für oberflächliche Adsorbate wie etwa CO oder Kohlenwasserstoffe ist. Nach dem Einschleußen ins UHV sind diese Verunreinigungen i.d.R. auf jeder Oberfläche der Probe nachzuweisen. Durch eine vorlaufende Reinigung der Oberfläche durch Ar-Ionenbeschuss können diese (die Messung erschwerenden) Anhaftungen von der Probenoberfläche entfernt werden. Damit einher geht ein charakteristischer, steiler Abfall des C-Signals auf einen probentypischen Plateauwert, wie das beispielhaft

<sup>6</sup>Die Wahl von Phosphor als Referenz besitzt den Vorteil, dass leicht vorkommende Ersetzungen von Metallionen oder Halogenid/Hydroxidionen in HAP keinen Einfluss auf das Normal für die Bestimmung von Anzahlverhältnissen besitzt. Grundsätzlich wäre auch ein Bezug auf Sauerstoff oder Calcium möglich, wobei letztgenanntes in der zu diesen Ergebnissen gehörenden Veröffentlichung [86] geschehen ist. Die Verläufe der Elemente haben leicht anderes Aussehen, die relativen Anzahlverhältnisse bleiben jedoch erhalten.

in Abbildung 5.7 B dargestellt ist. Das Erreichen dieses Wertes bzw. die Konstanz des Plateauwertes bei nachfolgenden Messungen zeichnet den Nullpunkt der Tiefenskala aus.

Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Graphen (A) und (B) in Abbildung 5.8. In Teilabbildung A ist der Verlauf der Linienintensitäten von Calcium (Sterne), Phosphor (Kreise) und Sauerstoff (Rauten) als Funktion der Messtiefe aufgetragen. Für große Tiefen wird ein Intensitätsverhältnis Ca:P:O von 5,3 : 3 : 11,9 bestimmt.

Im rechten Teilbild 5.8 B ist der Verlauf der relativen Anzahl der Fluor-Atome nach Fluorierung (Dreiecke) ebenfalls gegen die Tiefe relativ zur ursprünglichen Oberfläche aufgetragen. Er zeigt einen mit zunehmender Tiefe exponentiell abfallenden Verlauf. Von einem initialen Wert von etwa 0,5 nimmt die Intensität mit einer Abklinglänge von 5,4 nm ab. Erwartungsgemäß nimmt die Zahl der Fluoratome also mit zunehmender Tiefe ab. Die zugehörige Abklinglänge  $\xi$  ergibt sich in dem gezeigten Beispiel durch exponentielle Anpassung der Messwerte entsprechend

$$N(x) = N_0 e^{-x/\xi}$$

zu  $\xi_F = 5,4(7) \text{ nm}$  mit einer initialen Atomzahl  $N_0$  von 0,50(3) je Einheitszelle. Die ermittelte Zahl von Natriumatomen (Messwerte als Quadrate in Teilabb. 5.8 B dargestellt) lässt sich analog zur Zahl der Fluoratome ebenfalls leicht mit einem exponentiellen Abfall anpassen. Die Abklinglänge in diesem Fall ergibt sich zu  $\xi_{Na} = 1,2(1) \text{ nm}$  bei einer Anfangszahl  $N_0$  von 0.23(1) direkt an der Probenoberfläche. Die diesen Werten zugrunde liegenden Anpassungsfunktionen sind in Abbildung 5.8 B als gepunktete Linien eingetragen.

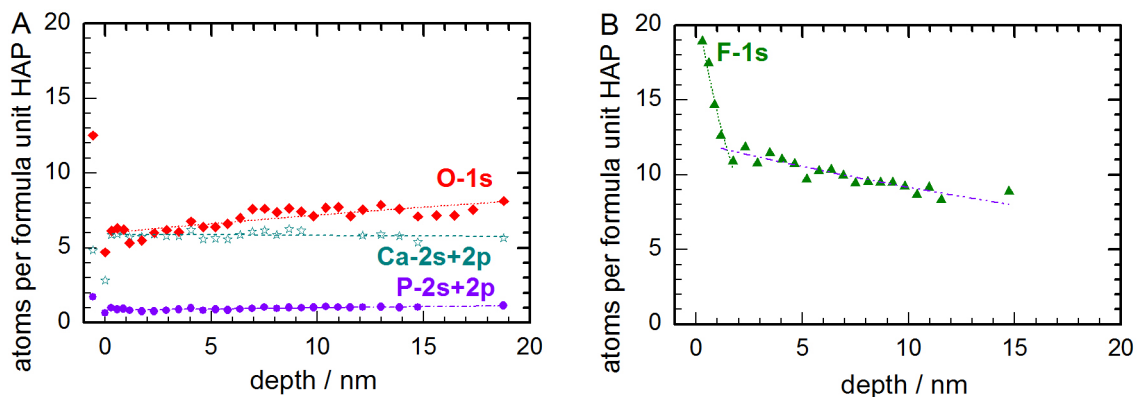


Abbildung 5.9: Verlauf der Tiefenprofile der relativen Atomanzahl von Calcium, Sauerstoff, Phosphor und Fluor, jeweils bezogen auf in einer Formeleinheit HAP enthaltene drei Phosphoratomate, nach der Anwendung einer Olafur<sup>®</sup>-Lösung. Abbildung A zeigt den Verlauf für das Calcium-, Phosphor- und Sauerstoff-, Abbildung B für das Fluorsignal. Sauerstoff- und Phosphorsignal zeigen jeweils einen asymptotischen Anstieg auf den Nominalwert für HAP.

Abbildung 5.9 zeigt wiederum relative Atomzahlen als Funktion der Tiefe, diesmal allerdings nach der Fluorierung eines Pellets mit einer Olafur<sup>®</sup>-Lösung. Die Ergebnisse zeigen wiederum einen asymptotischen Verlauf in Hinblick auf die im Probeninneren bestehenden stöchiometri-

schen Verhältnisse reinen Hydroxylapatits. Insofern sind die o.g. Ausführungen auch für die Proben hier zutreffend.

Die in Abbildung 5.9 A dargestellten relativen Atomzahlen von Ca,P und O verhalten sich am Ende der Messung wie 5:3:12,5. Wird ein exponentiell asymptotisches Verhalten für die Verteilungen angenommen, so dass diese für große Tiefen die in HAP vorliegende Stöchiometrie erreichen (5:3:13), so lassen sich jeweils Abklinglängen  $\xi$  analog zu der Vorgehensweise bei der NaF-fluorierten Probe extrahieren. Es ergeben sich dabei für Calcium 105,8 nm, für Phosphor 129(21) nm und für Sauerstoff 52,7(70) nm, wobei der Wert für Calcium aufgrund der großen Abklinglänge und der im Verhältnis dazu relativ starken Streuung der Messwerte sehr fehlerbehaftet ist. Das Calciumsignal ist in geringer Tiefe außerdem intensiver als für große Tiefen, die Abweichung vom stöchiometrischen Wert beträgt aber lediglich ein Atom pro Einheitszelle. Sauerstoff und Phosphor zeigen einen initial geringeren Wert von 6 bzw. 0,9 Atomen pro Einheitszelle.

Der Verlauf der Zahl der Fluoratome kann im Falle der Olafur<sup>®</sup>-behandelten Probe über einen mehrstufigen exponentiellen Abfall beschrieben werden. Der initiale Wert  $N_0$  von 18 Atomen pro Einheitszelle fällt zunächst sehr stark über eine kurze Tiefenzunahme ab (innerhalb 1,5 nm auf dann nur noch 12,  $\xi = 2,4(2) \text{ nm}$ ). Im Vergleich mit der NaF-fluorierten Probe besitzt die Fluorkonzentration allerdings in einer zweiten Phase eine erheblich größere exponentielle Abklinglänge von 40(5) nm.

## Diskussion zu den XPS-Messungen

Wie bereits in der Einleitung dieses Kapitels dargestellt wurde, ist die Literatur beim Thema Eindringtiefe von Fluoriden in HAP unübersichtlich und uneinheitlich. Tabelle 5.1 führt die Fülle an verschiedenen Größenordnungen für die Eindringtiefe des Fluor in die HAP-Oberfläche gut vor Augen. Zur weiteren Verdeutlichung ist in Abbildung 5.16 für jede zitierte Messung aus der o.g. Tabelle die Abklingkonstante einer exponentiellen Anpassung der jeweiligen Messwerte für die Fluorkonzentration dargestellt. Die großen Unterschiede bei den Ergebnissen wirft die Frage nach dem Grund dafür auf und erschwert darüberhinaus Vergleiche zwischen den Messergebnissen der verschiedenen Autoren.

Die starke Variation der Messergebnisse liegt wahrscheinlich an der Verwendung biologischer Gewebeproben, bei denen individuelle Variation in Dichte und Porosität des Materials auftreten. Diese treten sogar bereits an unterschiedlichen Organen ein und desselben Menschen oder Tieres auf [41]. Bei der Verwendung synthetischer Proben ist die genaue Beschreibung des Herstellungsverfahrens und eine umfassende Charakterisierung der fertigen Probe als auch der Ausgangsmaterialien für eine qualifizierte Beurteilung notwendig. Unterschiedliche Herstellungsverfahren (beispielsweise durch andere Arten der Verdichtung oder Variationen in den Ausgangsmaterialien) können bei sonst gleicher Präparation unterschiedliche Porositäten zur Folge haben.

Eine höhere Porosität kann Auswirkungen auf die Eindringtiefe des Fluors haben. Da nicht bei jeder Studie ([87–90]) ausdrücklich eine Charakterisierung der verwendeten Proben angegeben ist, kann die Variation der Abklingkonstanten durch derartige Unterschiede zwar erklärt

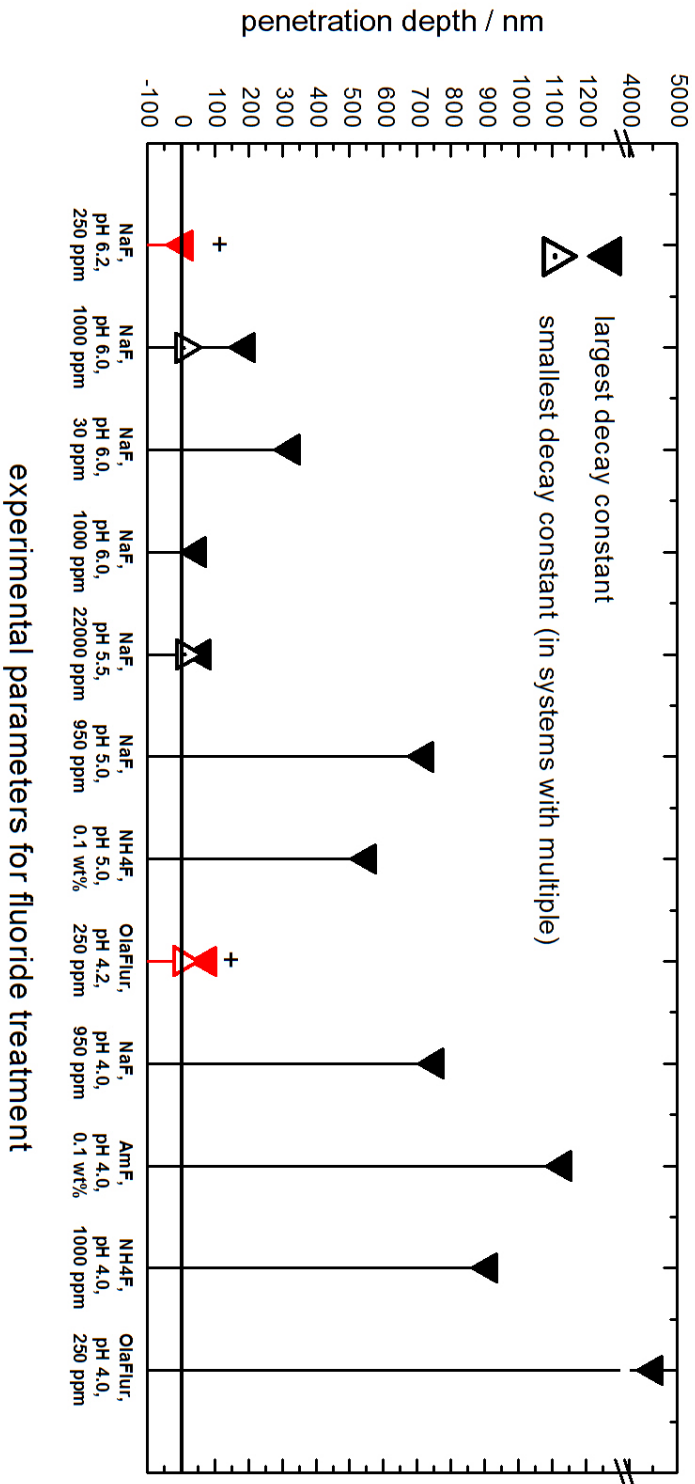


Abbildung 5.10: Visualisierung unterschiedlicher, in der Literatur zu findender (und in Tabelle 5.1 aufgeführter) Abklingkonstanten der Konzentration von Fluor mit der Tiefe in eine HAP-Probe. Auf der Hochachse ist der Logarithmus der Abklingkonstanten abgetragen, in x-Richtung ist jeweils eine kurze Beschreibung der experimentellen Parameter (Fluorierungsmittel, pH-Wert, Konzentration) angegeben. Dargestellt sind (als ausgefüllte Symbole) jeweils die größten Abklingkonstanten. Für mehrstufige Abklingraten von Fluor ergeben sich weitere kleinere Konstanten, die durch die offenen Symbole repräsentiert werden. Die Ergebnisse sind nach dem pH-Wert während der Messung geordnet. Es fällt der Trend auf, dass größere Fluor-Eindringtiefen bei abnehmenden pH-Werten auftreten. Die rot (bzw. mit „+“) markierten Messwerte stammen aus für diese Arbeit durchgeführten Experimenten.

werden, eine zweifelsfreie und nachvollziehbare Erklärung ist hingegen nur durch eine weitere Charakterisierung der jeweils verwendeten Proben möglich.

Wird das Fluorierungsmittel nicht von der Probe entfernt, so bleiben nach Verdunsten des Lösungsmittels (das passiert bei den XPS-Messungen spätestens beim Einschleusen ins Vakuum) fluorhaltige Materialien auf Oberflächen übrig, was zu einer scheinbar starken Fluorierung der Oberfläche führt. Insbesondere durch Porositäten entsteht während der XPS-Messungen dann der Eindruck eines relativ weitreichenden Eindringens im Vergleich mit einer mikroskopisch glatten und geschlossenen Oberfläche. Verstärkt wird dieses Eindringen durch ein Fluorierungsmittel wie Olafur<sup>®</sup>, dessen wässrige Lösung durch die starke Oberflächenaktivität in jede Spalte hinein eindringt. Eine wässrige Lösung von NaF hingegen zeigt keinen Einfluss auf die Oberflächenaktivität. Zwar werden auch hier Poren mit anstehender Fluoridlösung kontaminiert, enge Spalten oder Poren werden hingegen nicht befüllt.

Wurde Zahnschmelz (in [87–90] wurden Rinderzähne als auch menschliche Zähne für die Untersuchungen verwendet) als Probenmaterial verwendet, so liegt eine gewisse natürliche Porosität vor [92], die im Falle der benetzenden Aminfluoride ein erhebliches Eindringen der Lösung in die Schmelzstruktur nahelegt. Details zum Aufbau von Zahnschmelz werden in Anhang A besprochen.

Diffusionsprozesse laufen aufgrund der erheblich geringeren Dichte des Materials im Vergleich zur mineralischen Phase entlang der Einlagerung von organischer Matrix beschleunigt ab. Das resultiert wiederum in größeren Eindringtiefen für von außen angreifende Lösungen. Große Fluorid-Eindringtiefen an natürlichen Schmelzproben sollten daher nicht verwundern, denn ihre Ursache kann jedoch rein strukturell erklärt werden.

Neben strukturellen Variationen der verwendeten Proben treten bei den in Tabelle 5.1 genannten Experimenten auch Abweichungen bei weiteren Parametern auf: Die für die Fluorierung verwendeten Lösungen variieren stark in Konzentration (Wertebereich 30 ppm bis 22000 ppm Fluorid) und pH-Wert (6,2 bis 4,0).<sup>7</sup> Anhand Abbildung 5.16 ist der Trend erkennbar, dass mit abnehmendem pH-Wert eine Zunahme der Abklinglänge einhergeht. Ein Grund dafür könnte in der Neutralisation in die Lösung abgegebener Hydroxidionen und der daraus resultierenden Lösungsneigung eben insbesondere dieser Gruppen liegen. Einmal freigesetzte Hydroxidionen werden bei niedrigen pH nicht wieder in den Kristall eingebaut, sondern reagieren mit vorhandenen Protonen zu Wasser und sind damit dem Kristall dauerhaft entzogen.

Für die Unterschiede in der Eindringtiefe bei den Olafur<sup>®</sup>-behandelten und den NaF-behandelten Pellets aus dieser Arbeit können analog zu vorhergehenden Ausführungen zwei mögliche Ursachen identifiziert werden: Olafur<sup>®</sup> zeigt im Gegensatz zu einer NaF-Lösung eine starke Benetzung jedweder Oberfläche, was sich auf die oberflächenaktiven Eigenschaften des Olafur<sup>®</sup>-Moleküls zurückführen lässt. Risse oder Poren werden durch dieses Fluorierungsmittel aufgefüllt, die Fluorierung beginnt hierdurch bereits in größerer Tiefe. Daneben ist als weiterer Parameter der pH-Wert der Olafur<sup>®</sup>-Lösung zu nennen, der im Vergleich zur NaF-Lösung zwei Skalenpunkte unterhalb liegt. Dem genannten Phänomen der selektiven Lösung von Hydroxidionen folgend werden daher die Gitterplätze der Hydroxidionen im Gitter vakant, die

<sup>7</sup>Da der pH-Wert seinerseits bereits ein logarithmisches Maß ist, beträgt die Konzentration von Protonen bei pH 4 bereits die Hundertfache im Vergleich zu derjenigen bei pH 6.

Ihrerseits sehr attraktive Bindungsplätze für Fluoride darstellen und von den Fluoridionen eingenommen werden. Beides gemeinsam führt zur größeren Eindringtiefe bei der Olafur<sup>®</sup>-Behandlung gegenüber der NaF-Behandlung.

Eine interessante Beobachtung, die auf die für synthetische Proben hohe Dichte der Pellets hinweist, ist der starke Abfall der Stickstoff-1s-Line an der Oberfläche der Pellets im Falle der Olafur<sup>®</sup>-Behandlung. Die Abklinglänge beträgt für das Signal lediglich 0,13(2) nm, während die Abklinglänge des F-1s-Signals mit 49(2) nm mehr als einen Faktor 300 größer ist. Bestimmte Ionen können also in von der Ionensorte abhängigen Maßen in die HAP-Struktur eindringen [92]. Ein Verhalten analog zur NaF-Fluorierung, bei der das Kation einen exponentiell abfallenden Verlauf mit zunehmender Tiefe zeigt, ist allerdings bei der Olafur<sup>®</sup>-Behandlung nicht erkennbar. Das Diamin-Kation scheint also zu groß zu sein, um in die HAP-Struktur der Pellets eindringen zu können. Dies schließt zum anderen eine große Porosität des Pellets aus, denn auch dann wären größere Eindringtiefen – erst recht für eine oberflächenaktive Substanz wie Olafur<sup>®</sup> – als einige Bruchteile von Nanometern zu erwarten. Die Proben sind daher als dicht anzusehen.

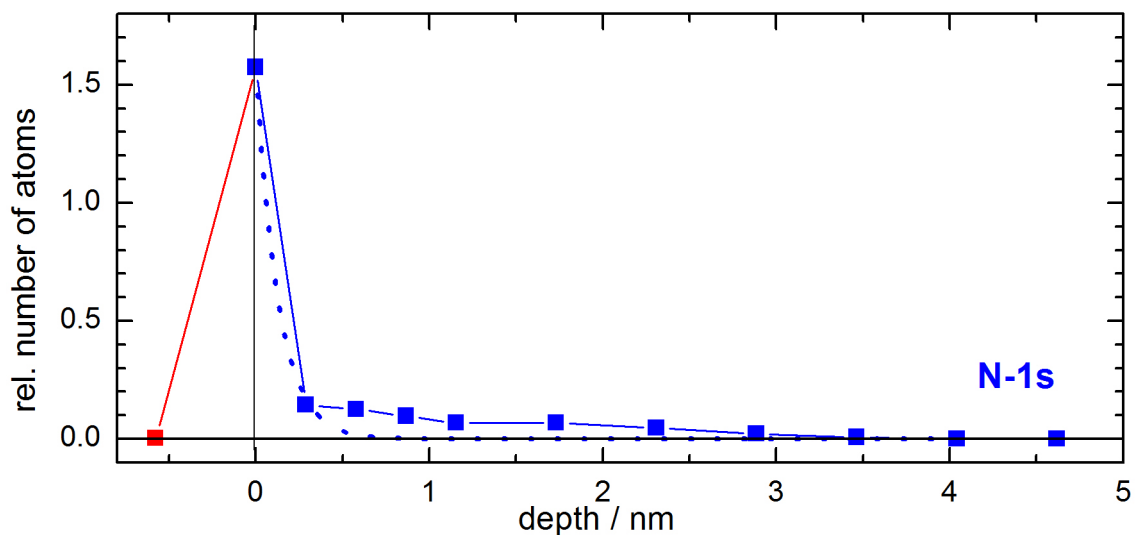


Abbildung 5.11: Verlauf der Intensität der N-1s-Linie mit zunehmender Tiefe. Würde das Olafur<sup>®</sup> in signifikanter Menge in die Probe eindringen, so würde das Signal nicht einen so stark bereits an der Oberfläche abfallenden Verlauf zeigen.

Während im Fall des NaF-fluorierten Materials keine starken Änderungen der stöchiometrischen Elementverhältnisse auftreten, ist dies im Fall des Olafur<sup>®</sup>-behandelten Materials anders. Abgesehen vom Fluor zeigen die anderen beteiligten Elemente in den atomaren Anzahlverhältnissen starke Veränderungen in ihrer relativen Häufigkeit. Die überproportionale Zunahme der Fluor-Intensität weist auf chemische Änderungen der Proben im Bereich ihrer Oberfläche hin. Ein Beweis für eine während der Fluorierung aufgetretene chemische Reaktion wird durch einen *chemical shift* der Ca-2p-Linie erbracht. Die Bindungsenergie der Elektronen



nimmt um etwa 1,2 eV zu und entspricht damit dem Wert der Bindungsenergie in Fluorapatit ( $\text{CaF}_2$ ). Zusammen mit den Ergebnissen, die im nachfolgenden Unterkapitel 5.5 aufgeführt sind, führt eine Behandlung mit Olafur<sup>®</sup> offenbar zur Bildung einer Oberflächenschicht aus Calciumfluorid. Diese Bildung lässt sich am XPS-bestimmten Atomzahlverhältnis Ca:F nachverfolgen: Dazu wird die extreme Überhöhung im ersten, an der Oberfläche sehr stark abfallenden Bereich der Fluoridkonzentration zunächst als Oberflächeneffekt (z.B. durch adsorbiertes Fluorierungsmittel) vernachlässigt. Für den zweiten Bereich der Fluorkurve aus Abbildung 5.9 B kann die relative Zahl der Fluoridatome direkt an der Oberfläche extrapoliert werden. Der damit erhaltene, initiale Wert liegt gerade bei 12 Atomen Fluor, während die relative Atomzahl von Calcium an der Oberfläche gerade 6 Atome beträgt. Das Verhältnis Ca:F beträgt dann gerade  $6:12 = 1:2$  und entspricht dem stöchiometrischen Verhältnis der beiden Atomsorten in  $\text{CaF}_2$ . Abweichung könnte aus einer nicht geschlossenen Oberflächenschicht resultieren, genauso wie die Intensitäten der anderen Elemente.

Bei all den bisher geführten Diskussionen wurde immer davon ausgegangen, dass es sich bei dem vorliegenden Probenmaterial tatsächlich um stöchiometrisches Hydroxylapatit handelt. Tatsächlich zeigt sich ein relativ zu Phosphor sichtbarer Mangel an Sauerstoff. Der nominelle Messwert beträgt etwa 12 Atome pro Einheitszelle und damit eines weniger als von der Chemie gefordert.

Grund hierfür könnten chemische Zerfallsreaktionen sein, die bereits bei niedrigen Temperaturen auftreten, wie sie zum Trocknen des HAP-Pulvers verwendet worden sind. Davon betroffen könnten in erster Linie die Hydroxidgruppen sein, die vergleichsweise schwach gebunden sind. Gegen diese These spricht die Beobachtung, dass nachweisbare thermisch induzierte Zerfallsreaktionen erheblich höhere Temperaturen ab etwa  $1000^\circ\text{C}$  erfordern [93]. Die nach der Trocknung nachweisbare Hygroskopie des Pulvers kann hingegen rein physikalisch durch die große Oberfläche der verwendeten HAP-Pulver mit nanoskaligen Körnern erklärt werden, auf deren Oberfläche viel Platz eine Wasseradhäsion ist.

Eine Quelle für Abweichungen von XPS-Ergebnisse trotz perfekter Probe kann auch der Abtrag der Oberfläche durch Ar-Ionen-Beschuss darstellen, nämlich falls unterschiedliche Atomsorten unterschiedlich stark davon betroffen sind. Je länger eine Oberfläche bombardiert wird, umso ausgeprägter tritt die durch den ungleichen Abtrag verschiedener Atomsorten bedingte Veränderung in der Zusammensetzung in den Vordergrund. Eine natürliche Grenze dieser Entwicklung entsteht durch die zunehmende Wahrscheinlichkeit, mit der die angereicherten Atome während des Bombardements getroffen werden. Daraus entsteht ein Gleichgewicht zwischen der verminderten nativen Abtragerate eines Elements einerseits und der Erhöhung derselben durch den Überschuss des Elements an der Oberfläche andererseits. Der Effekt kumuliert sich, so dass für große Tiefen dieser Effekt ein Maximum erreicht, genau dort also, wo die Bestimmung der Nominalwerte der Atomzahlverhältnisse stattfindet. Daher kann dieser Effekt Auswirkungen auf die gesamte Messung besitzen.

Wie in der Einführung der Messmethode in Kapitel 3.1 erläutert wurde, ist die freie Weglänge der Elektronen nach ihrer Anregung energieabhängig. Ein O-1s-Elektron besitzt bei Anregung mit der Cu- $K_\alpha$ -Frequenz (entsprechend 1486 eV) aufgrund seiner Bindungsenergie innerhalb des Probenkörpers eine Energie von 950 eV. Die Phosphorelektronen hingegen Energien je nach Herkunft (2s- oder 2p-Orbital) zwischen 1300 und 1350 eV. Aufgrund dieser Energiedifferenz ist das für die XPS damit sichtbare Probenvolumen im Falle der Phosphorelektronen größer

als im Falle der Sauerstoffelektronen. Es wird also relativ zum Phosphor immer zu wenig Sauerstoff gemessen, was einen Fehler der Messwerte von bis zu 10% ausmachen kann. Zur Energieabhängigkeit der freien Weglänge siehe [94], Kapitel 1.2 („The Electron Escape Depth“).

Die letzten beiden genannten Effekte können die Abweichungen der XPS-Messergebnisse von den Sollwerten erklären. Sie machen auch die Grenzen der Messmethoden klar und stecken keine unwesentlichen Fehlerintervalle ab, die bei der Interpretation der Messergebnisse zu berücksichtigen sind.

Während der Erstellung der gezeigten XPS-Tiefenprofile (Abbildungen 5.8 und 5.9) wechseln sich Mess- und Bearbeitungsschritte der Oberfläche ab. Neben dem leicht nachweisbaren Entfernen von Material kann aus dem Beschuss der Oberfläche mit Argon-Ionen auch eine Zunahme der Oberflächenrauigkeit resultieren. Daraus entstehende Fehler in der Tiefenangabe werden aber durch zwei Faktoren minimiert: Zum einen ist die Eichmessung mit derselben Problematik behaftet, so dass bei der notwendigen Bestimmung der Lochtiefe ähnlich wie bei der XPS-Messung der Mittelwert aus einem möglicherweise aufgerauten Oberflächenstück bestimmt wird. Relativ zur durchschnittlichen Oberfläche tiefer liegende Bereiche mit geringer Intensität einer bestimmten Linie werden z.B. durch höherliegende Bereiche mit größerer Messintensität kompensiert. Zum anderen darf für die hier gezeigten Messungen ein stetiger Verlauf der relativen Atomzahlen von Fluor unterstellt werden. Zwar handelt es sich um gesinterte Pulverproben, und entlang der Ränder sind Konzentrations sprünge des Fluor denkbar. Allerdings mittelt die XPS als Messmethode über einen makroskopischen Bereich, innerhalb dessen die Struktur der Proben ein immer gleichwertiges Verhältnis von Körnern zu Randlängen aufweist. In erster Näherung werden sich die Messwerte daher gerade ausmitteln.

Da die HAP-Probe ein elektrischer Isolator ist, kann sich die Probenoberfläche durch in das Probenmaterial implantierte Ar-Ionen aufladen. Die Emission von Photoelektronen führt zu demselben Effekt. Die resultierende Netto-Aufladung führt zu einer über das gesamte XPS-Spektrum der Probe vorhandenen Verschiebung und kann bei länger andauernden Messungen eine Eichung notwendig machen. Da aber lediglich die Lage aller Linien gleichzeitig verschoben wird, ist nach wie vor eine eindeutige Identifikation aller Linien möglich. Eine Änderung der Intensität wird durch die Aufladung nicht herbeigeführt. Eine Zeitabhängigkeit der Verschiebung in der Größenordnung der Dauer einer Messung konnte nicht beobachtet werden, was einen stabilen Ladungszustand der Probe während der Messung belegt und daher auch eine einfache Kompensation erlaubt.

### Chemische Zusammensetzung

Werden die relativen Atomzahlen aller *Elemente* mit zunehmender Tiefe kombiniert betrachtet, so lassen sich Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der Probe in unterschiedlichen Tiefen ableiten. Sofern Kandidaten von chemischen Verbindungen vorliegen, die typischerweise nach Reaktionen von HAP in fluoridhaltiger, saurer Umgebung vorhanden sind, so lassen sich für den interessanten Fall der Olaflur<sup>®</sup>-behandelten Proben durch Linearkombination der Verläufe der einzelnen Elemente das Vorkommen dieser „Kandidatenverbindungen“ ableiten. Das genaue Verfahren ist in [86] beschrieben.

Als Ergebnis werden die in Abbildung 5.12 gezeigten Verläufe von Elementen und daraus folgend von Kandidatenverbindungen gewonnen, die frühere Publikationen zu demselben Thema bestätigen [90], allerdings auf einer um Größenordnungen unterschiedlichen Längenskala.

Abbildung 5.12 zeigt das Tiefenprofil einer mit Olafur<sup>®</sup>behandelten Probe. Teilabbildung A zeigt dabei eine mit Abbildung 5.9 vergleichbare Darstellung, dabei ist allerdings Bezugselement für die Angabe der relativen Atomzahlen Calcium und nicht Phosphor. Um eine Vorstellung von der Verteilung unterschiedlicher Verbindungen in diesem Material zu entwickeln, wurden die in Abb. 5.12 A gezeigten, durch Anpassung kontinuierlich gemachten Verläufe in das folgende Gleichungssystem eingesetzt:

$$\begin{aligned}
 n_{Ca} &= 1 \cdot \alpha + 1 \cdot \beta + 5 \cdot \gamma + 5 \cdot \delta \\
 n_O &= 0 \cdot \alpha + 2 \cdot \beta + 13 \cdot \gamma + 12 \cdot \delta \\
 n_P &= 0 \cdot \alpha + 0 \cdot \beta + 3 \cdot \gamma + 3 \cdot \delta \\
 n_F &= 2 \cdot \alpha + 0 \cdot \beta + 0 \cdot \gamma + 1 \cdot \delta
 \end{aligned} \tag{5.1}$$

Bei den  $n_i(z)$  handelt es sich um die tiefenabhängigen Koeffizienten von Calciumfluorid ( $\text{CaF}_2$ ,  $\alpha(z)$ ), Calciumhydroxid ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ,  $\beta(z)$ ), Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,  $\gamma(z)$ ) und Fluorapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$ ,  $\delta(z)$ ). Einen kontinuierlichen Verlauf unterstellt muss das Gleichungssystem für alle Tiefen eine Lösung besitzen. Es zeigt sich allerdings, dass der Rang des Gleichungssystems nicht voll (also kleiner als vier) ist, so dass es keine eindeutige Lösung dafür gibt. Eine zusätzliche Beziehung kann allerdings abgeleitet werden aus der Annahme, dass sich direkt an der Oberfläche der Probe nur Fluorapatit (FAP) befindet und sich der Anteil von Fluorapatit parallel zur Fluoridkonzentration vermindert. Gleichzeitig wird ein kleiner Fehler in Kauf genommen, indem die Sauerstoffgleichung 5.1 durch die folgende ersetzt wird:

$$n_O = 0 \cdot \alpha + 2 \cdot \beta + 12,5 \cdot \gamma + 12,5 \cdot \delta$$

Das Gleichungssystem reduziert sich dann zu der folgenden eindeutig lösbaren Variante

$$\begin{pmatrix} n_{Ca} \\ n_O \\ n_P \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 1 & 5 \\ 0 & 2 & 12,5 \\ 0 & 0 & 3 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \\ \epsilon \end{pmatrix} \tag{5.2}$$

Aus der zusätzlichen Annahme zum Verlauf der FAP-Konzentration können dann die Funktionen  $\alpha(z)$  bis  $\epsilon(z)$  berechnet werden, wie diese in Abbildungen 5.12 B und C dargestellt sind.

## 5.5 Morphologische Änderungen durch Fluorierung

Die Löslichkeit von HAP hängt in erheblichem Maße vom pH-Wert der Umgebung ab. Daher ist es wichtig zu untersuchen, welchen Einfluss ein Fluorierungsmittel bei unterschiedlichen pH-Werten auf eine HAP-Oberfläche besitzt. Bei den vorab vorgestellten Messungen wurden zunächst verschiedene Fluorierungsmittel bei unterschiedlichen pH-Werten studiert, und es ist

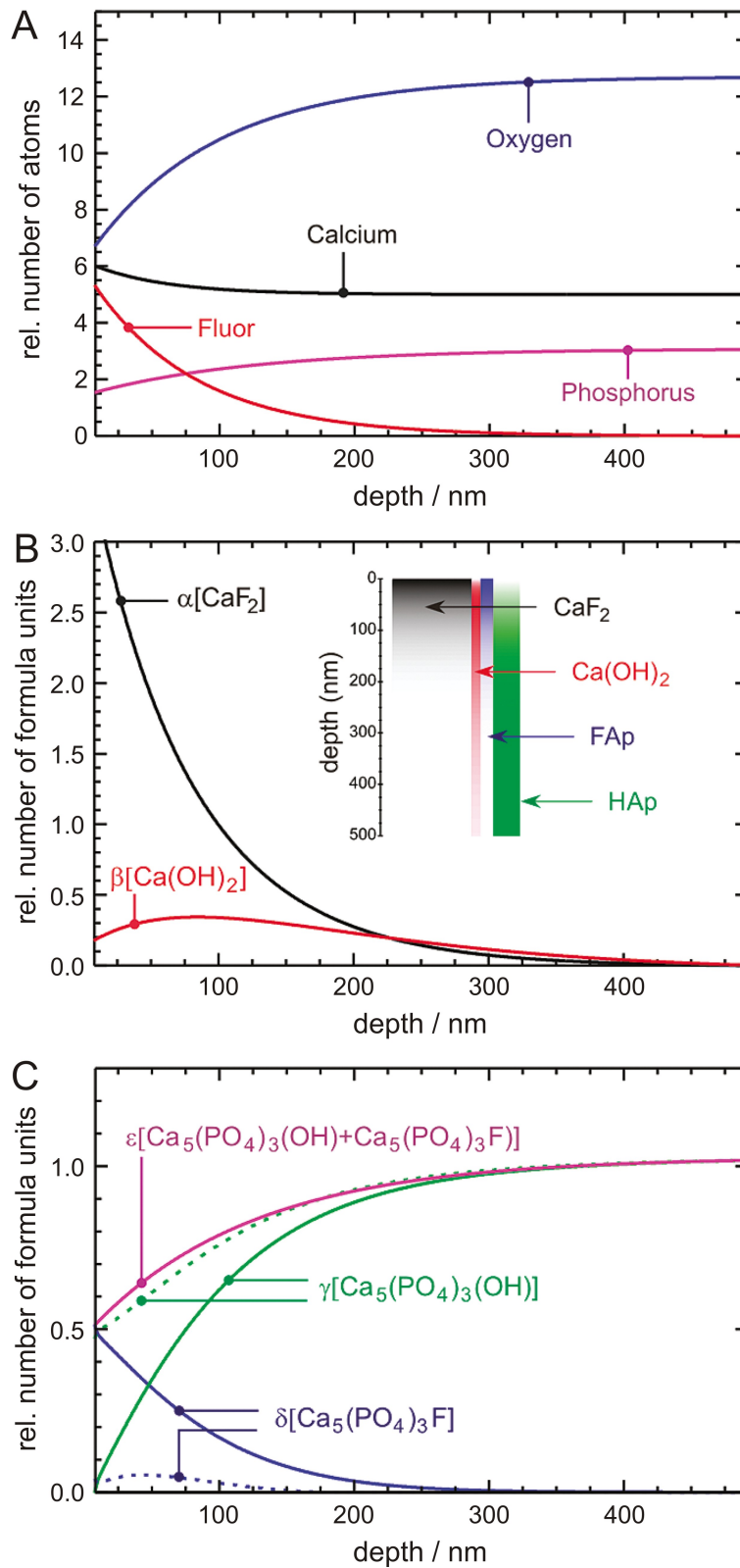


Abbildung 5.12: Aus den in A gezeigten elementaren Tiefenprofilen lassen sich durch Anwendung des linearen Gleichungssystems 5.2 Tiefenprofile für in dem Material enthaltene Verbindungen ableiten (B,C) (Reprint with permission from [86], Copyright 2010 American Chemical Society).

pH	V(HF, 45%) / $\mu\text{l}$	m(NaF) / mg
3	74	26,5
4	7,4	102,1
5	0,74	109,6
6	0,07	110,4

Tabelle 5.2: Übersicht über die Zusammensetzung der zur Fluorierung der HAP-Pellets eingesetzten Fluorierungslösungen.

daher unklar, ob der andere pH-Wert oder das andere Fluorierungsmittel zu den unterschiedlichen Tiefenprofilen geführt haben.

Um den Einfluss des pH-Wertes auf die Fluorierung unabhängig vom verwendeten Fluorierungsmittel zu beobachten, wurden HAP-Pellets mit einer NaF-Lösung bei unterschiedlichen pH-Werten fluoriert.

Die Oberfläche von vier Proben wurde analog zu der Präparation für die Fluor-Tiefenprofilierung vorbereitet. Zusätzlich wurden in zwei weiteren Polierschritten eine Poliersuspension aus 3  $\mu\text{m}$ -Diamanten (Struers Dia-Pro DAC 3 $\mu\text{m}$ ) und eine stabilisierte Suspension aus maximal 30 nm großen Diamanten angewendet (50 ct/l, Liquid Diamond MSY 0-0.03 GAF, Microdiamant AG, Lengwil, Schweiz; beide Suspensionen jeweils auf Struers MD-DAC-Poliervlies). Der Zustand der Probenoberflächen danach ist in Abbildung 5.13 in Form jeweils zweier rasterelektronenmikroskopischer Aufnahmen (REM der Anatomie am Uniklinikum Homburg) dargestellt. Nach dem Polieren zeigen die Oberflächen breit verteilt Verunreinigungen, vermutlich anhaftende Reste des Poliermittels. Eine Behandlung der Probe in einem Ultraschallbad entfernt einige, aber nicht alle dieser Fremdpartikel. An sauberen Stellen sehen die versinterten Proben unter der Sicht eines REM glatt aus, und es sind z.B. keine Polierriefen erkennbar. Die rms-Rauigkeiten dieser Areale wurden mit AFM-Untersuchungen vermessen und liegen unter 10 nm. Diese besonders glatten Oberflächenbereiche (in Abbildung 5.13 A, C, E und G) wechseln sich allerdings auch mit signifikant rauerer Gebieten (Abb. 5.13 B,D,F,H) ab. Jeweils zwei Bilder in einer Zeile gehören zu derselben Probe.

Nach der Abbildung im Elektronenmikroskop wurden die Proben mit jeweils einer der in Tabelle 5.2 genannten Fluorierungslösungen behandelt. Die Pellets wurden hierbei für fünf Minuten der jeweiligen Lösung ausgesetzt und danach mit Wasser vorsichtig abgespült. Die fluorierten Pellets wurden dann erneut in das Elektronenmikroskop eingeschleust um ihre Oberfläche nochmals abzubilden und mit den Aufnahmen von vorher zu vergleichen.

Bei noch relativ hohen pH-Werten kann keine signifikante Veränderung der Pelletoberfläche beobachtet werden (Teilbilder E,F und G,H in Abbildung 5.14). Qualitativ stimmen die Oberflächen mit denen unbehandelter Pellets in der Topografie überein. Erneut sind analog zu Abbildung 5.13 die beiden Phasen unterschiedlicher Oberflächenrauigkeit zu beobachten.

Bei pH 3 (Teilabbildungen A,B in Abb. 5.14) sind offensichtlich Änderungen der Oberflächenmorphologie vorhanden. Es scheint sich bei diesem geringen pH-Wert während der Fluorierung eine Oberflächenkruste zu bilden, die aus einer Zusammenballung kugelförmiger Partikel besteht. Die Änderung der Oberfläche fällt bei pH 4 deutlich geringer aus (Teilabb. C und D).

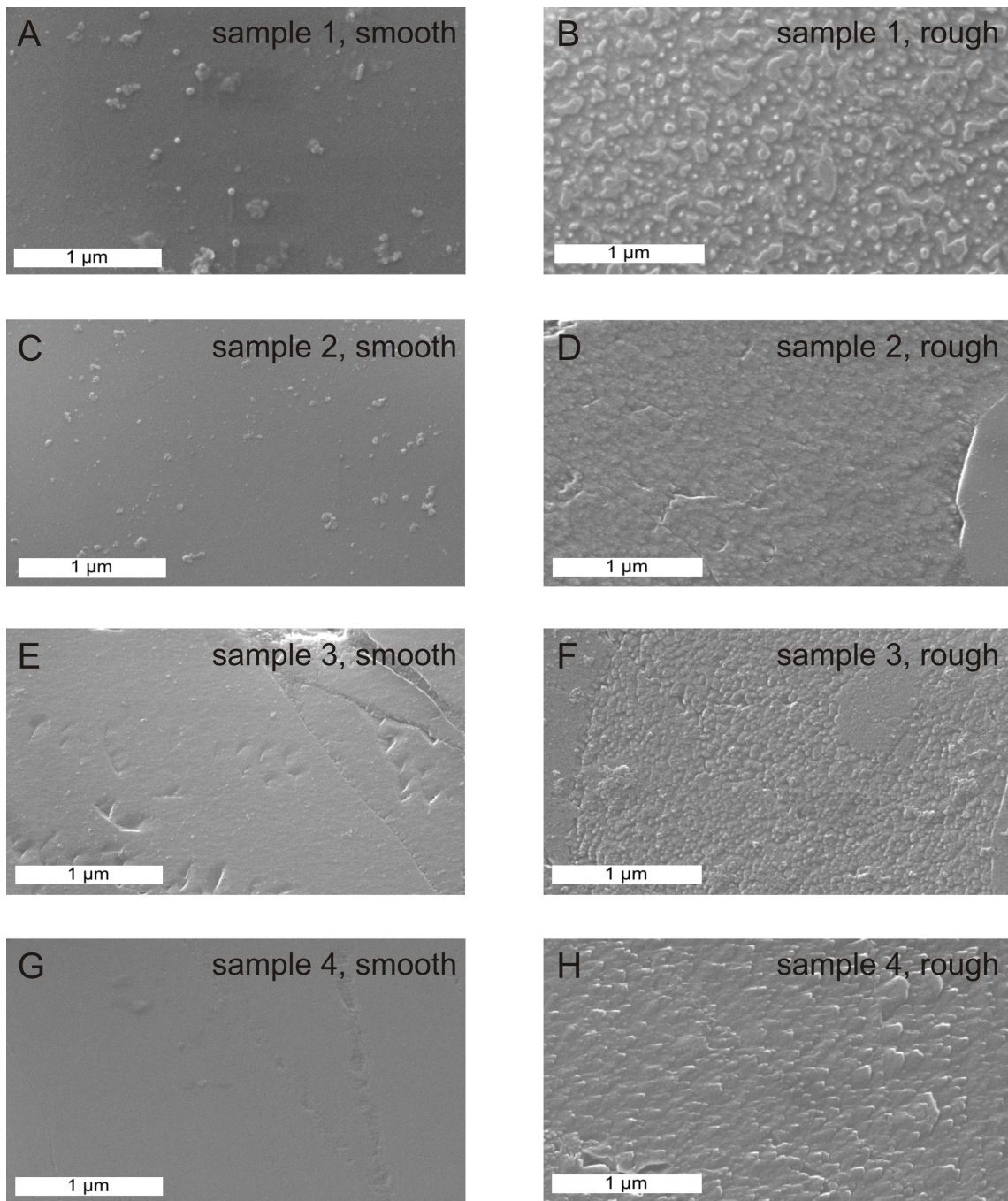
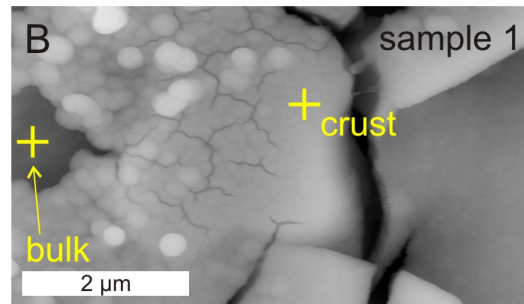
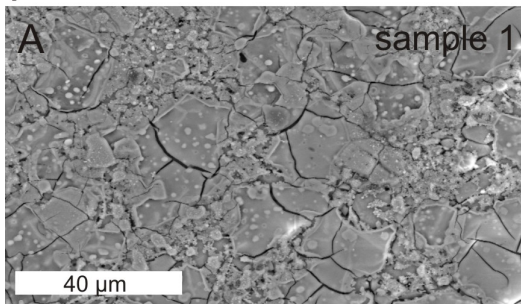


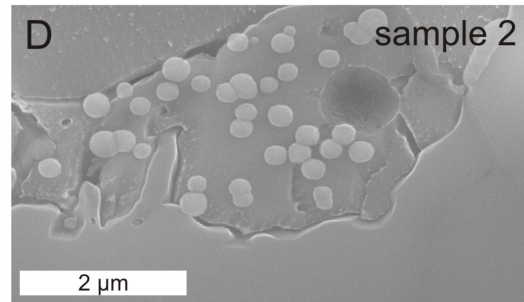
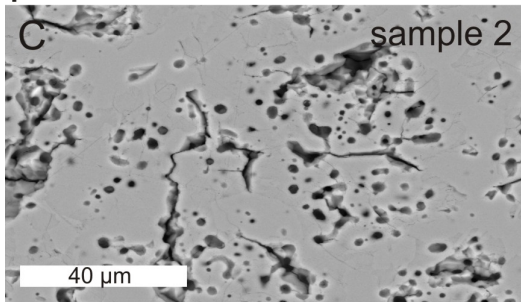
Abbildung 5.13: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Pelletproben nach Politur. Die linke Spalte zeigt glatte, die rechte Spalte Bilder von rauen Bereichen der jeweiligen Probe.



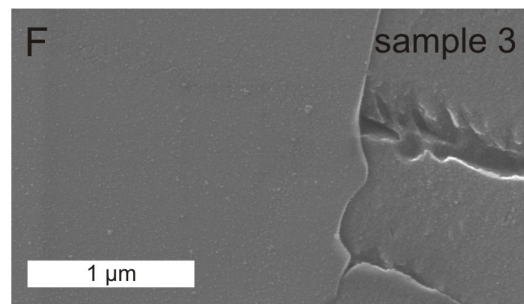
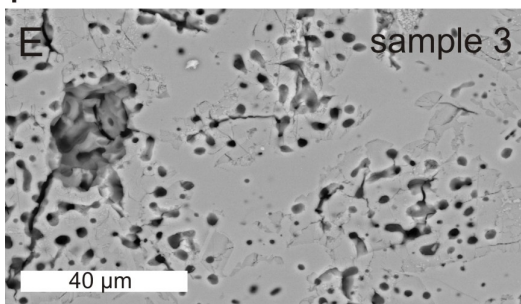
pH 3



pH 4



pH 5



pH 6

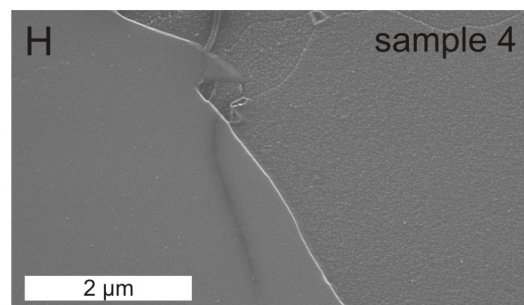
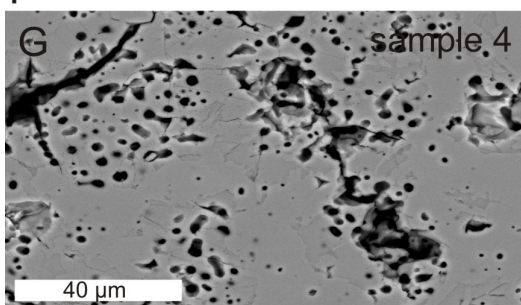


Abbildung 5.14: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen derselben vier Pelletproben wie in Abbildung 5.13 nach Fluorierung mit NaF bei unterschiedlichen pH-Werten. Zwei nebeneinander stehende Bilder zeigen unterschiedliche Vergrößerungen jeweils einer Probe, bei der die zur Fluorierung verwendete Lösung den angegebenen pH-Wert besessen hat.

Die kugeligen Partikel liegen dort nicht im Verbund vor sondern nur isoliert. Auch hat sich die Beschaffenheit der Oberfläche geändert: Während im saureren Falle (pH 3) die Veränderungen praktisch auf der gesamten Oberfläche sichtbar sind, bilden sich bei pH 4 „Kolonien“, innerhalb derer die Kugeln noch vorhanden sind, diese aber nicht mehr miteinander in struktureller Verbindung stehen.

### Zusammensetzung der Oberflächenschicht

Das für die Abbildung der Pelletoberfläche verwendete Elektronenmikroskop<sup>8</sup> ist jeweils mit einem EDX-Spektrometer ausgestattet (EDX: energy dispersive X-ray spectroscopy) und erlaubt daher neben der rein morphologischen Untersuchung zusätzlich die Bestimmung der elementaren Zusammensetzung der Probe. Auf dem Pellet, das bei pH 3 fluoriert wurde, wurden jeweils Messungen auf der entstandenen Kruste („*crust*“) sowie in einem Loch in der Kruste („*bulk*“) an dem dort freiliegenden Material durchgeführt. Die Anregungsenergie dabei betrug jeweils 20 keV.

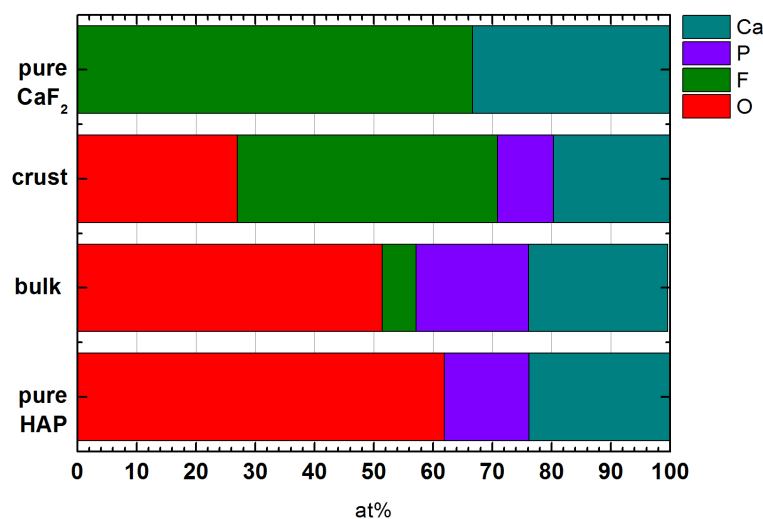


Abbildung 5.15: Aus einer EDX-Analyse abgeleitete elementare Zusammensetzung zweier verschiedener Stellen eines bei pH=3 fluorierten HAP-Pellets (zweite und dritte Zeile). Zum Vergleich sind die theoretischen Werte für eine reine CaF<sub>2</sub>- (erste Zeile) und eine reine HAP-Oberfläche (unterste Zeile) angegeben. Bei den dargestellten Werten wurde jeweils ein Kohlenstoffanteil von ca. 15% vernachlässigt.

Abbildung 5.15 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung unter Vernachlässigung des Kohlenstoffanteils der Probe. Dieser tritt einerseits durch Verunreinigungen des Ausgangsmaterials

<sup>8</sup>Hier möchte ich Jörg Schmauch von der AG Birringer, Universität des Saarlandes, und Norbert Pütz von der Anatomie am Universitätsklinikum Homburg für die Unterstützung bei den REM-Aufnahmen danken.



auf, andererseits aber durch das Aufbringen einer dünnen Kohlenstoffschicht zur Ladungsableitung während der Messungen. Daher ist das Kohlenstoffsignal für quantitative Untersuchungen auch nicht nutzbar. Zusätzlich ist zum Vergleich in der Abbildung die rechnerisch ermittelte Elementverteilung in stöchiometrischem Hydroxylapatit und Calciumfluorid angegeben.

In der Messung „crust“ („Kruste“) zeigt sich dabei der auf die Atomanzahl bezogene größte Anteil an Fluor, der sogar den Anteil der Sauerstoffatome übersteigt. Im Gegensatz hierzu ist der Fluoranteil fernab der Kruste (Messung *bulk*) herabgesetzt, und er beträgt nur noch knapp 5% aller enthaltenen Atome. Daraus lässt sich schließen, dass der größte Anteil des Fluor bei der pH-3-behandelten Oberfläche in der krustenartigen Oberflächenschicht enthalten ist.

Bei der Interpretation der Messergebnisse der EDX-Messungen ist die birnenförmige Form desjenigen Probenvolumens zu beachten, das durch die Anregung mit dem Elektronenstrahl sichtbar wird. Bei den hier gewählten Anregungsenergien von 20 keV hat dieses Volumen nach Goldstein [75] bereits einen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$ . Hierdurch werden in tiefer liegenden Schichten vorhandene Anteile der Probe sichtbar. Aus den REM-Bildern ist der Durchmesser der auf der Oberfläche sitzenden Kugeln von 200 - 500 nm bekannt. Die Bilder der bei pH 3 fluorierten Oberfläche erlauben weiterhin den Schluss, dass die sich bildende Oberflächenkruste eine Dicke besitzt, die vergleichbar ist mit dem Durchmesser der Kugeln. Da die Oberflächenkruste im Vergleich zum Anregungsvolumen somit lediglich halb so dick ist, trägt die darunterliegende Schicht erheblich zum Messergebnis bei. Zu beachten ist daher, dass der Sauerstoff- und Phosphoranteil der Messung *crust* zum großen Teil durch die unter der Kruste liegende Schicht verursacht ist, deren Zusammensetzung der *bulk*-Messung entspricht. Der Fluoridanteil könnte in der Oberflächenschicht daher sogar noch höher als es die Messergebnisse andeuten.

Die EDX-Messungen bei pH-Werten von 4 belegen bereits erheblich geringere Atomzahlanteile für Fluor als im Falle von pH 3. Direkt auf einem der in Gruppen vorkommenden, aber isoliert voneinander liegenden Kugeln ergibt sich ein Fluoranteil von 9,2at%. (Sauerstoff: 49,7at%, Phosphor: 17,3at%, Calcium: 23,8at%; vergleichsweise reines HAP<sup>9</sup>: O: 61,5at%, P: 14,7at%, Ca: 23,8at%). Fernab der Kugeln ist der Fluoranteil unterhalb 1at% und damit nicht signifikant.

Bei pH-Werten von 5 und 6 lässt sich per EDX Fluor nicht mehr in signifikanter Menge nachweisen.

Die Verteilung der Elemente, die in diesem Experiment bestimmt wurde, ist verträglich mit den Messergebnissen, die mit Hilfe der XPS gewonnen wurden: Für niedrige pH-Werte (pH 3 und 4) liefern die Messungen einen weiteren Hinweis darauf, dass an der Oberfläche des Pellets eine chemische Reaktion stattgefunden haben muss (strukturelle Änderungen, EDX-Ergebnisse). Bei relativ hohen pH-Werten entspricht das Messergebnis der Erwartung, denn die mit XPS nachweisbare, nur oberflächliche Einlagerung von Fluor liegt außerhalb der Nachweisschwelle der EDX und geht in der Intensität der anderen Beiträge und des Hintergrundrauschens unter.

Der „*chemical shift*“ bei den XPS-Experimenten wurde beobachtet bei der Verwendung von Olafur-Lösung mit einem pH-Wert von 4,2. Bei den für die EDX-Messungen verwendeten Proben wurde hingegen als Fluorierungsmittel ausschließlich eine Natrium-Fluoridlösung gleicher

---

<sup>9</sup>Wasserstoff wurde vernachlässigt, weil dieser weder mit XPS oder mit EDX zu detektieren ist.

Konzentration (250 ppm  $F^-$ ) verwendet, deren pH-Wert bei gleichbleibender Ionenkonzentration variiert wurde. Auch wenn keine XPS-Tiefenprofilierung mit einer NaF-Lösung bei saurem pH-Wert durchgeführt worden ist, so zeigt sich anhand der EDX-Ergebnisse, dass der pH-Wert während der Fluorierung einen entscheidenden Einfluss auf die daraus folgende Struktur des fluorierten HAP besitzt. Da die Messung der Oberfläche bei der XPS integriert über einen großen Bereich, aber sehr oberflächensensitiv verläuft, kann diese Methode nicht unterscheiden, ob das Fluor in voneinander isolierten Strukturen auf der Oberfläche oder gleichmäßig entlang der gesamten Oberfläche eingebracht ist. Die mit REM/EDX gefundene Konzentration des Fluor auf einzelne Partikel ist insofern verträglich mit den vorher präsentierten Ergebnissen der XPS.

### Fazit

Die vorliegenden HAP2-Proben, die durch ein einfaches Verfahren (uniaxiales Verpressen eines Pulvers und anschließendes Sintern) gewonnen wurden, sind für viele Untersuchungen bereits ein ausreichendes Ersatzmaterial, mit dem die bei Zahnschmelz bestehenden, o.g. Probleme umgangen werden können. Dies gelingt umso besser, je dichter die Pelletproben sind.

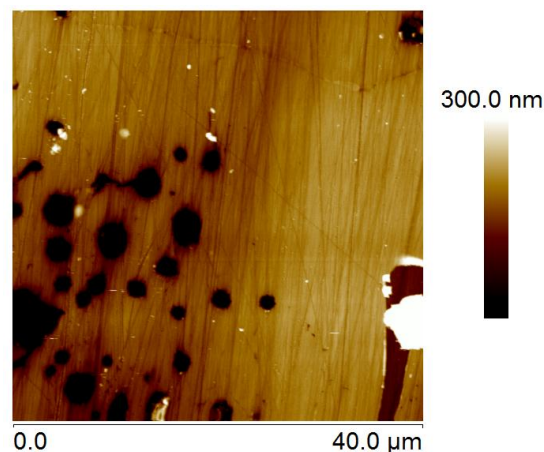


Abbildung 5.16: Kraftmikroskopische Höhenaufnahme einer HAP-Pelletoberfläche nach Schleifen und Polieren, wovon die Bearbeitungsspuren an der Oberfläche als Riefen sichtbar sind. Gegenüber der Oberfläche erhöhte Bereiche sind Staubpartikel oder Reste der Poliersuspension. Die Poren sind meist auf der Oberfläche in unterschiedlich großen Bereichen gruppiert.

Die Oberflächenstruktur spielt bei den verwendeten Proben noch immer eine Rolle (s. Abbildung 5.16). Die Dichte ist mit derjenigen in natürlichem Gewebe vergleichbar, und trotzdem sind Löcher vorhanden. Die Dichte des lochfreien Materials muss daher höher sein. Durch das verwendete Polierverfahren ergibt sich eine rms-Oberflächenrauigkeit unterhalb von zehn Nanometer (RMS auf einem  $10 \times 10 \mu\text{m}^2$  großen, porenfreien Bereich der Oberfläche). Darauf anhaftende Materialien (Fluorierungs-, Schleif- und/oder Poliermittel) können Messwerte

insbesondere im Bereich der Probenoberfläche verfälschen.

Die Probenrauigkeit kann weiter reduziert werden, indem – wie bei den Experimenten zu den morphologischen Effekten der Fluorierung geschehen – beim Poliervorgang weitere Stufen mit einem Poliermittel aus  $3\mu\text{m}$  und  $30\text{ nm}$  großen Diamanten verwendet wird. Die dabei erreichbaren rms-Rauigkeiten liegen auch für die uniaxial verdichteten Proben bereits unterhalb von  $1\text{ nm}$  und lassen somit prinzipiell bereits die Vermessung einzelner Proteinmoleküle zu.

Praktisch gesehen scheitert die Untersuchung des Verhaltens einzelner Makromoleküle auf der Oberfläche allerdings an anderen Problemen: Die optischen Eigenschaften der polykristallinen Proben lassen es selbst nach Politur nicht zu, dass in Reflexion ein bei der Proteinadsorption bereits bewährtes Verfahren wie Ellipsometrie verwendet werden kann. An der Pelletoberfläche wird der größte Teil des einfallenden Lichtes gestreut, so dass die ausfallende Intensität bei diesen Messungen entsprechend gering ist. Die Bestimmung des Polarisationszustandes des reflektierten Lichtes ist daher stark behindert. An anderen Oberflächen (Glimmer, Silizium, etc) konnten mit Hilfe der Ellipsometrie sehr genau adsorbierte Proteinmengen bestimmt werden. Es wäre daher wünschenswert, die optischen Eigenschaften des Materials soweit zu verbessern, dass entsprechende Messungen auch auf den hier vorgestellten HAP-Pellets funktionieren können. Dies könnte durch ein Vergrößern der Kristallite innerhalb des Pelletgefüges erreicht werden.

Eine weitere, jede Art von Messung behindernde Eigenschaft ist die noch immer vorhandene Porosität der in diesem Kapitel vorgestellten Materialien. Strukturelle Störungen einer glatten Oberfläche führen dazu, dass gewisse Oberflächenbereiche nicht oder nur eingeschränkt für Messungen zur Verfügung stehen. Im Bereich der Poren, die meist in kleinen Gruppen auf der Oberfläche auftreten, ist eine verstärkte Höhenvariation zu registrieren. Rasterkraftmikroskope müssen beispielsweise diese Variationen ausgleichen, was deren Empfindlichkeit bei der Messung einzelner Moleküle auf der Oberfläche herabsetzt und die Interpretation der Messung erschwert.

### Medizinische Anmerkungen

An der Erkenntnis, dass durch die Anwendung von Fluor die Fallzahlen von Karieserkrankungen vermindert werden, ändern die an den Modellproben durchgeführten Experimente und deren Ergebnisse nichts. Dieser Umstand ist durch empirische Studien auch umfassend belegt [63, 95]. Die Beobachtungen, die an den Modellproben gemacht worden sind, haben allerdings Auswirkungen auf den Mechanismus, mit dem die Wirksamkeit von Zahnpflegeprodukten über Jahre hinweg erklärt worden ist.

Die Dicke der Fluoridschicht, wie sie in den Experimenten aus Tabelle 5.1 bestimmt worden ist, erscheint mehrere Größenordnungen zu groß. Damit ist die Menge des in dieser Oberflächenschicht gespeicherten Fluorids deutlich geringer als bislang angenommen. Insbesondere diejenigen Wirkmechanismen, die von einem großen Fluorid-Depot in der Zahnschmelzoberfläche ausgehen, sind insofern auf ihre Haltbarkeit hin zu überprüfen. Durch die Auflösung des Zahnschmelzes kommt es zwar weiterhin zu einem Freisetzen von Fluorid, die entstehenden Konzentrationen von Fluorid im Speichel sind allerdings signifikant geringer als im Falle der zuvor angenommenen Oberflächen.

Die im letzten Teil dieses Kapitels beschriebenen Strukturänderungen an der Oberfläche untermauern, dass neben einem reinen Eindiffundieren von Fluorid in die HAP-Oberfläche und einer Ersetzung von Hydroxidionen unter passenden experimentellen Bedingungen auch weitergehende Veränderungen des Materials auftreten können. Als kontrollierender Parameter stellt sich hier der pH-Wert der verwendeten Fluorierungslösungen heraus. Das Auftreten einer fluoridhaltigen Oberflächenschicht nach Fluorierung bei niedrigem pH passt zu den großen, ebenfalls für niedrige pH-Werte gemessenen Eindringtiefen in den XPS-Experimenten.

Die in Kapitel 7 dargestellten Adhäsionsexperimente zeigen einen weiteren Wirkmechanismus, durch den fluorierte Oberflächen mit einer dünnen Fluoridschicht einen protektiven Effekt auf das Zahnschmelzgewebe besitzen können. Durch die Fluorierung der Oberfläche wird die Oberflächenwechselwirkung beeinflusst und es resultiert unter anderem eine veränderte Adsorptionsneigung von Proteinen und eine verminderte Adhäsionskraft von Bakterien auf dieser Oberfläche. Welches der im oralen System bestimmende Einfluss ist, wird dort diskutiert.

## 5.6 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine einfache Herstellungsmethode für Hydroxylapatit-Pellets vorgestellt, und die Eigenschaften der so hergestellten Proben wurden präsentiert. Dazu zählen eine relativ hohe Dichte im Vergleich zu Hartgeweben und mechanische Belastbarkeit im Vergleich zu nicht oder höchstens leicht verpressten Proben, chemische Reinheit und Reproduzierbarkeit der Proben. Anhand der Ergebnisse von Messungen mit dem Rasterelektronenmikroskop und der XPS wurde die Veränderbarkeit des Hydroxylapatit bei Anwesenheit fluoridhaltiger Materialien qualitativ und quantitativ vorgestellt. Mit Hilfe der XPS konnte für die Proben eine Eindringtiefe von Fluorid und der Verlauf der Fluorkonzentration im Probenmaterial bestimmt werden. Die Abhängigkeit dieser Eindringtiefe vom während der Behandlung herrschenden pH-Wert wurde gezeigt. Qualitativ wurden morphologische Änderungen der Pelletoberfläche in Abhängigkeit vom pH-Wert der angewendeten Fluorierungslösungen präsentiert und zur Erklärung der Verläufe der Fluor-Tiefenprofile verwendet. Das Pelletmaterial verhält sich modellhaft wie der mineralische Anteil einer Hartgewebe-Oberfläche: Das chemische Verhalten entspricht in dem betrachteten Fall einer Fluorierung demjenigen von Knochen oder Zähnen.

Eine weitere Steigerung der Oberflächengüte der Pellets ist durch das im folgenden Kapitel 6 angewendete Präparationsverfahren möglich. Dabei werden die o.a. Löcher in der Oberfläche weitgehend geschlossen, und die Rauigkeit der Oberflächen kann weiter reduziert werden, so dass im Prinzip Untersuchungen entsprechend kleiner Partikel bis hin zu einzelnen Makromolekülen möglich werden.

## 6 Pelletproben aus Hydroxylapatit unter Verwendung des FAST Verfahrens

Es stellt sich heraus, dass allein durch die Änderung des Präparationsverfahrens eine weitere Verbesserung der Probenqualität im Vergleich zum Kapitel 5 zu bewerkstelligen ist. Diese Technik und die Qualität der resultierenden Proben werden nachfolgend präsentiert.

Ein Problem beim Sintern ist das Abspalten von Wasser aus HAP bei hohen Temperaturen. Dadurch kann sich HAP in Tricalciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  =:TCP) umwandeln. Obwohl auch dieses Material wie alle Calciumphosphate eine gewisse Biokompatibilität besitzt<sup>1</sup> [96], ist sein Auftreten bei der Erzeugung der hier geforderten Modellproben aus Kontrollgründen unerwünscht. Insofern muss ein Sinterverfahren gefunden werden, das die chemische Zusammensetzung der Proben unverändert lässt, gleichzeitig aber die Gefügestruktur der resultierenden Proben hin zu einem dichteren Material mit größeren Körnern ändert. Das nachfolgend vorgestellte und verwendete **FAST-Sinterverfahren**<sup>2</sup> erfüllt diese Anforderung. Die Pellets, die durch dieses Verfahren erzeugt wurden, werden im weiteren als **HAP3-Pellets** bezeichnet.

Zunächst wird hier analog zu Kapitel 5 erneut das pulverförmige Ausgangsmaterial und seine Eigenschaften vorgestellt. Danach werden die gesinterten Proben anhand der Ergebnisse aus XRD-, EDX- und XPS-Messungen charakterisiert. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Morphologie entlang der Oberfläche gelegt, die den vorab vorgestellten Proben überlegen ist.

### 6.1 Eigenschaften und Vorbereitung des Ausgangsmaterials

Die HAP3-Pellets werden aus einem nanokristallinen HAP-Pulver hergestellt, das wie auch das Ausgangsmaterial der HAP2-Proben im kommerziellen Chemikalienhandel erhältlich ist (hier: Aldrich, Hydroxyapatite, nanocrystalline, BET < 60 nm =: HAP3). Ziel war wie bereits in Kapitel 5 auf einfachst möglichem Wege einen für weitere Untersuchungen geeigneten Probenkörper aus HAP herzustellen. Die Auswahl des Verfahrens war aber ergebnisorientierter gestaltet, so dass auch aufwändigere Präparationstechniken Verwendung finden durften als im Falle der HAP2-Proben. Da die physikalischen und chemischen Eigenschaften des Ausgangsmaterials einen Einfluss auf die Eigenschaften der gesinterten Probe haben könnten, wurde wiederum das HAP3-Pulver vollständig in TEM-, XRD- und XPS-Messungen charakterisiert. Alternativ und um den Einfluss des Ausgangsmaterials zu untersuchen, wurden darüberhinaus

<sup>1</sup>TCP ist eine von vielen möglichen Calciumphosphatverbindungen, die als mineralischer Bestandteil von Biomaterialien vorkommt. Die definitive Aussage, bei einer Materialprobe handle es sich genau um TCP ist aufgrund der kaum unterscheidbaren Atomzahlverhältnisse dieser Klasse von Verbindungen nur mit höchst präzisen Messmethoden möglich.

<sup>2</sup>FAST, field assisted sintering technology, engl. „feldunterstützte Sintertechnik“)

Proben aus HAP2 mit dem FAST-Verfahren verdichtet. Diese Proben werden nachfolgend als „HAP2-FAST“ bezeichnet.

Wie zuvor im Falle von HAP2 wurde das HAP3-Pulver zunächst in Wasser dispergiert, um ggf. darin enthaltene, wasserlösliche Verunreinigungen zu entfernen. 10 g des Materials wurden hierzu in 1 l Wasser gegeben und nach vollständiger Dispersion abfiltriert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Filtrationsschritt wurde der Filterkuchen in einer Petrischale bei 110 °C zwischen 10 und 24 h in einem Trockenschrank gelagert. Mit einem Mörser wurde das zusammenhängende Material abschließend wieder in ein rieselfähiges Pulver zerkleinert. Das so gewonnene Pulver zeigt eine mit der beim HAP2-Pulver vergleichbaren Hygroskopie, weswegen es gleichermaßen in einer entsprechend abgeschlossenen Umgebung trocken aufbewahrt worden ist.

### TEM – Strukturelle Eigenschaften des HAP-Pulvers

Eine stark verdünnte Suspension des gereinigten HAP3-Pulvers in iso-Propanol wurde zur Untersuchung seiner Kornstruktur auf ein TEM-Netz aufgebracht, der Alkohol wurde bei Umgebungsbedingungen verdampft. Die auf dem Netz zurückbleibenden, weit verteilten Partikel wurden dann im TEM (JEOL, JEM 2011, AG Birringer, Universität des Saarlandes) betrachtet.

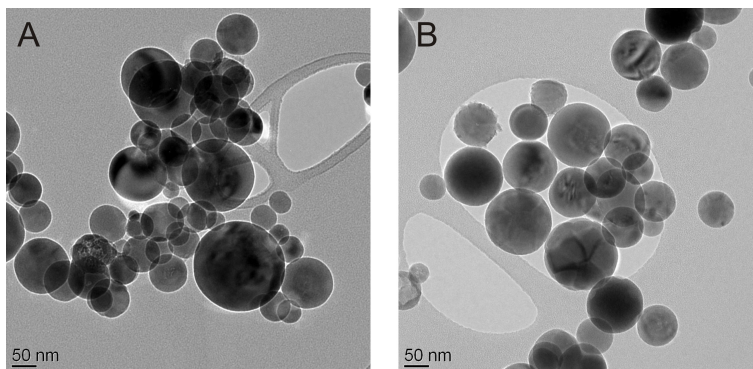


Abbildung 6.1: Vergleich der Pulverpartikel im Transmissions-Elektronenmikroskop vor (A) und nach (B) dem Waschen.

Bei dem Pulver des HAP3-Materials handelt es sich im Gegensatz zu den nadelartigen Strukturen des HAP2-Pulvers um kugelförmige Körner mit einem Durchmesser von ca. 70 nm. Dabei sind Abweichungen von diesem Wert nach oben als auch nach unten um mehr als einen Faktor 2 möglich. Das Histogramm in Abbildung 6.3 zeigt die Größenverteilung der Kristallite. Es wurde durch die nachträgliche Vermessung der in den TEM-Bildern aufgenommenen Agglomerate bestimmt, die einen Durchmesser von bis zu einigen Mikrometern besitzen können.

Auf die Oberfläche der Pulverpartikel hat der Waschvorgang keinen erkennbaren Einfluss, wie die Abbildungen 6.1 A vorher und B nachher im Vergleich belegen. Abbildung 6.2 demonstriert

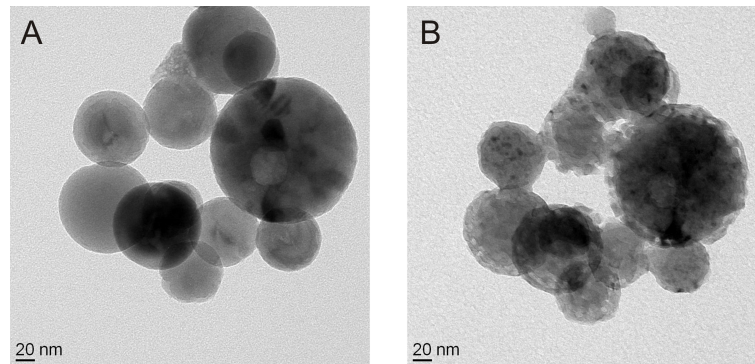


Abbildung 6.2: TEM-Aufnahme des gewaschenen HAP3-Pulvers, das später zur Herstellung der Pellets verwendet wurde. Zwischen den Abbildungen tritt durch die Einwirkung des Elektronenstrahls offenbar eine gewisse Erosion der Partikeloberfläche auf. Resultierend aus dieser Beobachtung wurden die Aufnahmen mit dem Elektronenmikroskop mit entsprechender Rücksicht darauf gemacht.

den Einfluss des Elektronenstrahls auf die HAP3-Kugeln: Offenbar tritt eine oberflächliche Erosion ein, die zweifelsfrei auf die Betrachtung des Materials im TEM zurückgeführt werden kann. Entsprechende Strukturänderungen dadurch wurden als Artefakt behandelt.

### XRD – Kristallografische Eigenschaften des HAP3-Pulvers

Das HAP3-Pulver wurde mit Hilfe röntgenreflektometrischer Messungen charakterisiert und auf Übereinstimmung mit den für Hydroxylapatit tabellierten Spektren untersucht [37]. Etwa 2 g des HAP3-Pulvers wurden dafür in eine 2 cm breite und 5 mm hohe Plastischale eingefüllt, glatt gestrichen und in ein Röntgenreflektometer (Panalytical X'PERT-Pro) eingebaut. Die Anodenspannung lag für die Messungen bei 40 kV, der Röhrenstrom bei 40 mA.

Abbildung 6.4 zeigt zwei Diffraktogramme von HAP3-Pulverproben. Die orange, mit „+“-Zeichen gekennzeichnete Kurve zeigt das Diffraktionsspektrum für das unbehandelte Pulver, die blaue, mit „×“-Zeichen gekennzeichnete Kurve dasjenige Diffraktogramm, nachdem das Pulver mit Wasser gewaschen worden war. Die beiden Spektren stimmen fast vollständig überein, und sie beide entsprechen den in der Grafik als graue Balken eingezeichneten Sollwerten für die Positionen der Maxima, wie sie in der Literatur für die HAP-Einheitszelle in  $P2_1$ -Symmetrie zu finden sind [37]. Die Intensitätsverteilung einzelner Maxima reproduziert annähernd die Literaturwerte.

Diese Übereinstimmung mit den Sollwerten zeigt, dass es sich bei dem Pulver zu großen Teilen um HAP handelt. Außerdem sind keine oder nur geringe Mengen wasserlöslicher oder ausschließlich schlecht löslicher Inhaltsstoffe enthalten, deren Entzug durch den Waschvorgang oder Verbleib im Pulver höchstens eine unsignifikante Änderung des Spektrums zur Folge hätte. Das Waschen des HAP3-Pulvers hat offenbar keine messbaren Auswirkung auf seine chemische Zusammensetzung oder die Struktur der Pulverteilchen. Um es in einheitlichem Zustand und

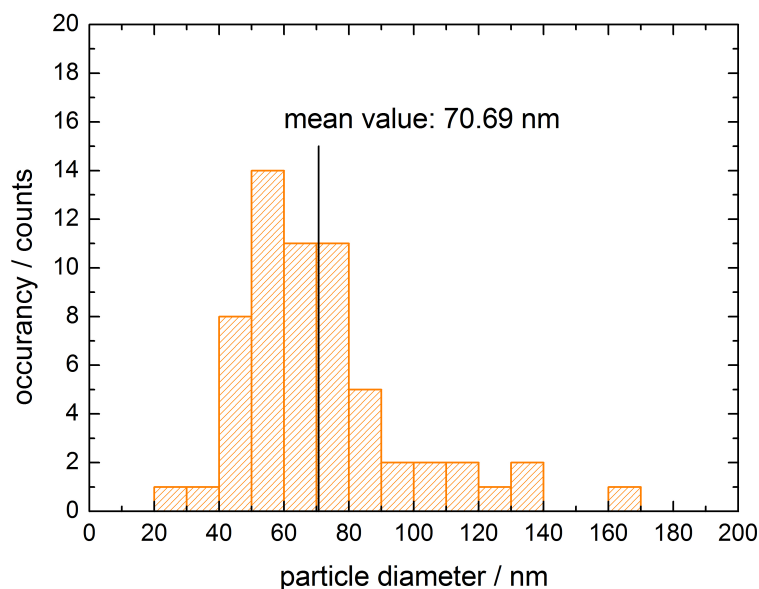


Abbildung 6.3: Histogramm der Durchmesser der HAP-Partikel, die innerhalb des Pulvers in Form von Agglomeraten auftreten. Der Mittelwert der Größenverteilung liegt bei etwa 71 nm.

mit geringstem Anteil an möglicherweise vorhandenen organischen Fremdmaterialien für die Probenproduktion zu verwenden, wurde als Standard das HAP3-Pulver in Wasser gewaschen. Der minimale Anteil von Chlor im Pulver, wie er durch die XPS-Messungen geliefert wird (siehe dort), begründet das Waschen aller Pulver mit Wasser vor ihrer Verwendung, obwohl keine direkten Hinweise auf wasserlösliche Verunreinigungen im XRD-Spektrum des Pulvers zu finden sind<sup>3</sup>.

Die durch die schwarzen Pfeile in Abbildung 6.4 dargestellten, im Literaturspektrum von HAP nicht enthaltenen Maxima geringer Intensität passen zur Struktur von Calciumoxid (CaO). Calciumoxid ist ein in Wasser schwer lösliches Salz, dessen geringe Gesamtintensität bei der XRD im Vergleich zum restlichen Spektrum einem sehr geringen Anteil an der gesamten Probe entspricht. Da außerdem Lage und Intensität vor und nach dem Sintervorgang identisch sind (s.u.), wurde sein Vorkommen vernachlässigt.

### XPS – Elementare Zusammensetzung des HAP3-Pulvers

Um die elementare Zusammensetzung des Pulvers zu bestimmen und um auch oberflächlich anhaftende Verunreinigungen zu detektieren, wurde das Pulver analog zu der im vorherigen Kapitel vorgestellten Analytik mit Röntgen-Photoelektronenspektroskopie (XPS) charakterisiert.

<sup>3</sup>Amorphe organische Inhaltsstoffe führen insbesondere in geringer Konzentration nicht zu merklichen Veränderungen des Spektrums, weil sie lediglich zu einer breiten Intensitätszunahme führen und dadurch i.a. nur schwer vom Untergrundrauschen zu unterscheiden sind.



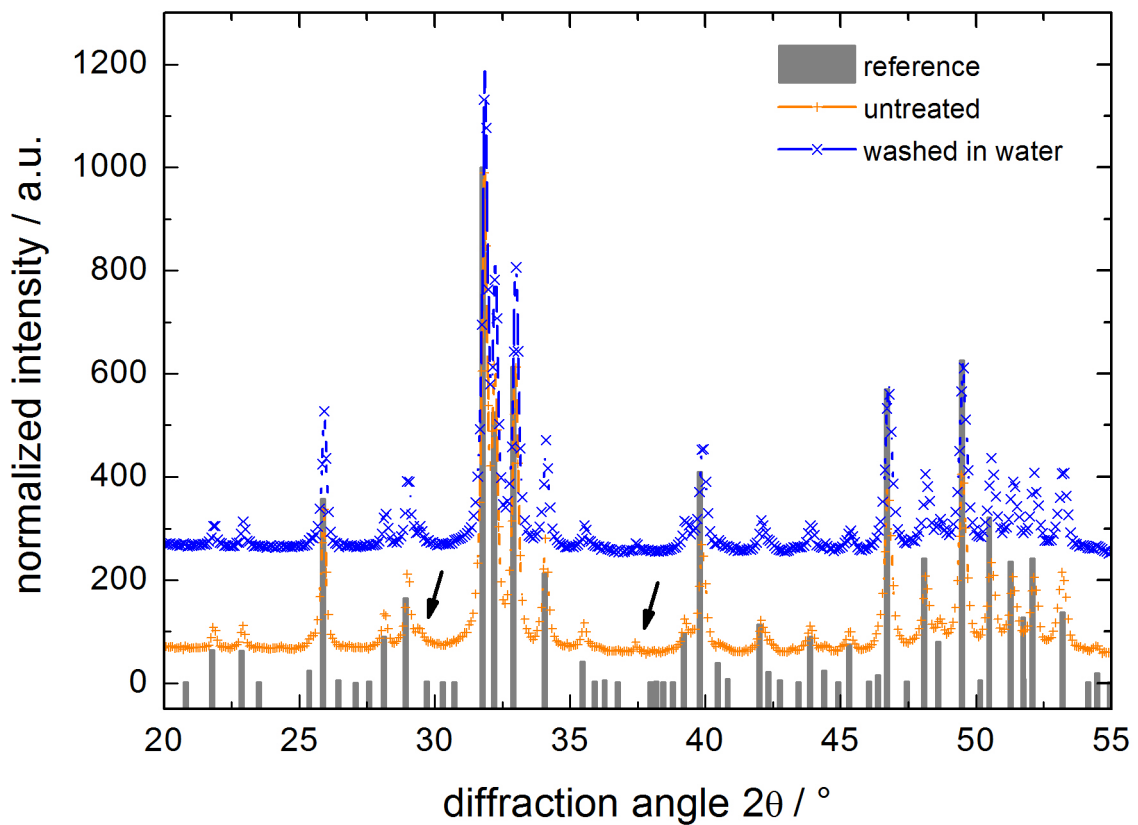


Abbildung 6.4: Refraktogramme von HAP3-Pulver: orange (bzw. durch +-Zeichen) dargestellt ist der Zustand vor und in blau (bzw. dargestellt durch  $\times$ -Zeichen) nach dem Waschen des Pulvers mit Wasser. Beide Spektren stimmen in allen Strukturen überein. Die abgebildeten Spektren wurden jeweils auf eine Maximalintensität von 1000 normiert. Die Kurve des gewaschenen Materials ( $\times$ ) wurde um +200 a.u. parallel versetzt dargestellt. Die zwei separat markierten Maxima können zu einer Verunreinigung mit CaO gehören.

Dazu wurde das Pulver in einem becherartigen Halter eingefüllt. Bei langsam abnehmendem Druck<sup>4</sup> wurde der Halter dann in das Spektrometer (ESCALab MkII, Vacuum Generators, Hastings, UK) eingeschleust.

Für reines, stöchiometrisches Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ ) ist ein Verhältnis Ca:P:O von 5:3:13 zu erwarten. Das im vorliegenden System gemessene, genaue Atomzahlverhältnis hängt allerdings von der Pulversynthese und der Vorbehandlung ab. Nicht-stöchiometrische HAP-Verbindungen in der Probe oder an Kristalliten adsorbierte organische Verbindungen besitzen einen Einfluss auf das XPS-Messergebnis. Um eine Vergleichbarkeit herstellen zu können und weil die XPS lediglich Aussagen zu Atomzahlverhältnissen zulässt, wurden wie bereits in Kapitel 5 alle Messwerte darauf normiert, dass die gemessene Intensität für Phosphor der geforderten Intensität von 3 entspricht [91].

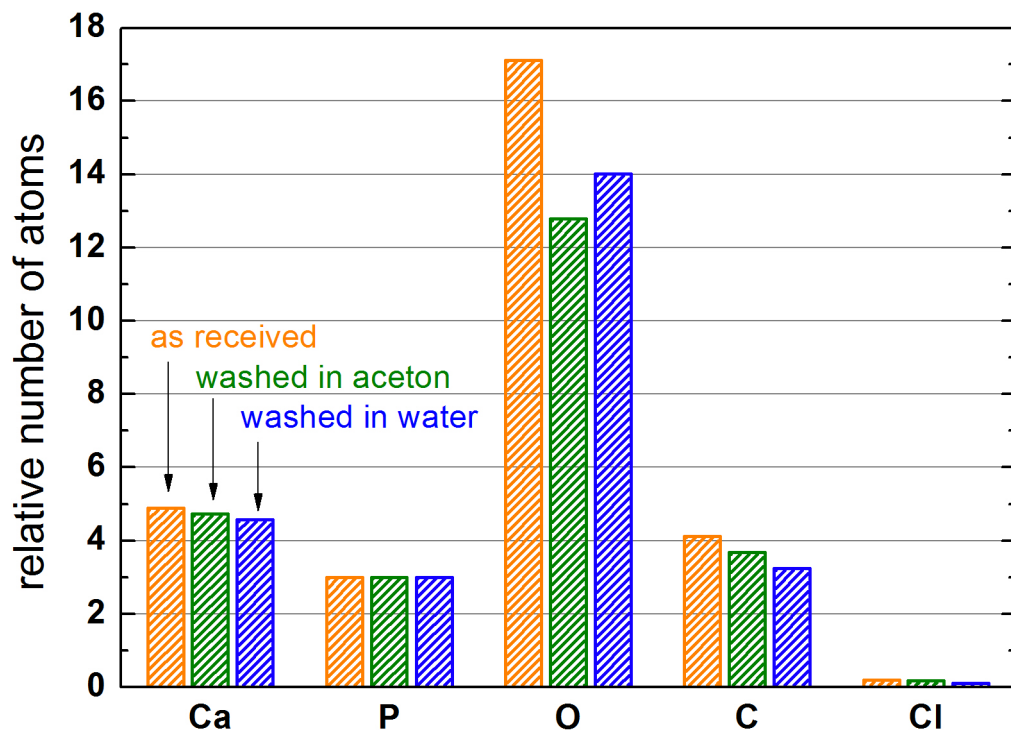


Abbildung 6.5: Durch XPS bestimmte relative Atomzahlen des HAP3-Pulvers ohne jede Behandlung (jeweils erster Balken), nach dem Waschen in Aceton (zweiter Balken) bzw. nach dem Waschen in Wasser (dritter Balken).

In Abbildung 6.5 ist das Ergebnis der XPS-Messungen an HAP-Pulver nach der Reinigung in unterschiedlichen Lösemitteln grafisch dargestellt. Das unbehandelte Pulver zeigt im Vergleich

<sup>4</sup>Langsam, sonst verteilt der relative Überdruck im Pulver enthaltener Luftvolumina schlagartig den Becherinhalt in der Apparatur...

Tabelle 6.1: Relative Atomzahlen der am Aufbau von HAP beteiligten Elemente und gemessener Verunreinigungen aus Messungen an ungesintertem HAP3-Pulver

	Ca	P	O	C	Cl	Ca:P	Ca:O
as received	4.9	3	17.2	4.1	0,19	1.63	0.29
washed in acetone	4.7	3	12.8	3.7	0.17	1,57	0.37
washed in water	4.6	3	14	3.2	0.1	1.52	0.33
nominal formula unit	5	3	13	0	0	1.66	0.38

dazu einen hohen Sauerstoffüberschuss von 17 Einheiten, während das Calciumsignal (4,9) im Bereich der Messgenauigkeit für Hydroxylapatit passend ist. Der hohe Kohlenstoffanteil am Messergebnis könnte durch auf der Oberfläche haftendes Kohlenstoffmonoxid (CO) oder andere organische Verbindungen bedingt sein. Außerdem ist ein kleiner Beitrag von Chlor (0,2) enthalten.

Eine naheliegende Quelle von Kohlenstoff sind - wie bereits erwähnt - organische Verbindungen wie Kohlenwasserstoffe, die auf der großen Oberfläche der Pulverpartikel anhaften können. Weiterhin bildete sich beim Dispergieren des HAP3-Pulvers in Wasser ein instabiler Schaum, der ein Zeichen für die Anwesenheit amphiphiler und damit oberflächenaktiver Substanzen sein kann. In Lösemitteln sollten diese Stoffe jeweils gut löslich sein. Um ggf. vorhandene organische Verunreinigungen zu entfernen, wurde daher das HAP3-Pulver testweise in Aceton gewaschen und anschließend untersucht.

Nach derartiger Behandlung zeigt sich bei den XPS-Ergebnissen ein starker Rückgang des Sauerstoffüberschusses auf 12,9 Einheiten. Einen kleinen Rückgang zeigen das Calcium- (4,7) und das Kohlenstoffsignal (3,6). Beim Chlor tritt lediglich ein kleiner, bei Beachtung der Fehlergrenzen der Messung nicht signifikanter Intensitätsabfall durch das Waschen auf.

Wird das Pulver mit Wasser gewaschen, werden leicht wasserlösliche Fremdanteile aus dem Pulver herausgelöst. Nach der entsprechenden Behandlung fällt der Sauerstoffgehalt auf 14 Einheiten ab, ein schwächerer Rückgang als nach der Acetonwäsche. Der Wert beim Calcium sinkt auf 4,6 ab, wobei sich die Änderung aber noch im Rahmen der Messgenauigkeit der verwendeten Anlage von etwa 10% bewegt. Das Kohlenstoffsignal reduziert sich auf 3,2 Einheiten, der Chloranteil halbiert sich grob auf 0,1 Einheiten.

Kohlenstoff wurde in allen drei Fällen gemessen, und zwar auch noch nachdem die Oberfläche bereits mit Ar-Ionen gereinigt worden war. Mögliche Quellen sind anhaftende Adsorbate oder in dem Material vorhandene kohlenstoffhaltige Verbindungen. Dies könnten z.B. auch Carbonate sein, wie sie beispielsweise in HAP aus Geweben häufiger vorkommen [96], deren Anwesenheit ist allerdings aufgrund der künstlichen Herkunft des HAP-Pulvers nicht zu erwarten.

Adsorbate spielen bei XPS-Messungen aufgrund der extrem großen Oberflächenempfindlichkeit der Methode eine wichtige Rolle. Daher wurden die Proben vor der Messung durch Argonionenbeschuss gereinigt. Die verwendete Pulverprobe aus nanoskaligen Partikeln ist allerdings kaum zu reinigen, denn die Partikel besitzen eine riesige dreidimensionale Oberfläche, die auch in die

Pulverprobe hinein verlaufen. Adsorbate werden daher weiterhin an Pulverkörnern vorhanden sein, ganz gleich wie gründlich die Oberflächen gereinigt werden.

Das Waschen des Pulvers mit Wasser führt nach den Ergebnissen der XPS zu einer signifikanten Senkung des Chlorsignals. Chlor ist ein Halogen und dürfte in der Probe als Chlorid vorkommen, das sich chemisch ähnlich zu Fluoriden verhält. Im Sinne einer Minimierung aller Halogenidanteile (auch in Hinblick auf die Verwendung der Proben in Experimenten über den Einfluss der Halogenide) wurden entsprechende Waschvorgänge bei der Probenpräparation durchgeführt, die keinen weiteren Einfluss auf die Zusammensetzung des Materials besitzen. Dies kann anhand der XRD und der XPS-Messungen klar gezeigt werden: Gewaschenes und unbehandeltes HAP3-Pulver besitzen ein annähernd identisches Diffraktogramm.

Im Rahmen der Messgenauigkeit bestätigt die XPS die Stöchiometrie des HAP-Pulvers, allerdings treten Defizite in der Calcium- und der Sauerstoff-Konzentration der Proben auf. Mögliche Ursache hierfür könnten die Waschvorgänge sein, die an dem Pulver durchgeführt wurden und – natürlicherweise – in erster Linie die Oberfläche einzelner Körner betrifft, entlang welcher die XPS besonders empfindlich detektiert. Die Änderungen in den Ergebnissen zu unterschiedlich behandelten Pulvern, die durch XPS untersucht worden sind, lassen sich zusätzlich durch oberflächliche Adsorptions- und Desorptionsprozesse erklären.

### 6.2 Probenverdichtung und -präparation

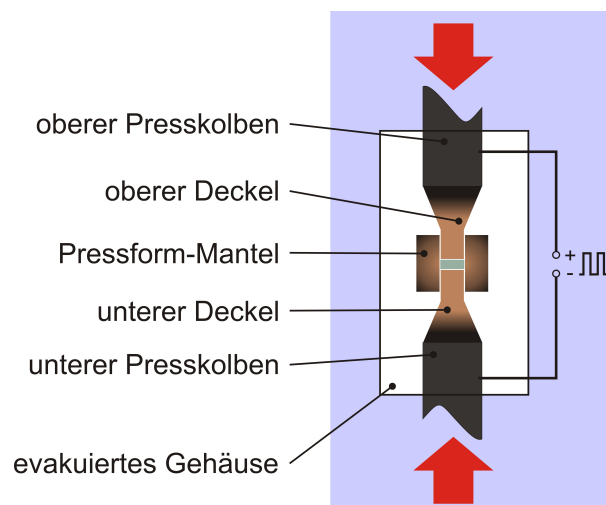


Abbildung 6.6: Schematischer Aufbau einer FAST-Heißpresse. Das in das aus mehreren Komponenten bestehende Presswerkzeug eingefüllte Pulver wird zwischen den Presskolben komprimiert. Gleichzeitig wird die gesamte Pressform und damit auch die zu verdichtende Probe durch einen starken gepulsten Gleichstrom geheizt. Die Pressform befindet sich währenddessen in einem evakuierten Gefäß.

Ein Verfahren, durch dessen Anwendung im Vergleich zum Verfahren uniaxialer Verdichtung

und nachfolgender Sinterung verbesserte Proben erzeugt werden, ist das sogenannte FAST-Verfahren. Alle nachfolgend aufgeführten Messungen wurden an mit diesem Verfahren produzierten Proben durchgeführt.

Zur Anwendung wird ein entsprechender Sinterofen benötigt. Der schematische Aufbau eines solchen FAST-Sinterofens, wie er für die Produktion der Proben am KIT in Karlsruhe verwendet wurde, ist in Abbildung 6.6 dargestellt.<sup>5</sup> Zum Sintern wurden ca. 3 g vorbereiteten HAP2- oder des HAP3-Pulvers in eine aus hochfestem Kohlenstoff bestehende Pressform eingefüllt. Die beschickte Pressform wurde anschließend in die Apparatur (FCT Systeme GmbH, Typenbezeichnung „HP D 25“) eingebaut, deren Probenkammer zu Beginn des Sintervorganges evakuiert worden ist. Da die Form elektrisch leitfähig ist, kann sie direkt resistiv durch einen gepulsten elektrischen Gleichstrom geheizt werden, der durch die Form hindurch geschickt wird (Impulsabstand: 10 ms). Bis zu einer Temperatur von 700 °C betrug die Aufheizrate bei den hier erzeugten Proben jeweils 150 K/min, darüber bis zu einer Temperatur bis 1000 °C 10 K/min. Bei Erreichen der 700 °C-Marke wurde auf die Probe instantan ein Druck von 50 MPa aufgebracht. Druck und Temperatur wurden nach Erreichen von 1000 °C für weitere fünf Minuten konstant gehalten, bevor die Probe ohne Pressdruck innerhalb von 10 min auf 500 °C abgekühlt wurde. Nach Erreichen dieser Temperatur wurde der Ofen ausgeschaltet und mit Stickstoff belüftet.

Die gesinterte Probe wurde nach Erkalten aus der Pressform entnommen. Gelegentlich zerbrach sie dabei, die Bruchstücke besaßen allerdings oftmals ausreichende Größe um daran Messungen vornehmen zu können. Die Oberfläche der Pellets (bzw. der Bruchstücke) war makroskopisch rau, außerdem hafteten noch Kohlenstoffreste vom Presswerkzeug an, weswegen die Pellets zunächst mechanisch gereinigt und allseits mit einem groben Schleifpapier angeschliffen wurden. Die flächengrößte von Ober- bzw. Unterseite wurde schließlich mit der nachfolgend geschilderten **Standardpolierprozedur** abgeschliffen und poliert:

1. Beginnend mit Schleifpapier der Körnung 800 wird die Oberfläche des Pellet abgeschliffen. Hierbei wird die Probe regelmäßig um 90° gedreht, um ein ungleichmäßiges Abtragen der Probe zu vermeiden. Bei diesem und allen nachfolgenden Schritten wird dabei solange die Oberfläche geschliffen, bis diese unter dem Lichtmikroskop eine gleichmäßige, der Körnung des verwendeten Schleifpapiers entsprechende Riefenstruktur besitzt. Anschließend wird die Probe für fünf Minuten in Wasser in einem Ultraschallbad behandelt. Anhaftende Reste des Schleifmittels, die während der nächstfeineren Bearbeitungsstufe die Oberfläche beschädigen würden, werden dadurch entfernt.
2. Der Vorgang wird nacheinander mit Schleifpapieren der Körnung 1200, 2400 und 4000 wiederholt. Die Bearbeitungsdauer nimmt dabei mit zunehmender Körnung zu.
3. Eine wässrige Poliersuspension aus Diamanten mit einem Teilchendurchmesser von 3 µm (Struers Dia-Pro Dac, 3µm) wird auf ein Polierfließ (Struers MD-Dac) aufgebracht. Die Probe wird analog zum Schleifen unter regelmäßigem Drehen in 90°-Schritten gleichmäßig über das mit der Suspension getränkte Polierfließ bewegt und so in einem ersten Schritt poliert.

<sup>5</sup>An dieser Stelle möchte ich mich bedanken bei Herrn Dr.-Ing. Stefan Fünfschilling, Herrn Dr.-Ing. Deniz Kahraman und Prof. Dr. Michael Hoffmann, KIT - Institut für angewandte Materialien - Keramik im Maschinenbau, für die Bereitstellung des FAST-Sinterofens zur Herstellung der hier verwendeten HAP3-Proben.

4. Danach wird die Probe in gleicher Weise wie unter 3. mit einer 30 nm-Diamantsuspension (Microdiamant) poliert. Nach Abschluss dieses Vorganges muss darauf geachtet werden, das Poliermittel sofort im Ultraschall-Wasserbad von der Probe zu spülen. Angetrocknete Reste dieser Suspension auf der Oberfläche sind kaum mehr zu entfernen, ohne die Oberfläche erneut zu schleifen.
5. Trotz der Ultraschallbehandlung bleiben einige der Diamanten der letzten Poliersuspension auf der Oberfläche haften. Um diese zu beseitigen, kann die Oberfläche entweder mit einer milden Essigsäurelösung (pH=4) für 10 s angeätzt werden oder mit einem Strahl aus gefrorenen Kohlenstoffdioxidkristallen abgerastert werden („*Snowjet*“).

### 6.3 Eigenschaften der HAP3-Pellets

Die Dichte der wie zuvor beschrieben hergestellten Proben liegt im Falle von HAP2 als Ausgangsmaterial zwischen 85% und 90% (entsprechend circa  $2,8 \text{ g/cm}^3$ ) bzw. im Falle von HAP3 zwischen 95,5% und 98% ( $3,12 \text{ g/cm}^3$ ) der theoretischen Dichte eines HAP-Einkristalls ( $3,18 \text{ g/cm}^3$ ). Die produzierten Pellets haben einen (durch die Pressform bestimmten) Durchmesser von 2,5 cm und eine Höhe zwischen 4 und 6 mm. Die in der Probe verbleibende Restporosität ist in keinem Fall durchgängig und wird durch isoliert zueinander liegende Gaseinschlüsse hervorgerufen („keine offenporige Struktur“ [97]).

#### Oberflächenmorphologie HAP-2

Durch das Sintern des HAP2-Pulvers mit dem FAST-Verfahren werden dichtere Proben produziert als durch die Anwendung des uniaxialen Pressverfahrens mit anschließender Sinterung. Untersuchungen der Oberfläche nach Politur zeigen auf den HAP2-FAST-Proben ein aus mehreren Phasen bestehendes Pellet. Auf den REM-Bildern (aufgenommen mit einem JSM-7000F, Hersteller JEOL, AG Birringer, Universität des Saarlandes) in Abbildung 6.7 sind Kristallite in weitgehend ungeordnetem Gefüge zu erkennen. Teilabbildung B zeigt beispielhaft sehr glatte Oberflächenbereiche („o“), die sich durch scharfe Grenzflächen von einer zweiten Phase mit tiefer liegender und sehr rauer Oberfläche („x“) abgrenzen. Die glatte Oberfläche besitzt eine Rauigkeit unter 1 nm (RMS auf  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ , gemessen per AFM).

Eine EBSD-Analyse der Oberfläche identifiziert anhand des Rückstreumusters zwei unterschiedliche Materialien in den einzelnen Phasen. Bei der glatt erscheinenden handelt es sich offenbar um HAP, während die auf der rauen Phase ermittelte Struktur zu Tricalciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) passt. Offenbar kommt es also beim Sintern der HAP2-FAST-Pellets zu Umwandlungsreaktionen in TCP.

#### Oberflächenmorphologie HAP-3

Die Oberfläche der HAP3-Pellets besitzt eine sehr geringe Rauigkeit, wenn sie nach der zuvor geschilderten Prozedur geschliffen und poliert worden sind. Auf einem einzelnen Korn beträgt

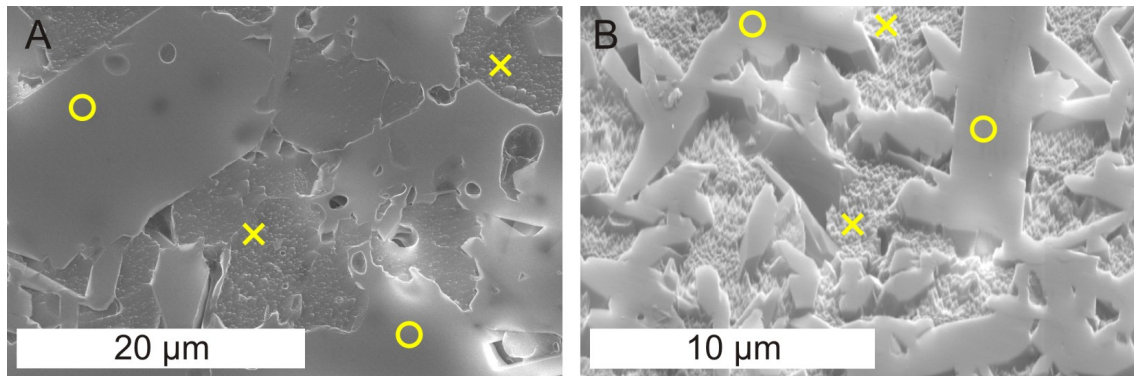


Abbildung 6.7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche eines HAP2-FAST-Pellets.

sie unter 1 nm auf einem  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  großen Oberflächenausschnitt (z.B. Abbildung 6.8 A und B).

Werden die verbleibenden Polierpartikel durch die Ätzbehandlung entfernt, so erfährt die Oberfläche eine leichte Erosion, die je nach ihrer Orientierung einzelne Kristallite mehr oder weniger stark betrifft. Die unterschiedlich Ätzrate einzelner Körner führt zur Entstehung von Höhenstufen. Die stark angeätzten Oberflächenareale werden außerdem rauer, wenig angeätzte bleiben hingegen relativ glatt (vgl. Abbildung 6.8 A). Bei der Bestimmung der Rauigkeit über Korngrenzen hinweg werden dann Rauigkeitswerte unterhalb von 10 nm gemessen.

Im Vergleich hierzu zeigen sich die mit dem Kohlenstoffdioxid bearbeiteten Oberflächen nicht erodiert. Die Methode verursacht in dem spröden Probenmaterial allerdings thermisch induzierte Spannungen durch das Ansprühen mit kaltem  $\text{CO}_2$  einerseits und das bei dieser Bearbeitungsmethode notwendige Gegenheizen der Probe andererseits. Werden diese Spannungen zu groß, zerspringt die Probe, wodurch sie für viele Anwendungen nicht mehr verwendbar ist. Aufgrunddessen muss immer fallweise die Art der Präparation abgewogen werden. Sofern über weite Strecken eine ebene Fläche unabhängig von der Materialorientierung notwendig ist, sollten die Polierpartikel mit der  $\text{CO}_2$ -Behandlung entfernt und das Verlustrisiko der Probe in Kauf genommen werden. Sind nur Probenoberflächen im  $\mu\text{m}$ -Bereich notwendig, dann kann die Probe geätzt werden.

Die bei der Ätzbehandlung entstehende Terrassenstruktur ist nicht zwangsweise nachteilig: Wenn es um die unterschiedlichen Eigenschaften unterschiedlich orientierter Kristallite geht, so bietet die HAP3-Pelletprobe eine Möglichkeit der Charakterisierung. Durch Anätzen wird die Unterscheidung einzelner Kristallite möglich, weil hierbei entlang der Kristallitkanten ein stärkerer Abtrag erfolgt.

Dass es sich bei den einzelnen, durch Ätzen sichtbar werdenden Körnern tatsächlich um einkristalline Gebilde handelt, kann mit Hilfe einer orts aufgelösten EBSD-Charakterisierung nachgewiesen werden. Dafür wurde eine Probe nach der vorgenannten Präparation mit abschließendem Beschuss mit  $\text{CO}_2$ -Beschuss vorbereitet. Mit einem Ionen-Ätzverfahren wurde die Ober-



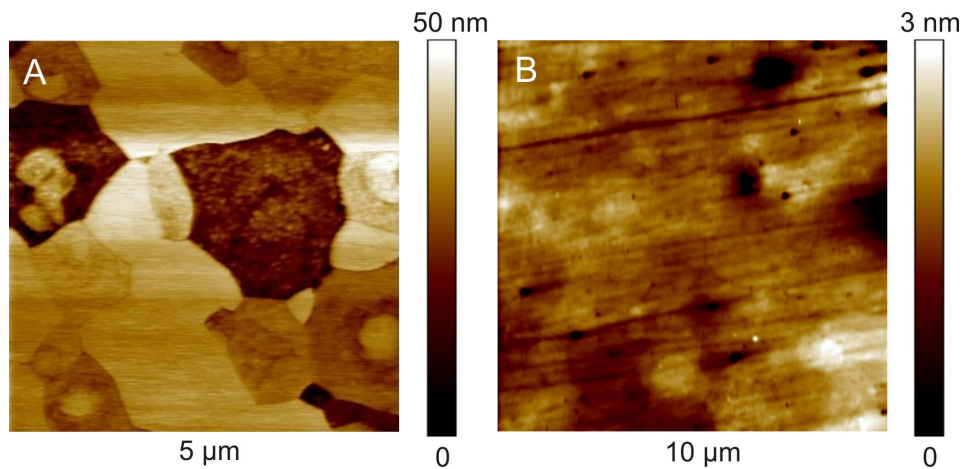


Abbildung 6.8: Kraftmikroskopische Höhenbilder einer HAP-Pelletprobe nach Polieren und Ätzen (Bild A, verwendete Ätzlösung: Acetatpuffer bei pH 4,7 für 10 s) bzw. Reinigung mit einem CO<sub>2</sub>-Strahl (B). Für das in Bild A dargestellte Oberflächenareal von (5 μm)<sup>2</sup> ergibt sich eine Rauigkeit vom 7,6 nm, bezogen auf eine der Kornoberflächen wird auf einer (1 μm)<sup>2</sup> großen Teilfläche eine Rauigkeit von 1 nm gemessen. In Bild B liegt die Rauigkeit bei unter 1 nm auf einer (10 μm)<sup>2</sup> großen Fläche, hier 0,2 nm.

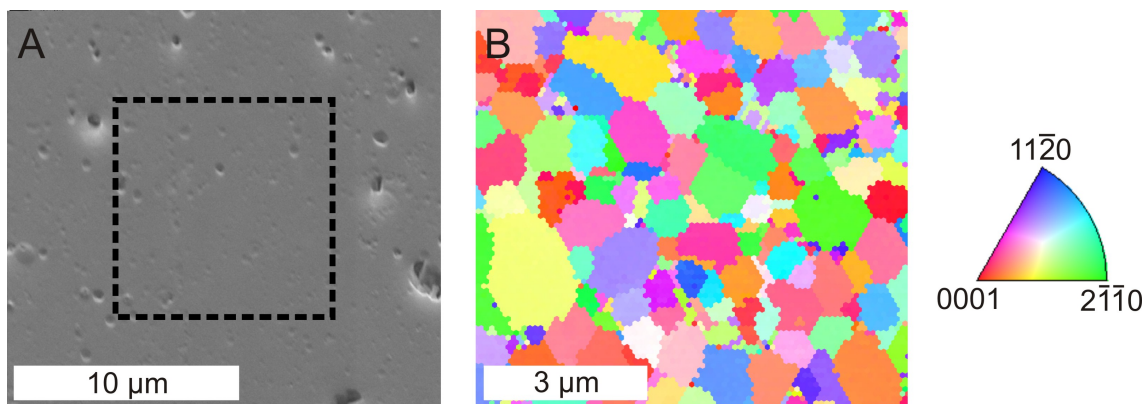


Abbildung 6.9: A: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Oberfläche eines HAP3-Pellets nach Ionenpolitur. Der links gestrichelt gezeichnete Bereich zeigt ungefähr den in B abgebildeten Bereich. B: Ergebnis eines „EBSD-Mappings“, bei dem an jedem Punkt des Bildes eine einzelne Messung durchgeführt wurde. Dabei wird die Orientierung des Rückstreumusters bestimmt, und gleichzeitig wird geprüft, ob das während der Messung aufgenommene Rückstreumuster zu HAP passt. Die Orientierung wird nach dem nebenstehenden Schema farbkodiert, so dass für jeden Punkt des Bildes die Kristallorientierung dargestellt ist. Gleiche Farben bedeuten somit gleiche Kristallorientierung.



fläche weiter geglättet, was zu dem Erscheinungsbild der Oberfläche wie in Abbildung 6.9 A führt. Nach Einschleusen der Probe in ein REM (JSM-7000F, Hersteller JEOL, AG Birringer, Universität des Saarlandes, ausgestattet mit Digiview 3 EBSD-Detektor, EDAX-TSL) wurde die Oberfläche zunächst abgebildet, und in demselben Oberflächenbereich wurden danach die Rückstreumuster auf die Probe eingestrahelter Elektronen aufgenommen und charakterisiert.

Abbildung 6.9 B zeigt das Ergebnis. Bei eingehender Untersuchung ergibt sich, dass die per EBSD bestimmten Strukturen allesamt mit der Kristallstruktur von HAP verträglich sind, ein Hinweis auf die Reinheit des Materials. Innerhalb einzelner Körner besitzt die Kristallstruktur durchweg homogene Orientierung, was anhand der konstanten Orientierung der Rückstreufiguren festgestellt werden kann. Die beim Anätzen der Oberfläche sichtbar werdenden Körner sind also wirklich Einkristalle, deren Orientierung anhand der Färbung angegeben ist. Eine Vorzugsausrichtung der Körner beispielsweise parallel zur Pressrichtung ist nicht erkennbar.

### Charakterisierung durch XRD

Analog zu den HAP2-Pellets wurden auch die FAST-gesinterten Pellets mit Hilfe der XRD auf Fremdphasenanteile hin untersucht. Diese Untersuchung würde für die HAP2-FAST-Proben ausgelassen, da sich bereits bei der vorab durchgeführten Charakterisierung der Proben eindeutige Verunreinigungen durch TCP nachweisen ließen, und damit eine weitere Verfolgung dieser Präparation nicht sinnvoll erschien.

Wie anhand des Diffraktogramms in Abbildung 6.10 zu erkennen ist, haben sich Position und relative Intensitäten der Maxima durch den Sinterprozess im Vergleich zur ungesinterten Probe nicht geändert. Die Breite der Maxima hat sich durch den Sinterprozess erwartungsgemäß vermindert, da sich der Durchmesser der Kristallite innerhalb des Materials vergrößert hat. Neu auftretende Maxima oder fehlende Maxima sind nicht vorhanden, insbesondere kann kein TCP in seiner charakteristischen rhomboedrischen Gestalt nachgewiesen werden.

Wie bereits bei den ungesinterten Pulverproben findet sich auch im Diffraktogramm der gesinterten Probe ein Maximum bei einem Beugungswinkel von ca.  $37,5^\circ$ . Seine Lage und Intensität bleiben durch das Sintern ungeändert, so dass eine Beeinflussung durch die Bearbeitung ausgeschlossen wird.

Die Ergebnisse der Röntgenuntersuchung bestätigen somit, dass beim Sinterprozess keine mit einer Umwandlung der Kristallstruktur einhergehende Materialveränderung aufgetreten ist. Die Linienpositionen bestätigen nach dem Sintern weiterhin eine gute Reinheit des des Pelletmaterials, das die Beugungseigenschaften von Hydroxylapatit zeigt.

### Chemische Charakterisierung der Oberfläche durch XPS

Um auf alternativem Weg sicherzustellen, dass sich durch den Sintervorgang das Hydroxylapatit nicht in ein anderes Material umgewandelt hat, wurden die HAP3-Pelletproben nach dem Sintern mit Hilfe der XPS untersucht. Untersuchte Orbitale waren Ca-2s, Ca-2p, O-1s, P-2s, P-2p, C-1s und Cl-2p.

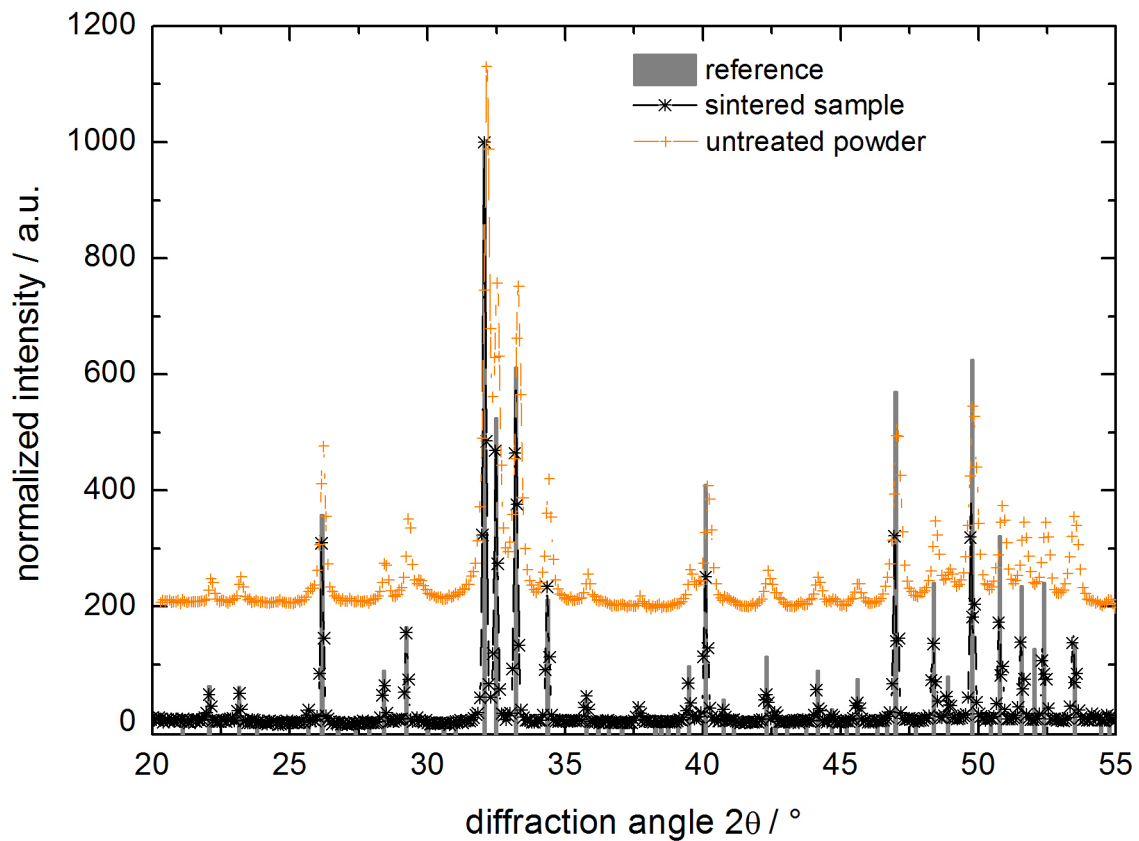


Abbildung 6.10: Vergleich der XRD-Spektren von unbehandeltem HAP3-Pulver (orange +-Zeichen) und einer FAST-gesinterten HAP3-Pelletprobe (schwarze \*-Zeichen). Außer der durch das Sintern bedingten Abnahme der Halbwertsbreite der enthaltenen Maxima sind keine Unterschiede erkennbar. Wie bei den vorab gezeigten Spektren wurde die Maximalintensität wieder auf 1000 a.u. normiert. Zwischen dem Spektrum der unbehandelten und der gesinterten Probe liegt ein Offset von 200 a.u.

Nachdem die Proben geschliffen und poliert waren, wurden sie in die UHV-Kammer des Spektrometers (ESCALab MkII, Vacuum Generators, Hastings, UK) eingeschleust und direkt erstmalig gemessen. Um an der Oberfläche anhaftende Adsorbate zu beseitigen, wurde die Probe anschließend durch Argonionen-Beschuss gereinigt. Die Oberfläche wurde solange beschossen, bis sich das Kohlenstoffsignal der Probe bei weiterem Beschuss nicht mehr signifikant änderte bzw. verschwunden war (vgl. Erläuterungen in Kapitel 5). Anhaftende kohlenstoffhaltige Adsorbate dienen insofern wieder als Indikator für die Sauberkeit der Probe.

An der sauberen Probe wurde anschließend die Messung der oberflächlichen Zusammensetzung wiederholt. Zu beachten ist, dass die Ergebnisse der Messungen in Tabelle 6.2 einen Fehler von bis zu 10% enthalten. Damit zeigen die Ergebnisse der Messung eine Übereinstimmung mit dem theoretischen Verhältnis Ca:P:O von 5:13:3.

Tabelle 6.2: Relative Atomzahlen der am Aufbau von HAP beteiligten Elemente und gemessener Verunreinigungen. Zur Orientierung ist der theoretische Wert angegeben, der sich für vollständig stöchiometrisch aufgebautes HAP ergibt. Der Wert 0 bei der Zahl der Chloratome bedeutet, dass kein signifikantes Signal bei den zu erwartenden Energien für die Cl-2p-Linie zu detektieren war.

	Ca	P	O	C	Cl	Ca:P	Ca:O
before sputtering	4.5	3	14.5	7.1	0*	1.5	0.31
after sputtering	4.4	3	11.3	1.3	0*	1.46	0.38
nominal formula unit	5	3	13	0	0	1.67	0.38

Im Vergleich zum stöchiometrischen HAP ist sowohl vor als auch nach dem Reinigen der Oberfläche durch Ar-Ionenbeschuss das Material calciumdefizitär. Bei Sauerstoff liegt zunächst ein Sauerstoffüberschuss im Vergleich zu HAP vor, der sich nach dem Beseitigen der Adsorbatschicht allerdings ebenfalls in ein Defizit verwandelt. Umgekehrt könnte es in dem oberflächlichen Material aber auch einen Phosphatüberschuss geben.

## 6.4 Diskussion

Die vorher geschilderten Ergebnisse der Experimente zur Charakterisierung der HAP3-Pellets zeigen, dass während des FAST-Sinterns keine chemischen Umwandlungen des Materials auftreten. Insbesondere beweist keine der angewendeten Techniken die Existenz von TCP oder anderer Verbindungen nach dem Sinterprozess. Das Ergebnis von Messverfahren, die auf der Bestimmung von Atomzahlverhältnissen beruhen, sind mit Vorsicht zu bewerten, da beispielsweise der Unterschied im Messergebnis beim Verhältnis Ca:P bei TCP oder HAP  $2:1 = 1,5$  bzw.  $5:3 = 1,66$  beträgt. Der Unterschied zwischen beiden Ergebnissen übersteigt häufig das Auflösungsvermögen der jeweiligen Messtechnik. Bei der Röntgenbeugung würde sich ein Auftreten von TCP hingegen durch Röntgenreflexe entsprechend eines rhomboedrischen Kristallsystems bemerkbar machen, bei der EBSD-Messung im REM würden derartige Veränderungen durch die Messung entsprechender Rückstreumuster sichtbar werden. Beides ist nicht der Fall gewesen, und insofern bestehen die gesinterten Pellets ausschließlich aus HAP.

Eine eindeutig zuweisbare Ursache für die unterschiedlichen Materialeigenschaften bei den HAP2- bzw. den HAP3-Pellets ist schwierig. Einen Einfluss hat bestimmt das Sinterverfahren, das im Falle der FAST-gesinterten HAP3-Materialien erheblich aufwändiger ist als das bei den nach einem Pressvorgang gesinterten Material verwendeten einfachen Aufheizen einer Probe. Die Evakuierung der Ofenkammer bedingt z.B. ein beschleunigtes Entweichen eingeschlossener Gasvolumina innerhalb des Grünkörpers. Das Schließen einer Pore wird auf diese Weise erleichtert. Die Abwesenheit bestimmter Reaktionspartner in der Gasphase (z.B. Sauerstoff) kann eine chemische Veränderung der Probe verhindern. Gleiches gilt für die großen Aufheizraten und – dadurch bedingt – geringe Sinterdauer.

Aber auch die physikalische Form des Ausgangsmaterials hat einen Einfluss: Anhand des Vergleichs der Struktur von HAP2-FAST- und HAP3-Pellets kann der Einfluss der Form einzelner Körner beobachtet werden. Die Kugelform erlaubt eine dichtere Packung der Kristallite und damit bereits von Beginn der Sinterpräparation an ein vermindertes Gasphasenvolumen. Somit sind bereits ohne Sintern die HAP3-Grünkörper dank ihrer Kugelform dichter als diejenigen des HAP2-Pulvers.

Passend dazu besitzen die HAP3-Pellets im Vergleich mit den HAP2-Pellets eine nochmals erhöhte Dichte zwischen 3,03 und 3,14 g/cm<sup>3</sup>. Damit übersteigt die Dichte des Pellets auch diejenige von natürlichen Zahnschmelz, die 2,82 g/cm<sup>3</sup> beträgt [78]. Die hohe Dichte bedingt eine geschlossene, sehr porenarme Oberfläche, so dass unterschiedliche Bereiche der Pelletoberfläche topografisch vergleichbar werden. Die Dichte der HAP3-Pellets übersteigt diejenige der HAP2-Pellets (2,8 g/cm<sup>3</sup>).

Die HAP2-FAST-Proben zeigen ebenfalls eine weniger dichte Struktur als die HAP3-Pellets. Die unterschiedliche Form der HAP2- bzw. HAP3-Kristallite im Pulver könnte dafür ein Auslöser sein: Bei ungeordneter Schüttung des pulverförmigen Ausgangsmaterials ergibt sich im Falle der nadelförmigen HAP2-Kristallite eine geringere Packungsdichte als im Falle kugelförmiger Partikel. Die Beseitigung der Zwischenräume würden im Falle HAP2 eine relativ lange Sinterdauer erfordern, um damit auf eine ähnlich hohe Dichte zu kommen wie die HAP3-Pellets. Bei vergleichbarer Sinterdauer entstehen daher bei HAP2-FAST-Proben größere Hohlräume als bei HAP3-Proben. Wegen der thermischen Instabilität des HAP und der damit einhergehenden erhöhten Gefahr der Bildung von TCP sollte die Sinterdauer allerdings so kurz wie möglich gewählt werden. Auch deswegen wurde auf die weitere Präparation von HAP2-FAST-Pellets verzichtet.

Oberflächenvorgänge im Bereich von Poren können von diesen immer beeinflusst sein, und entsprechend ungünstig ist ein häufiges Auftreten auf der Oberfläche. Im Vergleich zu den HAP2-Pellets besitzen die HAP3-Pellets eine erheblich geringere Zahl von Poren auf der Oberfläche, was zu für weitere Experimente optimal nutzbaren Oberflächen führt.

Die EBSD-Messungen an HAP3-Pellets haben gezeigt, dass die einzelnen Körner entlang der geschliffenen Oberfläche einkristallinen Charakter besitzen. Aufgrund des anisotropen Aufbaus der HAP-Einheitszelle gehen damit unterschiedliche Eigenschaften und Wechselwirkungen einher. Werden HAP3-Pellets jedoch auf einer Skala größer als einige Mikrometer verglichen, dann werden die durch die variierende Orientierung hervorgerufenen Unterschiede mit zunehmender Systemgröße immer unbedeutender, und vielmehr wird der Mittelwert aller Wechselwirkungen interessant, der bei hinreichender Systemgröße wirksam wird.

Auf kleinen Skalen wiederum kann ein Einkristall entlang der Oberfläche des Pellet ausreichend groß sein, um darauf das Verhalten etwa einzelner Moleküle auf unterschiedlichen Orientierungen einer HAP-Oberfläche zu untersuchen. Für Systeme, deren Größe mit den Kristalliten vergleichbar ist, können statistische Methoden und/oder eine exakte Charakterisierung einer HAP3-Pelleteoberfläche zu Ergebnissen führen. Prinzipiell lässt sich die Oberfläche daher trotz ihrer inhomogenen Struktur für ein breites Anwendungsspektrum nutzen.

Durch den stufenweisen Schliff der Oberfläche und die anschließende, im Vergleich zur HAP2-Pellet-Präparation erweiterte Politur der Proben konnten Oberflächen besonders geringer Rauigkeit erzeugt werden. Die quantitative Charakterisierung wurde anhand von AFM-Aufnahmen der polierten Oberflächen durchgeführt. Dabei muss unterscheiden werden, ob das Rauigkeitsmaß auf einem einzelnen Korn oder unter Beteiligung mehrerer Körner des Gefüges bestimmt wurde. Durch den Präparationsprozess kommt es zu Höhenunterschieden zwischen den Kornoberflächen, und diese Unterschiede haben einen Einfluss auf die Größe der RMS-Rauigkeit, die nachfolgend jeweils auf  $(1 \mu\text{m})^2$  Oberfläche bezogen ist: Wird die Rauigkeit auf einem einzelnen Korn bestimmt, ist die Oberfläche mit einer Rauigkeit vom unter 1 nm extrem glatt. Wird der Wert hingegen zwischen zwei Körnern bestimmt, werden Rauigkeiten unterhalb 5 nm bestimmt.

Die laterale Größenordnung der angeschliffenen Körner der HAP3-Pellets beträgt wenige Mikrometer (vgl. z.B. mit Abbildung 6.9). Größere homogene Bereiche finden sich nicht, kleinere Bereiche sind dagegen häufiger zu finden. Sofern das Gefüge als dichte Packung großer Kristallite verstanden wird, ist die Entstehung dieser Struktur nachvollziehbar. Die dicht liegenden Körner besitzen in erster Näherung Kugelform, haben aber i.a. unterschiedliche Durchmesser und bilden auch keine angeordneten Lagen, so wie etwa Atome in Kristallen angeordnet sind. Eine Schnittebene in lateraler Richtung schneidet daher die Körner in unterschiedlichen Höhen, wo diese unterschiedliche Durchmesser besitzen. Daher besitzen die Schnittflächen somit ebenfalls unterschiedliche Größe. Ihre Maximalgröße wird allerdings bestimmt vom maximalen Durchmesser, den die dicht gepackten Kristallite innerhalb des Gefüges besitzen.

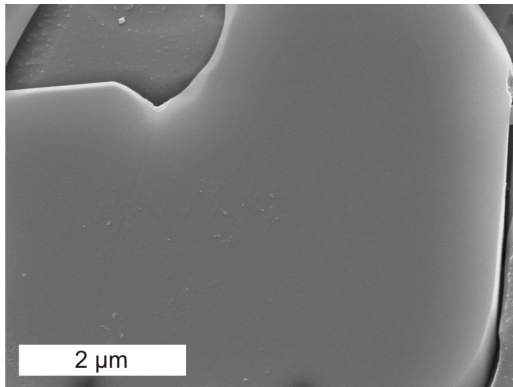
Zum Entfernen von Poliermittelresten wurden zwei Wege vorgeschlagen und bereits ansatzweise diskutiert. Das Anätzen der Oberfläche und das damit einhergehende Entfernen von Poliermittelresten ist in Bezug auf die gewünschte Morphologie kontraproduktiv, denn es vergrößert die Oberflächenrauigkeit, während die Probe so glatt wie möglich sein sollte. Rechtfertigung findet dieses Vorgehen in dem Ergebnis einer Oberfläche, wie sie in Abbildung 6.8 A gezeigt wird: Es sind keinerlei Partikel auf der Oberfläche erkennbar. Diese wichtige Eigenschaft spielt bei den Adhäsionsmessungen an Bakterien im nächsten Kapitel eine besondere Rolle.

Die beim Ätzen induzierte Höhendifferenz zwischen benachbarten Kornoberflächen raut die Struktur also auf, während bei der Präparation mit  $\text{CO}_2$ -Beschuss dies kaum auftritt. Auch hier ist die Oberfläche weitgehend frei von Partikeln des Poliermittels, aber die resultierende Rauigkeit ist auf die gesamte Bildfläche bezogen sehr viel geringer. Beim direkten Vergleich der beiden Teile von Abbildung 6.8 muss die unterschiedliche Höhenskalierung und die unterschiedliche Größe der gezeigten Oberflächenareale berücksichtigt werden. Dann fällt auch die überragende Qualität der  $\text{CO}_2$ -gereinigten Probe auf, deren rms-Rauigkeit sich auf der kompletten gezeigten Bildfläche zu 0,2 nm ergibt. Nachteil der  $\text{CO}_2$ -Reinigung sind die währenddessen auftretenden thermischen Spannungen, die schlagartig eine Probe in viele einzelne Bruchstücke

zerreißen können. Bei der Anwendung der Technik ist insofern immer Vorsicht geboten: Zwar ist die Qualität der resultierenden Probe überragend, es besteht allerdings ein Risiko für einen Totalverlust einer Probe. Es sollte daher vor Einsatz der Technik geprüft werden, ob nicht das Ätzen einer Pelletoberfläche eine mögliche Alternative darstellt.

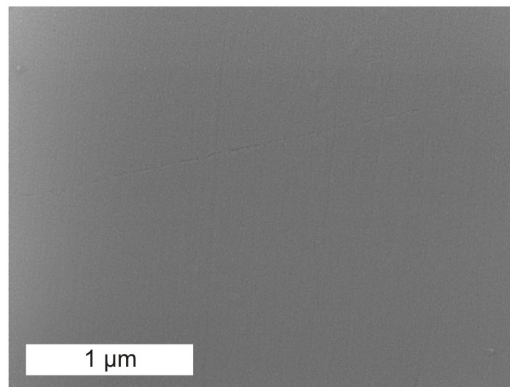
Insgesamt betrachtet bieten die nach der in diesem Kapitel gezeigten FAST-Präparationsmethode erzeugten Proben eine in höchstem Maße kontrollierte Oberfläche an. Durch entsprechende Nachbehandlung lassen sich extrem glatte Oberflächen erzeugen, deren RMS-Rauigkeiten lokal auch unterhalb von 1 nm liegen können. Struktur und Kristallorientierung lassen sich mit einfachen Methoden charakterisieren. Chemisch konnte durch intensive Untersuchung der HAP3-Pellets gezeigt werden, dass sie sich im Rahmen der Messgenauigkeit aus reinem Hydroxylapatit aufbauen.

Die hier erzeugten Proben erfüllen nachweislich die in Kapitel 2.6 formulierten Anforderungen an die Proben. Dass die Proben für Experimente gut nutzbar sind, wird nachfolgend in Kapitel 7 anhand von Adhäsionsexperimenten demonstriert. Der Fluorierbarkeit der Proben und somit ihrem chemischen Verhalten analog zur mineralischen Phase in Zahnschmelz und anderen Hartgeweben kommt dabei eine besondere Bedeutung zu.



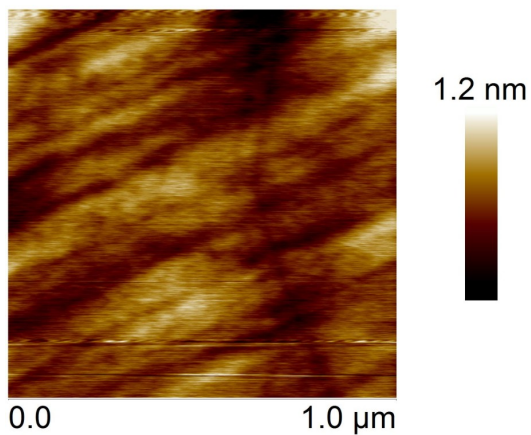
HAP3-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 5 min,  $\theta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ )

REM Anatomie Homburg



HAP3-K1-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 5 min,  $\theta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ )

REM Anatomie Homburg



HAP3-K1-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 5 min,  $\theta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ )

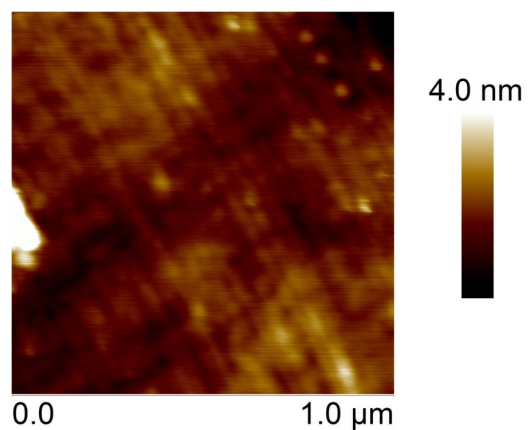
rms-Rauigkeit des gesamten Bildes:  
0,16 nm

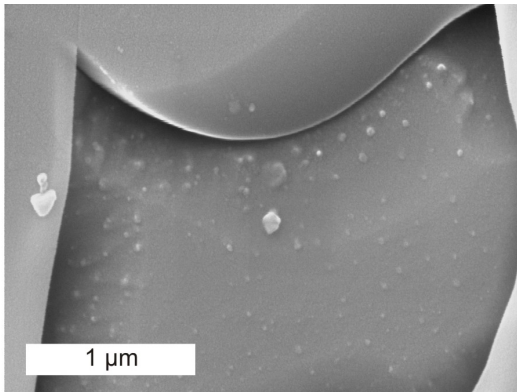
Dimension AFM

HAP3-K3-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 5 min,  $\theta = 20\text{ }^\circ\text{C}$ )

rms-Rauigkeit des gesamten Bildes:  
0,60 nm

Dimension AFM





HAP3-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 30 s,  $\theta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

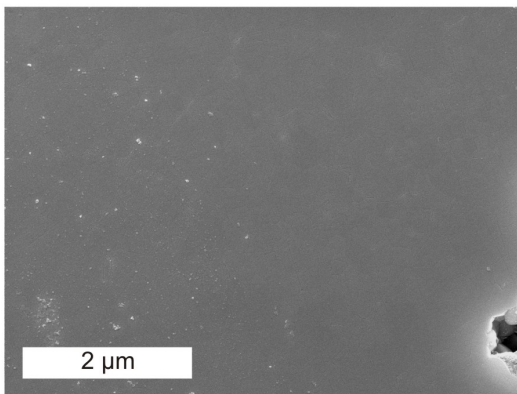
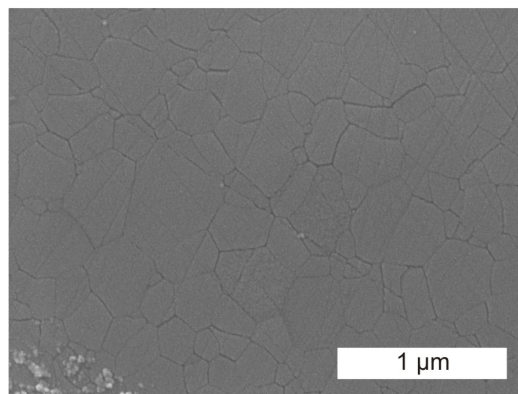
stark geätzter Oberflächenbereich

REM Anatomie Homburg

HAP3-K1-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 30 s,  $\theta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Auf kleiner Skala ist hier die  
Gefügestruktur sichtbar.

REM Anatomie Homburg



HAP3-K2-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 30 s,  $\theta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

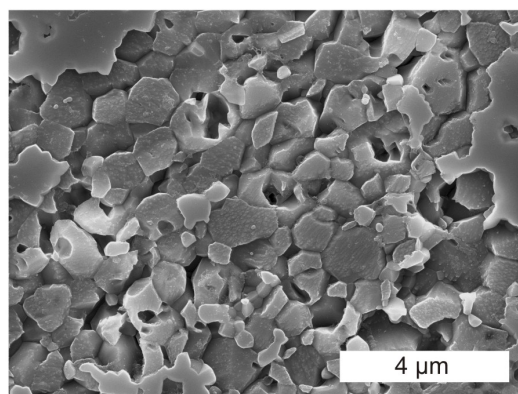
saubere (rechts) und verunreinigte  
Oberfläche (links)

REM Anatomie Homburg

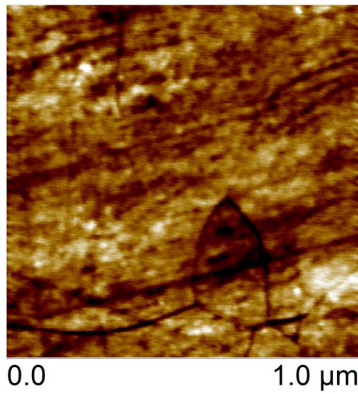
HAP3-K2-Pellet, poliert,  
angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer  
(pH 4.2, Dauer: 5 min,  $\theta = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ )

Gut erkennbar ist die ätzbedingte  
Höhendifferenzierung einzelner Körner.

REM Anatomie Homburg







1.5 nm

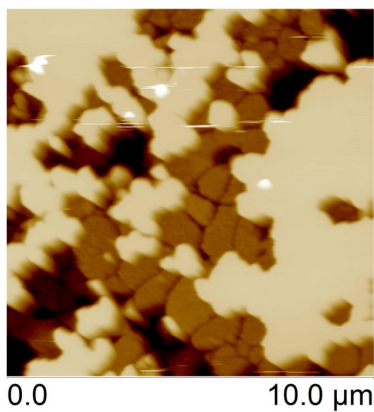
HAP3-K5-Pellet, poliert,

Zum Entfernen der Reste des Poliermittels wurde diese Probe mit einem CO<sub>2</sub>-Strahl abgerastert.

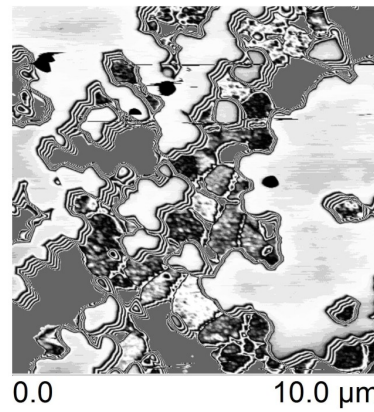
Dimension AFM

HAP3-K2-Pellet, poliert, angeätzt in Essigsäure-Acetat-Puffer (pH 4.1, Dauer: 60 s, Temperatur: 20 °C), aufgenommen am icon AFM;

Die folgenden zwei Bilder zeigen deutlich, dass das Ätzverhalten der Pellets von den Körnern entlang der Oberfläche abhängt. bereits im linken Bild sind zwei Höhenbereiche zu erkennen, die nach dem Ätzen entstehen. Das rechte Bild zeigt diesen Umstand noch deutlicher durch die Verwendung einer gestauchten, stark variierenden Farbskala. Deutlich sind „Isolinien“ zu sehen, die an den Übergängen zwischen den Höhenstufen auftreten. Auf den Stufen selber sind hingegen nur geringe Höhenunterschiede detektierbar.



450.0 nm



450.0 nm



## 7 Messung fluoridgehaltabhängiger Adhäsionskräfte von Bakterien auf HAP-Oberflächen

In den Kapiteln 5 und 6 sind Präparationsverfahren vorgestellt worden, mit denen HAP-Proben mit kontrollierten Eigenschaften hergestellt werden können. Diese *Pellets* haben daher auch eine in gegebenen Grenzen chemisch und strukturell kontrollierbare Oberfläche, wie dies bereits in den vorangegangenen Kapiteln dargelegt worden ist: Durch den Grad der Politur ist z.B. die oberflächliche Rauigkeit einstellbar, und die Oberflächenchemie kann durch Fluorierung beeinflusst werden. Im nun folgenden Kapitel soll anhand von Messungen zur Adhäsionskraft von Bakterien auf HAP-Oberflächen ein Anwendungsbeispiel vorgestellt werden.

### 7.1 Präparation der AFM-Spitzen und der Oberflächen

#### HAP-Pellets

Entsprechend der im vorangehenden Kapitel beschriebenen Prozedur wurden HAP3-Pellets präpariert und poliert. Die Oberfläche besitzt dann eine Rauigkeit von einer Größenordnung unter zehn Nanometer (siehe Kapitel 6.3). Mit Hilfe einer Vakuum-Bedampfungsanlage wurde danach entlang des Durchmessers eines Pellets ein etwa 4 mm breiter und 80-100 nm dicker Goldfilm aufgebracht. Die Dickenmessung des bereits abgeschiedenen Materials erfolgte dabei mit Hilfe eines Quartzmonitors (Deposition Monitor, Firma Inficon). Der aufgebrachte Streifen dient bei den Experimenten als eine Grenzmarkierung zwischen fluoriertem und nicht-fluoriertem Teil der Oberfläche. Gold bleibt wegen seiner hohen Korrosionsbeständigkeit bei allen nachfolgenden Schritten in den Versuchen unbeteiligt: Weder geht es in Lösung, noch werden Versuche auf dem Goldstreifen durchgeführt. Da es nur gebunden entlang der Oberfläche und dann auch nur im Bereich der Markierung vorkommt, beeinflusst das Gold aus dem Film nicht das Verhalten der Bakterien. In ähnlichen Umgebungen wurde die Unempfindlichkeit von Bakterien gegenüber Goldschichten anhand von Wachstumsversuchen bereits untersucht [98].

Als Fluorierungsmittel wurde Natriumfluorid (NaF) verwendet. Hiervon wurde eine wässrige Lösung mit 1000 ppm  $F^-$  (entsprechend 220,9 mg NaF pro 100 ml Wasser) zubereitet. Der sich durch das Lösen des NaF einstellende pH-Wert liegt um 9, die Lösung ist also leicht alkalisch. Sie wurde in ein Becherglas eingefüllt, so dass dieses etwa halb gefüllt war. Die Probe wurde so an einem Stativ befestigt, dass der Goldstreifen parallel und die Oberfläche senkrecht zum Meniskus der Lösung im Becherglas verlief (Abbildung 7.1). Durch Hinzugabe weiterer Lösung wurde der Flüssigkeitsspiegel der Lösung in dem Becherglas vorsichtig soweit erhöht, dass nur der Teil der Probe unterhalb der Goldmarkierung in die Fluorid-Lösung eintauchte. Es wurde

solange Lösung eingefüllt, bis die zur Probe sich ausbildende Kapillare auf der Goldmarkierung endete. Auf diese Weise wurde auf einfachem Wege garantiert, dass die Fluoridlösung keinesfalls mit dem oberen Teil des HAP-Pellets in Berührung kam.

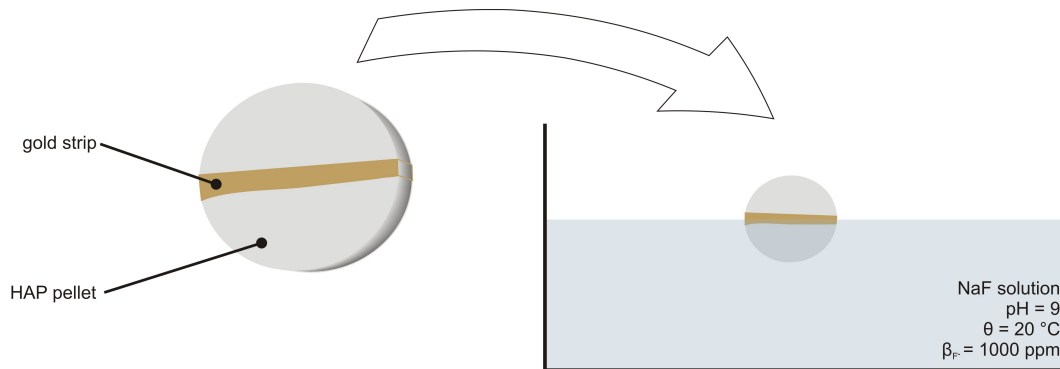


Abbildung 7.1: Schematische Darstellung, wie ein HAP3-Pellet während der Fluorierung fixiert wurde. Da die Höhe der Flüssigkeit im Becherglas sehr langsam geändert werden kann, konnte nach dem im Text beschriebenen Verfahren eine Berührung der Fluorierungsmittels mit der nicht zu fluoridierenden Hälfte der Probe ausgeschlossen werden.

Nach dem vollständigen Eintauchen des unteren Probenteils wird das Pellet für fünf Minuten in der Fluorierungslösung belassen. Nach dieser Einwirkzeit wurde es in ein Wasserbad getaucht um die dann an der Pelletoberfläche vorhandene Fluoridkonzentration schnell zu senken. Abschließend wurde das gesamte Pellet für fünf Minuten in ein Ultraschallbad mit frischem Wasser gegeben, wiederum um oberflächlich anhaftende Rückstände des Fluorierungsmittels zu entfernen. Dadurch entstand eine Probe, auf deren Oberfläche sich die chemische Zusammensetzung in Bezug auf den Fluoridgehalt auf den beiden durch den Goldstreifen geteilten Hälften erheblich unterscheidet. Die Morphologie der Oberfläche hingegen ist aufgrund der vorab durchgeführten, gemeinsamen Präparartion beider Seiten gleichwertig. Auch die Fluorierung bleibt bei einem pH von 9 folgenlos für die Oberflächenstruktur. Dies kann anhand der AFM-Aufnahmen in Abbildung 7.2 nachgewiesen werden, die von einer einzelnen Stelle der Probenoberfläche A) vor und B) nach Fluorierung aufgenommen wurden. Im Vergleich zur Größe einer Bakterienzelle ( $\sim 1 \text{ } \mu\text{m}$ ) sind die Unterschiede zwischen beiden Bildern vernachlässigbar.

## Bakterien

Ziel dieser Untersuchung war herauszufinden, ob und wie sich die Adhäsionskräfte von Bakterien von einem unterschiedlichen Fluoridgehalt einer Oberfläche beeinflussen lassen. Um zu überprüfen, ob ein derartiger Einfluss auch von der Bakterienspezies abhängig ist, wurden drei unterschiedliche Arten verwendet: *Staph. carnosus*, *Staph. oralis* und *Strep. mutans*. [99]. Die *Staph. oralis* und *Strep. mutans* Stämme wurden von der Klinik für Zahnerhaltung, Parodontologie und Präventive Zahnheilkunde (Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg,

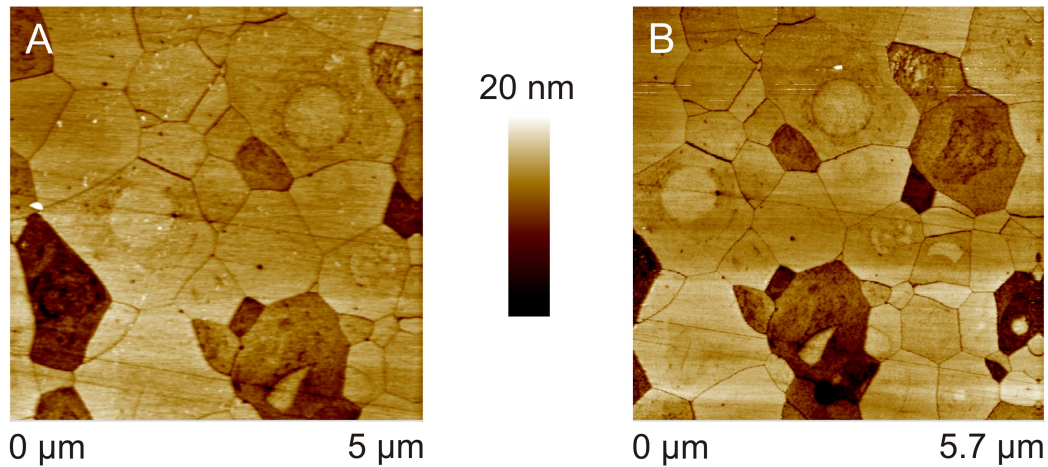


Abbildung 7.2: Vergleich einer HAP3-Oberfläche vor und nach Fluorierung. Bei der Fluorierung der Oberfläche lassen sich im direkten Vergleich zweier an derselben Stelle der Oberfläche aufgenommener AFM-Höhenbilder keine relevanten Veränderungen erkennen. Die Rauigkeit von Teilbild A beträgt 2,2 nm, in Teilbild B 3,0 nm. (Reprint with permission from [99]. Copyright 2013 American Chemical Society)

Deutschland) zur Verfügung gestellt. Von diesen Keimen ist bekannt, dass sie Erkrankungen im Mund-/Rachenraum auslösen, unter anderem Zahnkaries. Von *Staph. carnosus* ist hingegen bekannt, dass er, anders als die anderen verwendeten Bakterien, in seiner Zellwand keine **Adhäsine** enthält. Dabei handelt es sich um Proteinmoleküle in der Zellwand, die eine besonders starke Wechselwirkung mit Oberflächen erzeugen können. Durch deren Abwesenheit besitzt der Keim eine nur geringe Pathogenität, obwohl er weit verbreitet ist. Dieser *Staph. carnosus*-Stamm mit der Bezeichnung „TM300“ wurde von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die Bakterien wurden jeweils bei  $-80\text{ °C}$  in TSB (*tryptone soy broth*, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) mit einem Anteil von 15% Glycerin aufbewahrt. Zur Kultivierung wurden die Bakterien jeweils auf TSB-Schafsblut Agar-Platten bei  $37\text{ °C}$  über Nacht bebrütet. Die Bakterienkolonien wurden danach in 5 ml Müller-Hilton-Kulturen (MH; BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) für 6 h bei  $37\text{ °C}$  bei 150 Umdrehungen pro Minute vorkultiviert.  $300\ \mu\text{l}$  jeder Vorkultur wurden verwendet um damit eine aus 10 ml MH bestehende Hauptkultur anzupflanzen. Nach 16 h Wachstum bei 150 Umdrehungen pro Minute und  $37\text{ °C}$  wurden daraus die Bakterien geerntet, und zwar durch Zentrifugieren bei  $1900\text{ g}$  für 10 min bei  $20\text{ °C}$ . Die gewonnenen Bakterien wurden zweimal mit je 10 ml PBS-Puffer<sup>1</sup> (10 mM Kaliumphosphat, 0,15 M Kochsalz; pH 7) gewaschen. Am Ende wurden die Bakterien in PBS dispergiert so dass

<sup>1</sup>engl. *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung. Der pH-Wert entspricht dem  $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ -System von 7,4, und die Ionenkonzentration sorgt für einen osmotischen Druck entsprechend physiologischer Bedingungen.

eine Konzentration von  $10^9$  Zellen pro Milliliter erhalten wurde.

## AFM-Spitzen

Eine Möglichkeit, die Adhäsionskraft von Bakterien auf eine Oberfläche zu bestimmen, ist die Kraftspektroskopie mit einem Rasterkraftmikroskop, wie sie in Kapitel 3.3 vorgestellt worden ist. Zur Funktionalisierung werden dafür Silizium-Federbalken ohne Spitze (PNP-TR\_TL, Nanoworld, Neuchâtel, Schweiz und MLCT-0, Bruker, Santa Barbara, USA) als Sonde verwendet. Diese wurden zunächst in Luftplasma<sup>2</sup> gereinigt und anschließend für eine Stunde in eine wässrige Poly-L-Lysin-Lösung (MP Biomedicals, Solon, USA,  $c = 0,1$  mg/ml) eingelegt. Dabei bildet sich auf den Federbalken ein Lysinfilm, auf dem Bakterien wegen seiner positiven Ladung (in PBS-Puffer, pH=7,3) eine besonders starke Haftung zeigen.

Für alle nachfolgenden Präparations- und Messschritte wird jeweils als Puffer PBS verwendet. Die Sonden werden für eine Stunde bei  $4\text{ °C}$  im Kühlschrank in die vorbereitete Bakterien suspension eingelegt. Einige der darin enthaltenen Bakterien binden während dieser Zeit elektrostatisch auf der Lysinschicht, und es bildet sich mit der Zeit ein Bakterienfilm auf dem Federbalken, wie er in Abbildung 7.3 zu erkennen ist. Abschließend wurden die Federbalken vorsichtig mit Puffer gespült, um nicht fest anhaftende Bakterien (z.B. bei Adsorption in Multilage oder ohne festen Oberflächenkontakt) zu entfernen. Die so präparierten Bakterien spitzen wurden direkt vor der Durchführung von Experimenten präpariert, da sie lediglich für einige Stunden unter Pufferlösung aufbewahrt werden können.

## 7.2 Messaufbau und Durchführung

Das teilfluorierte HAP-Pellet wurde im Kraftmikroskop fixiert und so mit Puffer bedeckt, dass sich über der polierten Oberseite eine dünne Flüssigkeitsschicht befindet. Darin wurde der Spitzenhalter des Kraftmikroskops eingetaucht, so dass die Adhäsionsmessungen vollständig in PBS bei definiertem pH (pH=7,4) und definierter Ionenstärke entsprechend physiologischer Bedingungen sowie ohne die Gefahr des Austrocknens des Bakterienfilms durchgeführt wurden.

Eine Hälfte der Pelletoberfläche wurde willkürlich für den Beginn der Messungen ausgewählt. Nach der Annäherung der Bakterien spitze an die Oberfläche wurden die Messparameter für die Kraftspektroskopie (u.a. Trigger für Bewegungsumkehr, Rampenlänge, Geschwindigkeit) so gewählt, dass verwertbare Kraft-Distanz-Kurven gewonnen wurden. Mit diesen Parametern wurde ein Raster von 50 Punkten auf der Oberfläche abgefahren, an denen jeweils eine Kraft-Distanz-Kurve aufgezeichnet wurde. Dies führt zu einer Mittelung von Oberflächeneigenschaften, die wegen lokaler Variationen der Topografie oder der chemischen Zusammensetzung notwendig ist. Anschließend wurden die Messungen auf der anderen Seite der Pelletprobe fortgesetzt. Hier wurde nach erneuter Einstellung der Messparameter ebenfalls ein Raster programmiert, dieses mal allerdings mit der doppelten Anzahl von Punkten. Messwertbeeinflussende Parameter wie die Andruckkraft oder die Verweildauer auf der Oberfläche bleiben

---

<sup>2</sup>Der eingesetzte Plasmareiniger ist ein Eigenbau

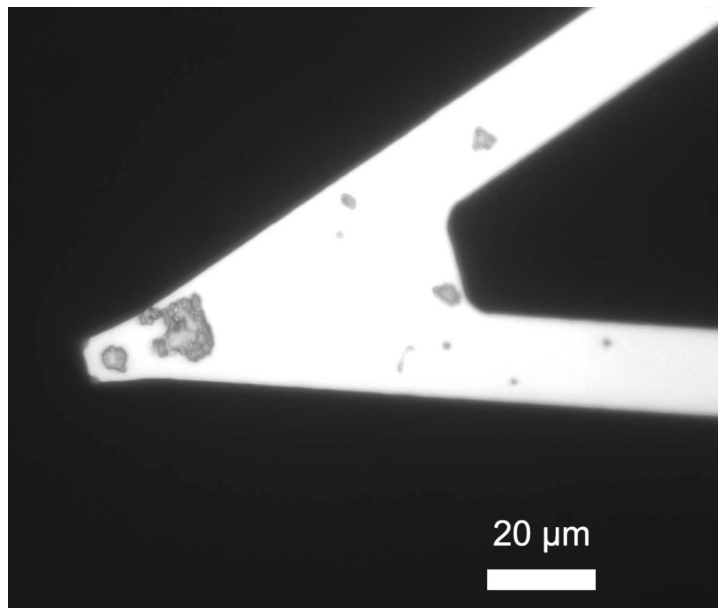


Abbildung 7.3: Spitzenloser AFM-Federbalken nach Präparation der Polylysinschicht und Lagerung der AFM-Sonde für eine Stunde in einer Bakteriensuspension im Kühlschrank. An der Spitze sind deutlich die angelagerten Bakterien zu erkennen. (Reprint with permission from [99]. Copyright 2013 American Chemical Society)

aber unverändert gegenüber den vorausgegangenen ersten Punkten. An jeder einzelnen Position des Punkterasters wurde wiederum eine Kraft-Distanz-Kurve aufgezeichnet. Abschließend wurden nochmals in dem zuerst untersuchten Oberflächengebiet des Pellets weitere 50 Kraft-Distanz-Kurven in einem Gitter aufgenommen. Dieser zweite Durchgang und der Vergleich der entsprechenden Ergebnisse mit denjenigen aus dem ersten Durchgang erlaubt für jede Hälfte der Oberfläche eine Einschätzung von Veränderungen, die während der gesamten Messung passiert sein könnten: Beispielsweise könnte sich durch das Ablösen einzelner Bakterien die maximal mögliche Adhäsionskraft vermindert haben. Dies würde aber zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen. Bei signifikanten Abweichungen der Adhäsionskräfte des ersten und des letzten Messdurchganges wurden die Messungen daher als nicht vertrauenswürdig eingestuft und für eine weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Das beschriebene Vorgehen wurde nach Datenlage und Stabilität der Messung mehrfach wiederholt.

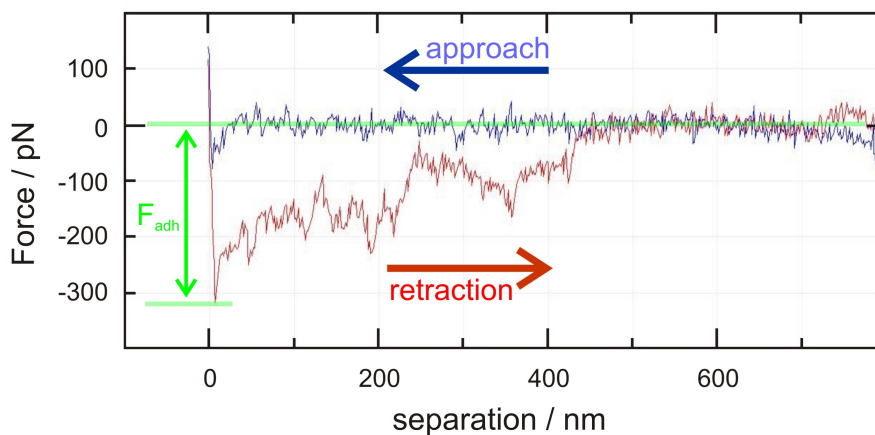


Abbildung 7.4: Beispiel einer Kraft-Distanz-Kurve bei Annäherung (*approach*) und beim Zurückziehen (*retraction*) einer bakterienfunktionalisierten Spitze an ein HAP3-Pellet. (Reprint with permission from [99]. Copyright 2013 American Chemical Society)

Die nach vorangehender Schilderung gewonnen Kraft-Distanz-Kurven wurden mit Hilfe der *NanoScope Analysis* Software [100] ausgewertet. Aus jeder einzelnen Messung wird die Haftkraft der Bakterienspitze auf der Oberfläche als Tiefe des in der Kurve vorhandenen Adhäsionsminimums abgelesen (vgl. Abbildung 7.4, Details zur Methode sind in Kapitel 3.3 aufgeführt): Bei der Annäherung (blaue Kurve, wird von rechts nach links durchlaufen) wirkt bis kurz vor die Oberfläche keine Kraft auf die Spitze, weswegen die detektierte Kraft auch (bis auf Signalauschen) 0 beträgt. Beim sog. *Snap-In* wirkt kurz vor der Oberfläche eine anziehende Kraft (negatives Vorzeichen) auf die Spitze, die zum „Ansnappen“ der Spitze an die Oberfläche führt. Bei weiterer Annäherung bleibt die Spitze im Kontakt mit der Oberfläche und dringt nicht weiter vor, und die Annäherung wird vollständig in eine Verbiegung des Federbalkens umgesetzt. Die Steigung des scharf ansteigenden Teils der Kurve entspricht bei harten Oberfläche daher der Verbiegungsempfindlichkeit des Federbalkens, die als notwendiger Parameter auch für die Auswertungen hier abgelesen wird. Bei Erreichen einer vorher festgelegten Kraft



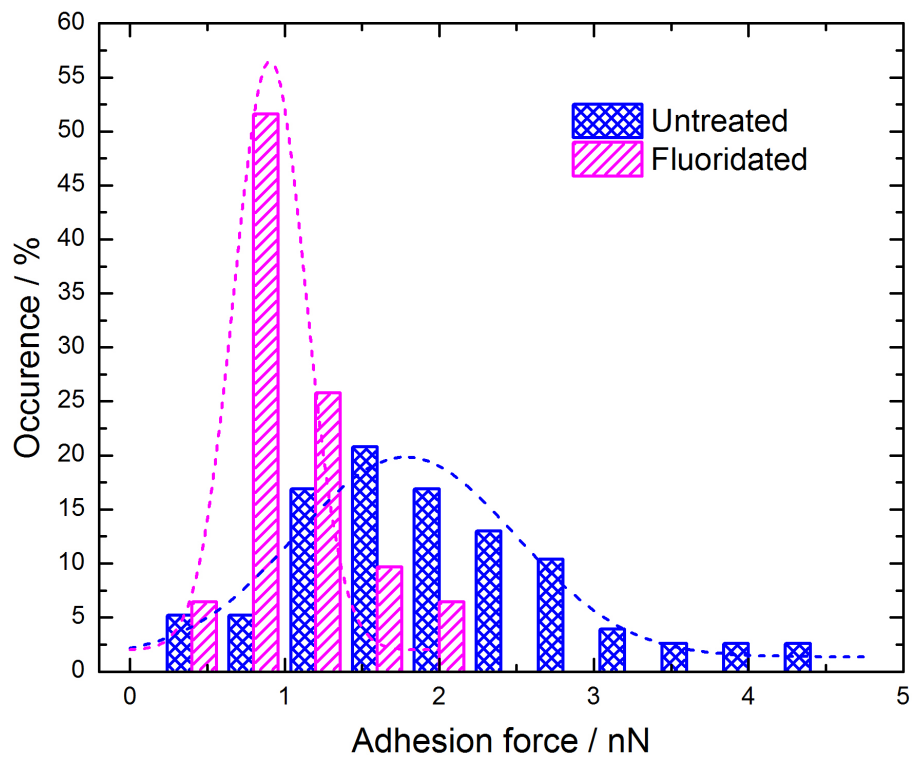


Abbildung 7.5: Beispiel eines Histogramms, das sich bei Messung der bakteriellen Adhäsionskräfte auf fluoridierter bzw. unbehandelter Oberfläche ergibt.

wird die Bakterienspitze dann wieder zurückgezogen (rote Kurve, von links nach rechts). Die Adhäsion zur Oberfläche hält dann die Spitze im Kontakt mit der Oberfläche, solange die anziehende Kraft der Oberfläche größer als die zurückziehende Kraft ist. Sobald sich diese Relation umkehrt, bewegt sich die Spitze zurück in ihre Ruhelage. Als Adhäsionskraft  $F_{adh}$  wird immer die eingezeichnete Kraft verstanden, die sich aus der maximalen Auslenkung des Federbalkens bei der Rückzugskurve ergibt. Sekundäre Minima der Rückzugskurve entlang der Rückkehr zur Ruhelage repräsentieren weitere Kontaktpunkte, die nachfolgend getrennt werden, oder Entfaltungsvorgänge von an der Adhäsion beteiligten Makromolekülen.

Für jede verwendete Spitze und jede verwendete Probenhälfte werden die ermittelten Adhäsionskräfte in einem separaten Histogramm aufgetragen, wie es exemplarisch in Abbildung 7.5 gezeigt ist. Unter der Annahme einer poissonverteilt auftretenden Haftkraft kann der Mittelwert als Maximumstelle im Histogramm abgelesen werden. Die Signifikanz der Ergebnisse auf unterschiedlichen Oberflächen wurde beim Vergleich von fluorierten mit nicht fluorierten Oberflächen bei Verwendung derselben Spitze mit einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) untersucht.

Für die Eichung des Kraftmikroskops als Kraftsensor muss die Federkonstante des Federbalkens und die Verbiegungsempfindlichkeit entsprechend der Ausführungen in Kapitel 3.3 nach Abschluss der Experimente bestimmt werden.

### 7.3 Ergebnisse

#### Morphologie und Fluoridverteilung nach Fluorierung mit pH 9

Um Adhäsionsvorgänge auf verschiedenen Oberflächen vergleichen zu können, muss deren jeweilige Struktur miteinander vergleichbar sein. Die Löslichkeitseigenschaften des HAP führen bei der Anwendung saurer Fluorierungsmittel zu Lösungsvorgängen entlang der Oberfläche, und damit zu einer unkontrolliert sich vergrößernden Rauigkeit [30, 101]. Wegen des schlecht kontrollierbaren Einflusses der Rauigkeit auf Adhäsionsexperimente war eine derartige Veränderung der Oberfläche unter allen Umständen zu vermeiden. Für pH-Werte über 7 wird für HAP eine höhere Stabilität vorausgesagt [30], weil der Überschuss an OH-Gruppen das Herauslösen von OH-Gruppen aus der Kristallstruktur minimiert und damit die Struktur insgesamt stabilisiert.

Die Wahl der Fluoridionenkonzentration von 1000 ppm orientiert sich an Zahnpflegeprodukten, die bis zu 5000 ppm Fluorid enthalten können [102], und an der durch Speichel und Wasser eintretenden Verdünnung. Beim Herstellen einer derartigen Fluoridlösung ergibt sich der pH-Wert idealerweise in einem Bereich, in dem HAP eine sehr geringe Löslichkeit zeigt. Für die Messungen wurden deshalb angemessene Fluorid-Konzentrationen sowie an die Löslichkeit des HAP angepasste (und hier aus Gründen der Strukturhaltung der Oberfläche notwendige) pH-Werte verwendet.

Der Einfluss der Fluorierung auf die Oberflächenmorphologie wurde wie vorab bereits gezeigt aufgrund seiner Wichtigkeit kraftmikroskopisch mit einem Bioscope<sup>®</sup> AFM der Firma Bruker

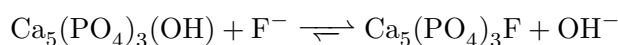
(Michigan, USA) mit Nanoscope V Controller dokumentiert. Unterschiede zwischen einer frisch präparierten und einer fluorierten Oberfläche können durch direkten Vergleich beliebiger Stellen vor und nach Fluorierung überprüft werden. Die Rauigkeiten der in Abbildung 7.2 A gezeigten Oberfläche beträgt in unbehandelten Fall 2,2 nm. Nach Anwendung der Fluorierungslösung steigt die Rauigkeit in Abbildung 7.2 B leicht an auf 3,0 nm. Beide Bilder wurden im *Tapping Mode*<sup>®</sup> aufgenommen.

Die Verteilung des Fluor in der so behandelten Probenoberfläche (pH=9,  $c(\text{F}^-)=1000$  ppm) ist bisher noch nicht analysiert worden, weswegen per XPS (in einem ESCALab MkII Spektrometer, Vacuum Generators, Hastings, UK) ein analog zu Kapitel 5 erstelltes Fluor-Tiefenprofil erstellt worden ist. Das hierfür präparierte Pellet wurde vollständig in eine Fluorierungslösung bei pH 9 eingetaucht. Abbildung 7.6 zeigt die grafische Darstellung des Ergebnisses: Die Fluorkonzentration besitzt offenbar ein Maximum etwa 10 nm unterhalb der Probenoberfläche. In der Abbildung sind die Ergebnisse mehrerer Messungen zusammengefasst, die auch untereinander relativ starke Variationen der Konzentrationsverläufe mit zunehmender Tiefe zeigen.

Um das Ergebnis zu verifizieren, wurde die Oberfläche von Probe 1 sehr grob und weit abgeschliffen. Dadurch wurde ein Einfluss vorhergehender Messungen an der Oberfläche des Pellets unterbunden. Doch auch nach dieser Präparation und erneuter Fluorierung bleibt der Verlauf der Fluoridkonzentration nicht-monoton. Eine weitere untersuchte Probe reproduziert qualitativ ebenfalls den nicht-monotonen Verlauf der Fluorkonzentration, die Gesamtmenge von Fluor in der Probe ist allerdings niedriger als in den vorab durchgeführten Messungen. Hierfür könnten strukturelle Eigenschaften der jeweiligen Pellets verantwortlich sein.

Bei allen vorher gemessenen Proben lag die maximale Fluoridkonzentration hingegen direkt an der Oberfläche der Probe. Die Maximalzahl der Fluoratome liegt mit lediglich etwa 1at% an der Gesamtzahl der enthaltenen Atome niedriger als in den anderen bereits in Kapitel 5 vorgestellten Ergebnissen. Die direkt an der Oberfläche bestimmte Fluorkonzentration ist dabei verträglich mit XPS-Messungen anderer Untersuchungen bei hohen pH-Werten, bei diesen wurde allerdings kein Tiefenprofil bestimmt [103].

Eine Hypothese für die nicht-monotone Abnahme des Fluorids von der Oberfläche hin zu größeren Tiefen bezieht den pH-Wert der Fluorierungslösung in die Überlegungen ein: Das Ausmaß der Ersetzungsreaktion



wird beeinflusst von der Differenz der Bindungsenergien der Hydroxid- bzw. der Fluoridionen einerseits und ihrer jeweiligen Konzentration andererseits. In der Lösung befindliche Hydroxidionen konkurrieren quasi mit den Fluoridionen um Gitterplätze im HAP. Zwar hat das Fluoridion eine etwas höhere Bindungsenergie im Gitter, womit es größere Bindungskräfte erfährt, die große Zahl der Ionen in der Lösung bewirkt aber einen Diffusionsdruck von Hydroxidionen in das Gitter. Das o.g. chemische Gleichgewicht der Ersetzungsreaktion verlagert sich somit unter dem Einfluss des hohen pH-Wertes mehr zu den Edukten. Je weiter von der Oberfläche der Probe entfernt die Ersetzung stattfindet, umso geringer ist allerdings die Überschusskonzentration der Hydroxidionen aus der Lösung, so dass mit zunehmender Tiefe die höhere Bindungsenergie des Fluoridions wieder die Oberhand über die dann verminderte Hydroxidionenkonzentration

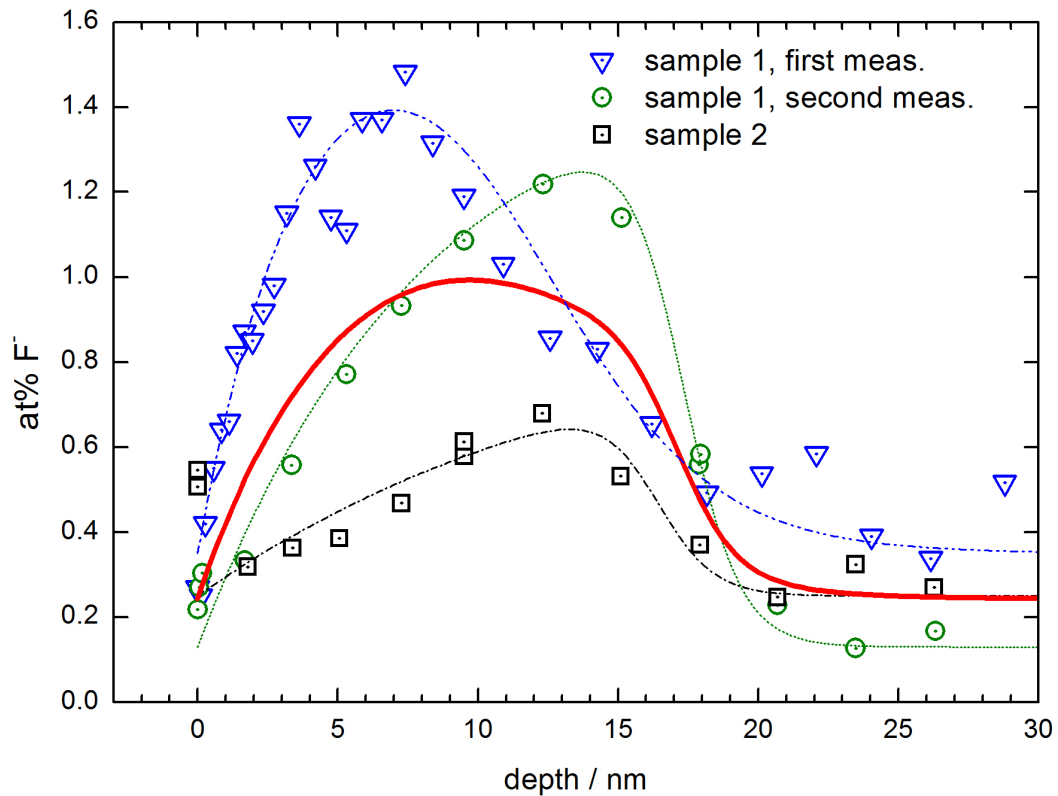


Abbildung 7.6: Ergebnis der Fluortiefenprofilmessung per XPS an HAP3-Proben nach Fluorierung bei pH 9. Dargestellt sind durch die Symbole die Messwerte dreier Messreihen, deren Verlauf im Vergleich untereinander eine relativ große Abweichung voneinander zeigt. Die gepunkteten Linien zeigen die Anpassungen der Messwerte einer einzelnen Messreihe an eine Exponentialfunktion, die für große Tiefen gegen 0 konvergiert. Aus diesen Funktionen wurde dann durch Mittelwertbildung der als durchgezogene Linie ermittelte Verlauf eines Gesamtergebnisses der Tiefenprofilmessung ermittelt.

gewinnt. Die Fluoridkonzentration steigt daher mit zunehmendem Abstand von der Oberfläche zunächst an. Da natürlich auch die Fluoridionen nur durch Diffusion in die Oberfläche eindringen, entspricht die Eindringtiefe relativ genau dem bei einem pH von 6,2 an den HAP2-Pellets in Kapitel 5 bestimmten Wert.

### Ergebnisse der Adhäsionsmessungen

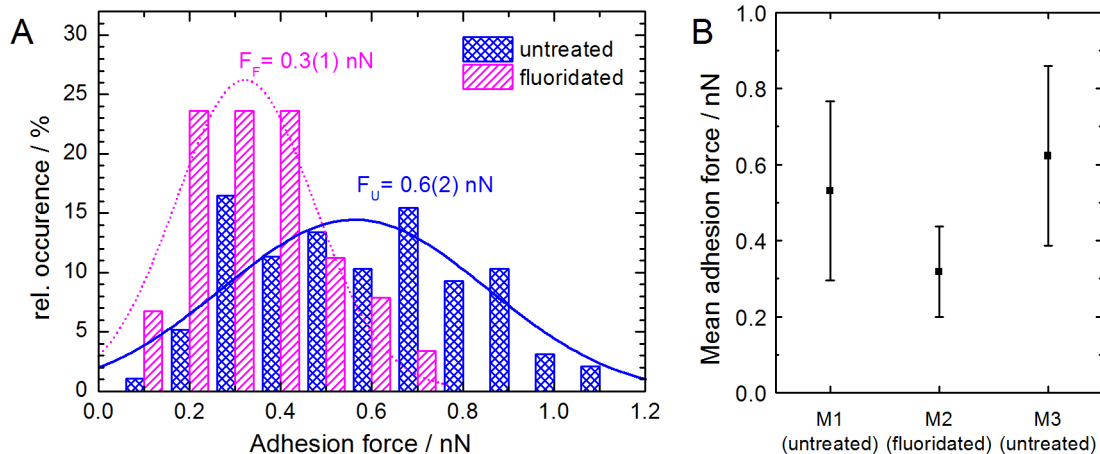


Abbildung 7.7: A: Histogramm der während einer Adhäsionsmessung bestimmten einzelnen Haftkräfte. Auf dem fluoridierten Teil (schraffiert) der Oberfläche sind die Haftkräfte signifikant geringer als auf dem unbehandelten Teil (kariert). B: Mittlere Adhäsionskräfte im Verlauf der Messung auf den unterschiedlich behandelten Teilen der Oberfläche. (Reprint with permission from [99]. Copyright 2013 American Chemical Society)

Die Auswertung der Adhäsionsexperimente zeigt eine signifikante Herabsetzung der Adhäsionskräfte von Bakterien auf einer fluoridierten HAP-Oberfläche im Vergleich zu einer unbehandelten. Abbildung 7.7 fasst dies beispielhaft anhand einer einzelnen Messreihe zusammen.

Abbildung A zeigt ein Histogramm aller Messergebnisse dieser Messreihe, wobei alle Messungen an einem Bioscope<sup>®</sup> AFM der Firma Bruker (Michigan, USA) mit Nanoscope V Controller durchgeführt worden sind. Es sind für die Messungen auf der unbehandelten wie auch auf der fluoridierten Oberfläche jeweils normalverteilte Messergebnisse zu erkennen, wobei das Maximum und damit der Mittelwert dieser Verteilung im Falle des fluoridierten Materials bei signifikant geringeren Werten liegt. In dem gezeigten Fall beträgt er nur 50% des Wertes, der für den Fall der unfluoridierten Probe bestimmt werden kann. Beide Verteilungen beginnen jeweils bei 0 nN und erreichen im unbehandelten Fall die maximal wirkende Kraft von 1,1 nN, im fluoridierten Fall von 0,7 nN.

Abbildung B zeigt die Mittelwerte der Adhäsionskräfte aus den hintereinander durchgeführten Teilmessungen auf den unterschiedlich behandelten Oberflächen. Die nicht signifikante Abweichung der Ergebnisse der dritten, auf der unbehandelten Oberfläche durchgeführten Gruppe

von Einzelmessungen (M3) gegenüber der ersten (M1) demonstriert, dass sich die funktionalisierte Spitze noch genauso verhält wie zu Beginn des Experimentes. Solche Abweichungen können auftreten durch Umsortierung oder Verlust von Bakterien am Federbalken, und starke Abweichungen der Messergebnisse voneinander würden Zweifel an der Konsistenz der Experimente wecken. Da sich das System aber auf gleichen Oberflächen auch gleichartig verhält, sind Abweichungen durch Veränderungen an der funktionalisierten Spitze insbesondere durch einen Verlust von Bakterien während der Messung ausgeschlossen.

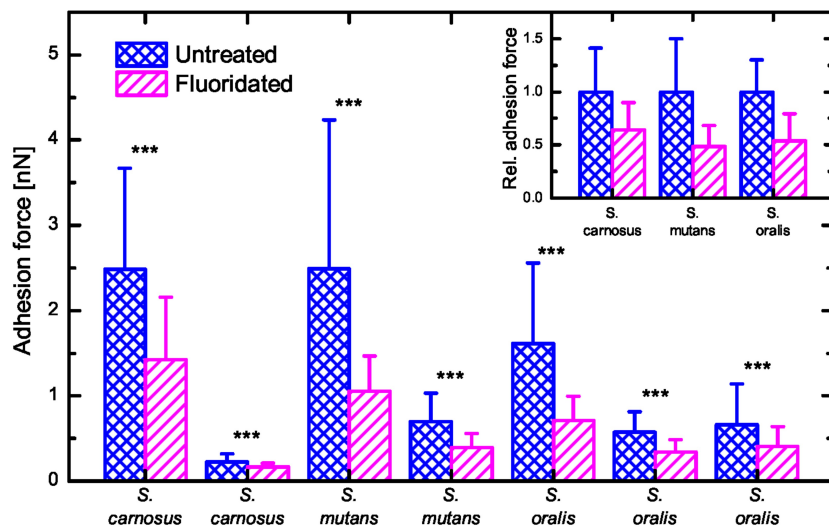


Abbildung 7.8: Zusammenstellung der Ergebnisse aus den Adhäsionsmessungen unterschiedlicher Bakterienspezies auf fluoridierten und unbehandelten HAP-Pellet-Oberflächen. Bei allen Messungen tritt zwischen der unbehandelten und der fluoridierten Oberfläche ungefähr eine Halbierung der gemessenen Adhäsionskraft auf. Der relativ große Fehler in den Messungen resultiert aus der Fixierung des Minimums der Messergebnisse bei 0 nN und der damit automatisch auftretenden Breite der Messwertverteilung. (Reprint with permission from [99]. Copyright 2013 American Chemical Society)

Abbildung 7.8 zeigt eine Zusammenstellung der gemessenen Mittelwerte aus Messreihen mit verschiedenen Bakterienspezies, und zwar jeweils auf der fluoridierten und der unbehandelten Hälfte der Pelletoberfläche. Alle vorgenommenen Messungen zeigen auf dem fluoridierten Teil der Oberfläche eine auf ca. 50% des Wertes des unbehandelten Teils der Oberfläche herabgesetzte Adhäsion. Die Werte der Adhäsionskraft variieren dabei zwischen 0,5 und 2,5 nN im Fall der unbehandelten und zwischen 0,3 und 1,3 nN im Fall der fluoridierten Probenoberfläche. Die Messwerte erfüllen bei allen vermessenen Bakteriensorten jeweils ein Signifikanzniveau von 0,001 (\*\*\*) .

## 7.4 Diskussion

Die Kraft-Distanz-Kurven mit Hilfe der bakterienfunktionalisierten Sonden zeigen eindeutig, dass eine Fluorierung eines HAP-Pellets die Haftkraft ungefähr um einen Faktor zwei vermindert. Für das Zeta-Potentials finden sich für physiologischen pH-Wert auf fluoriertem und auf nicht fluoriertem HAP in der Literatur jeweils negative Werte [61, 104]. Zudem ist der Ladungszustand von Bakterien unter physiologischen Bedingungen ebenfalls negativ. Obwohl damit Oberfläche und Bakterien gleiches Vorzeichen ihrer effektiven elektrischen Ladung besitzen, wirkt offensichtlich eine anziehende Kraft beim Abstand Null, die die Bakterien an der Oberfläche hält. Es müssen neben elektrostatischen somit noch andere Wechselwirkungen an der Oberfläche vorhanden sein.

Physikalische Eigenschaften der Oberfläche, die von ihrer chemischen Zusammensetzung beeinflusst werden, sind das Zeta-Potential und die Oberflächenenergie. Bei Fluorierung wurde bereits an einer anderen Stelle von einer weiteren Verminderung des  $\zeta$ -Potentials berichtet [105, 106], und auch die vermehrte Adsorption positiv geladener Proteine auf HAP wurde durch diese Veränderung erklärt [107]. In ähnlicher Weise wurde weiterhin erklärt, dass die Adhäsion von *S. mutans* durch die Adsorption negativ geladener Proteine und die daraus folgende erhöhte negative Ladung an der Grenzfläche vermindert wurde [108]. Eine Verminderung der Haftkraft kann daher durch eine Fluorierung hervorgerufen werden. Ein dadurch bedingter, verstärkter Beitrag elektrostatischer, repulsiver Kräfte am Oberflächenpotential spiegelt sich in einer verminderten Adhäsion der Bakterien wider.

Es könnte auch eine Änderung der Oberflächenenergie zwischen HAP und fluoriertem HAP auftreten: Eine durch Fluorierung herbeigeführte Minderung der Oberflächenenergie würde ebenfalls zu einer verminderten Haftkraft der Bakterien führen. In den Literaturwerten treten allerdings große Variationen bei Angaben zur Oberflächenenergie von HAP und FAP auf, die abhängig sind von den verwendeten Messmethoden und der kristallografischen Orientierung der Oberfläche, an der diese Messungen durchgeführt worden sind [109, 110].

Ein weiterer Grund für eine verminderte Adhäsion könnte die Freisetzung von Fluorid aus der behandelten Oberfläche und eine daraus resultierende Veränderung der Bakterien sein. Fluoride können auf den Metabolismus von Bakterien hemmend einwirken und sogar den Aufbau des oralen Biofilms verändern [111]. Allerdings ist die Löslichkeit von Fluorapatit bei physiologischem pH-Wert (wie in PBS-Puffer, der für die hier gemachten Experimente verwendet worden ist) sehr gering, sogar geringer als die Löslichkeit von HAP [30]. Hier könnte argumentiert werden, dass einige Fluoridionen vom Präparationsprozess an der Oberfläche anhaften. Wegen der starken Affinität dieser Ionen zu HAP und der Art der Präparation (Ultraschallbad nach Fluorierung) kann jedoch das Vorkommen freier Fluoridionen ausgeschlossen werden. Ein durch Fluoridionen bedingter, adhäsionsmindernder Effekt kann daher kaum eine Rolle spielen.

Die Frage nach einem absoluten Wert für die Adhäsionskraft einer Bakterienzelle auf einer HAP-Oberfläche kann mit den vorliegenden Messungen nicht beantwortet werden. Dazu sind allerdings die hier geschilderten Experimente auch ungeeignet. Mikroskopisch kann zwar ermittelt werden, wieviele Bakterienzellen auf einem Federbalken angebracht sind, ob diese allerdings alle und gleichermaßen zur bei den Experimenten ermittelten Adhäsionskraft beitragen, ist nicht ohne weiteres zu klären. Aus demselben Grund ist auch ein Vergleich der Ergebnis-

se aus Messreihen mit verschiedenen Federbalken untereinander nicht sinnvoll, da die Dichte der Bakterien, ihre Anordnung und die Präparation für eine einzelne Spitze sehr individuell sind. Diese Vergleiche werden im vorliegenden Fall auch nicht gezogen. Die kraftspektroskopischen Untersuchungen zeigen bei allen verwendeten Bakterien annähernd eine Halbierung der gemessenen Adhäsionskräfte durch die Fluorierung der Oberfläche. Diese Beobachtung ist jeweils ohne den Vergleich unterschiedlicher Messreihen getroffen, so dass die Nichtvergleichbarkeit verschiedener bakterienfunktionalisierter Spitzen keinen Einfluss auf dieses Ergebnis besitzt.

Um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Messreihen herzustellen, wird derzeit versucht, einzelne Bakterien auf definierte Art mit Hilfe eines Mikromanipulators punktgenau an einem AFM-Federbalken zu befestigen. Zahl und Art der montierten Bakterien stünden damit vollständig fest, und Messungen auf unterschiedlichen Substraten könnten direkt verglichen werden [112].

Was die Ursache für den Unterschied in der Adhäsionskraft auf den unterschiedlich behandelten Oberflächen innerhalb einzelner Messreihen angeht, so sind durch die kraftmikroskopischen Charakterisierungen topografische Veränderungen als Ursache für die Abnahme der Adhäsionskraft ausgeschlossen. Da alle Bakterienarten eine ähnliche Reduktion der Adhäsionskraft erfahren, kann es sich auch nicht um spezifische Wechselwirkungen bestimmter Moleküle an der Bakterienoberfläche handeln. Insbesondere die Reduktion im Falle von *S. carnosus*, der kaum Adhäsine und damit kaum über Möglichkeiten einer spezifischen Adsorption verfügt, unterstützt diese Sichtweise.

All diese Argumente legen den Schluss nahe, dass der durch die Fluorierung der HAP-Pellets erzeugte Unterschied bei den Bakterienadhäsionsmessungen entweder durch eine Veränderung des Zetapotentials oder durch eine Änderung der Oberflächenenergie hervorgerufen wird. Auch eine Kombination aus beidem wäre denkbar.

## 7.5 Ausblick

Bei den vorab geschilderten Experimenten wurde die Adhäsion von Bakterien an HAP in einer hochkomplexen Umgebung, wie sie etwa in der Mundhöhle vorhanden ist, vereinfachend nachgestellt. Von der Vereinfachung sind u.a. die folgenden Eigenschaften betroffen:

- Die Mundhöhle enthält neben Bakterien, die an Zahnschmelz haften, auch noch eine große Anzahl von Proteinen und anderen Makromolekülen, die am Aufbau eines initialen Biofilms auf dem Zahngewebe verantwortlich sind. Die in dieser Arbeit betrachtete Oberfläche der HAP-Pellets ist völlig frei von einem entsprechenden initialen Proteinfilm (**Pellikel**), dessen Anwesenheit einen Einfluss auf das Adhäsionsverhalten haben kann [113].
- Neben den bereits adhärierten Proteinen des Pellikels liefert der ständige Speichelfluss neue Proteine in wässriger Lösung nach, die Ihrerseits einen direkten Einfluss auf Bakterien und deren Verhalten haben können. Das im Speichel enthaltene Lysozym ist beispielsweise in der Lage, die Polypeptidoglykanschicht in den Zellwänden von Bakterien anzugreifen und diese dadurch zu schwächen [114, 115].



- Wie in Anhang A ausführlich dargestellt ist, besteht Zahnschmelz aus einer strukturierten Anordnung von HAP-Kristalliten. Diese enthält organische Materialien, die ihrerseits Einfluss auf das Adhäsionsverhalten nehmen könnten, und zwar sowohl verstärkend als auch abschwächend, und das auch noch ggf. abhängig vom pH-Wert, der zum Zeitpunkt einer Messung herrscht (durch geänderte Ladungszustände bei unterschiedlichen pH-Werten).

Diese Unzulänglichkeiten, die bei der Übertragung der in diesen Modellexperimenten erzielten Ergebnisse auf das natürliche System entstehen, lassen das Modell zunächst unausgereift erscheinen. Das nun geschaffene HAP-Modellsubstrat ist allerdings ein wichtiger Baustein, um darauf basierend das Modell stückweise realer zu gestalten. Besonders zu betonen ist, dass die Modellproben die Beobachtung paarweiser Wechselwirkungen zwischen einzelnen Komponenten des Systems erlauben (Kraft zwischen mineralischer Phase und Bakterienzelle), die bei der Betrachtung von gewachsenen Geweben nicht zu trennen sind. Stattdessen überlagern sich dort viele anziehende oder abstoßende Kräfte, und es besteht die derzeit nicht überwindbare Schwierigkeit, die einzelnen, tatsächlich bestimmenden Faktoren der Adhäsion einer einzelnen Bakterienzelle auf dem Gewebe zu bestimmen. Zur Lösung dieses Problems umgeht die hier verfolgte Strategie diese Schwierigkeit, indem erst nach und nach diejenigen Wechselwirkungen dem Modell hinzugefügt werden, deren Kontrolle derzeit experimentell möglich ist. Das Vorkommen unreproduzierbarer Einflüsse, wie etwa eine variierende chemische Zusammensetzung der Gewebeprobe oder ihre unkontrollierte Struktur, stellen bei der Messung an synthetischen Proben kein Problem dar, weil dies kontrollierte Parameter sind.

Das Fernziel dieser Art von Experimenten ist, einen Zahn lebensecht modellieren zu können. Bis dahin muss die Komplexität des Modellsystems immer in dem Maße erhöht werden, in dem direkte oder indirekte Kontrolle der Systemparameter möglich ist. Das könnte hier z.B. durch das Hinzufügen bestimmter Proteine in die Messumgebung geschehen, die auf der Pelletoberfläche einen – wiederum kontrollierten – Proteinfilm erzeugen. Letztlich können auf diese Weise alle Parameter, die auch am echten Gewebe einen relevanten Einfluss besitzen, schrittweise das Modell erweitern.

Die in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung einer HAP-Oberfläche mit einer Fluoridlösung die Adhäsionsvorgänge von Bakterien auf dieser Oberfläche beeinflusst. Ohne die geringe Oberflächenrauigkeit und die reproduzierbare chemische Zusammensetzung der synthetischen HAP-Pellets wären die definierten Messungen zu den in diesem Kapitel beschriebenen Ergebnissen nicht möglich gewesen. Anhand kraftspektroskopischer Adhäsionsmessungen mit bakterienfunktionalisierten Spitzen an den Modellproben konnten signifikante Unterschiede zwischen unbehandelten und mit einer NaF-Lösung behandelten Oberflächen nachgewiesen werden. Dabei war die Bakterienspezies, mit denen der AFM-Federbalken modifiziert wurde, für das Ergebnis unbedeutend: In allen Fällen zeigte sich unabhängig von der Art der Bakterien an der Spitze eine gleichwertige Reduktion der Adhäsionskraft auf der fluoridbehandelten Oberfläche um einen Faktor von zwei. Topografische Unterschiede durch eine unterschiedliche Präparation oder durch die Fluoridbehandlung konnten durch die Art der Probenvorbereitung und einen Vergleich von Oberflächenbereichen vor und nach der Fluoridanwendung ausgeschlossen werden. Somit bleiben als Ursache der Adhäsionsverringering lediglich die chemische Zusammensetzung der Oberfläche und damit veränderte Eigenschaften

der Oberfläche –  $\zeta$ -Potential und Oberflächenenergie – übrig.

## 8 Zusammenfassung und Ausblick

Bei der anfänglichen Betrachtung der Wechselwirkungen an Oberflächen stellte sich heraus, dass sich die Zahl der zu berücksichtigenden Eigenschaften der Oberfläche und ihre gegenseitige Beeinflussung stark auf den Schwierigkeitsgrad der Beschreibung auswirken kann. Gewebe mit einer Vielzahl von Strukturen auf unterschiedlichen Skalen und mannigfaltig beeinflussbarer und sich selbst beeinflussender Proteinbestandteile bilden eine in dieser Hinsicht bemerkenswerte Stoffklasse. Entsprechend schwierig ist es, an derartigen Proben elementare Zusammenhänge zu beobachten.

Daher wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass unter Verwendung passender Sinterverfahren **Modellproben aus Hydroxylapatit** erzeugt werden können. Die Proben besitzen dabei eine einfache und reproduzierbare Struktur, und sie lassen sich mit einfachen Mitteln (Schleifen, Polieren) auf rms-Rauigkeiten unter einem Nanometer bringen. Anders als beispielsweise Siliziumwafer oder Glimmerplättchen erfassen die HAP-Pelletproben allerdings wichtige chemische Eigenschaften von Hartgeweben, die zu einem Großteil aus demselben Material bestehen. Mit Hilfe dieser Pellets ist es u.a. möglich, den Einfluss von Fluoriden auf Struktur und Oberflächeneigenschaften der mineralischen Bestandteile der Hartgewebe zu studieren, ohne den störenden Einfluss chemischer Verunreinigungen oder hoher struktureller Komplexität der Gewebe berücksichtigen zu müssen.

Nach der **Fluorierung** kann eine starke Abhängigkeit der Oberflächenmorphologie und des sich einstellenden **Fluor-Tiefenprofils** vom pH-Wert während des Fluorierungsvorganges beobachtet werden. Während sich für neutrale pH-Werte monoton, annähernd exponentiell abfallende Fluortiefenprofile mit geringer Eindringtiefe um wenige 10 nm ergeben, resultieren für saure pH-Werte Eindringtiefen von über 100 nm. Zwar ist auch hier im wesentlichen ein exponentieller Abfall der Fluorkonzentration messbar, direkt an der Oberfläche ist allerdings ein Bereich mit stark überhöhtem Fluorgehalt erkennbar. Für den Fall einer basischen Fluorierung liegt die Eindringtiefe ähnlich wie im neutralen Fall bei wenigen 10 nm, das Fluortiefenprofil zeigt allerdings keinen monotonen Verlauf mehr. Stattdessen stellt sich ein Maximum der Fluorkonzentration bei etwa 10 nm Tiefe ein.

Die Vermessung der **Eindringtiefe von Fluorid** in eine Pelletoberfläche zeigt erheblich geringere Werte als bisher gemessen wurden. Auslöser dieses Unterschieds könnte die im Vergleich zum Gewebe höhere Dichte der Proben sein, die trotz oberflächlicher Porosität insgesamt eine kompaktere Struktur besitzen.

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurden die Pellets genutzt, um daran die **Stärke bakterieller Adhäsionskräfte** zu bestimmen: Es konnte festgestellt werden, dass eine Fluorierung der Pelletoberfläche annähernd eine Halbierung der Adhäsionskräfte bewirkt. Dieser Effekt tritt unabhängig von der verwendeten Bakteriensorte auf, womit er unspezifischer Natur sein muss. Als ursächlich kann dafür entweder eine **Verschiebung des  $\zeta$ -Potentials** hin zu

negativeren Werten oder ein **Einfluss der Fluorierung auf die Oberflächenenergie** des Pellets angesehen werden.

### **Pellets als Modell für Hartgewebe**

Insgesamt betrachtet zeigen die entwickelten Pellets eine **breite Anwendbarkeit**, um für komplizierte Hartgewebe vereinfachende Modellsysteme darzustellen. Die nach dem hier vorgestellten Verfahren erzeugten Proben erfüllen die zu Anfang der Arbeit formulierten Anforderungen.

Die Pellets bieten eine **chemische und strukturelle Einfachheit**, die hauptsächlich durch die definierte Zusammensetzung und die geringe Rauigkeit bedingt ist. Dadurch können sie außer auf den bereits bearbeiteten Gebieten auch in anderen Anwendungsfeldern hilfreich sein. Um eine breitere Anwendbarkeit zu ermöglichen, wäre es interessant, die Eigenschaften der Proben in unterschiedlichen Rahmenbedingungen zu charakterisieren. HAP ist nicht nur in Zahnschmelz sondern in allen Hartgeweben enthalten, so dass die Pellets auch für Knochengewebe ein interessantes Ersatzsystem geringerer Komplexität darstellen können. Dabei beschränken sich die Untersuchungen nicht ausschließlich auf Protein-Oberflächen-Wechselwirkungen, sondern denkbar wären auch **Wachstumsexperimente mit lebenden Zellen**.

Neben der weiteren Anwendung der HAP-Pellets als Modell können die Pellets selbst ebenfalls weiterentwickelt werden. Je größer beispielsweise die Körner innerhalb des Pelletgefüges umso größer sind diejenigen Oberflächenbereiche, auf denen die Probe homogene Eigenschaften besitzt. Auch wäre es nach vorhergehender Charakterisierung der Oberfläche auch möglich, auf hinreichend großen, einkristallinen Oberflächenbereichen die Eigenschaften der unterschiedlichen Kristallitflächen zu vergleichen. Dafür wäre eine Weiterentwicklung der Pellets hinsichtlich ihrer Präparation notwendig, bei der das **Kornwachstum** optimiert wird.

Interessant wäre auch die **Einbindung einfacher organischer Bestandteile** in die Pellets bzw. entlang ihrer Oberfläche. Zahn- und andere Gewebe bestehen zu einem gewissen Anteil auch aus Proteinen, die gerade auf Adhäsionsvorgängen wegen der variablen elektrischen Ladung von Proteinen erheblichen Einfluss nehmen können. So ist es von besonderem Interesse, wie Proteine und die HAP-Oberfläche gemeinsam zu einem resultierenden Oberflächenpotential beitragen.

Alle Erkenntnisse, die an den vereinfachten Oberflächen durchgeführt werden, können zu einem elementaren Verständnis von Wechselwirkungen führen, welches letztendes in Simulationsrechnungen zu einem *bottom-up*-Ansatz für die theoretische Beschreibung einer beliebig strukturierten Oberfläche führt. Der Vorteil eines solch tiefen Verständnisses liegt damit auf der Hand, denn mit verlässlichen Simulationen wäre eine Optimierung von Oberflächenwechselwirkungen für viele Anwendungen möglich.

# A Anatomie der Zähne und Entstehung der Zahnhartsubstanzen

In diesem Anhang werden ausführlich die Struktur und die Entstehung der Zahngewebe präsentiert.

## Struktur und Aufgaben des Gebisses

Säugetiere wie der Mensch besitzen ein **Gebiss**, das durch den gegenseitigen strukturellen Zusammenhang mehrerer Zähne gebildet wird. Es besteht beim erwachsenen Menschen aus 32 Zähnen, das Milchgebiss von Kindern umfasst hingegen nur 20 Zähne.

Die anatomischen Strukturen sind auf die Art der Nutzung spezialisiert: Carnivoren besitzen ausgeprägte Fangzähne, während typische Herbivoren auf die Zerkleinerung der eigentlich schwer verdaulichen Pflanzennahrung spezialisierte Zähne tragen.

Die Position einzelner Zähne innerhalb des Gebisses und ihre eigene individuelle Form sind bestens an ihre jeweilige Aufgabe innerhalb des Gebisses angepasst. Schneidezähne mit einer schmalen Kante zum Aufbau hoher Drücke besitzen eine vollkommen andere Form als Mahlzähne, die dank großer Kauflächen und Höcker perfekt zum Zermahlen von Nahrung angepasst sind. Trotz der individuellen Anpassung entfalten Zähne ihre Funktion nur im Gebissverbund, woraus sich die Wichtigkeit jedes einzelnen Zahnes ableiten lässt [32].

Die primäre Aufgabe der Zahnorgane liegt im Greifen und Zerkleinern von Nahrung. Daneben gibt es allerdings noch weitere Aufgaben: Beim Menschen sind Zähne für die Lautbildung wichtig (z.B. dentale Verschluss- [t], [d] und Reibelaute [s], [z]). Das Fehlen von Zähnen, insbesondere der Frontzähne, fällt sehr deutlich unter ästhetischen Gesichtspunkten auf und hat auch soziale Auswirkungen. Zähne sind gemeinsam mit Kiefer, Zunge und Mundschleimhaut Teil eines empfindlichen Tastmechanismus und können meist im Zusammenspiel mit den teilweise großen auftretenden Kieferkräften auch als Werkzeuge verwendet werden.

## Zahnanatomie

Alle im menschlichen Körper zu findenden Hartgewebe sind am Aufbau des Zahns oder in dessen direktem Umfeld zu finden. Details hierzu können z.B. dem Buch von Schroeder [32] entnommen werden. Im folgenden wird kurz die Zahnanatomie vorgestellt. Danach werden einige spezielle Eigenschaften von Zahngewebe als einem Vertreter HAP-haltiger Gewebsarten erläutert.

Ein einzelner Zahn, wie in Abbildung A.1 schematisch dargestellt, wird grob unterteilt in den Kronenbereich oder auch die **Zahnkrone** (engl. *crown*), die in der Mundhöhle als „Zahn“ er-

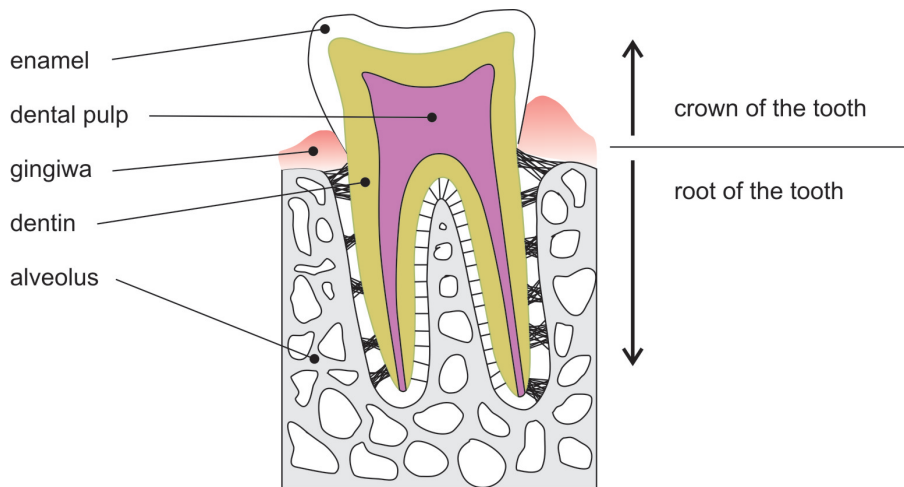


Abbildung A.1: Schematischer Querschnitt durch einen einzelnen Zahn im Kieferknochen.

kennbar ist, und einen Wurzelbereich oder die **Wurzel** (*root*), die das Zahnorgan im Kieferknochen verankert. Die Außenseite des Kronenbereichs ist mit **Zahnschmelz** (*enamel*) bedeckt, der als mechanische Schutzschicht das darunterliegende, relativ weiche **Zahnbein** (*dentin*) bedeckt und vor Abnutzung schützt. Das Innere des Zahnes, die sogenannte **Pulpa** (*dental pulp*) ist stark vaskularisiert und enthält **Odontoblasten**, also zahnbeinbildende Zellen. Während beim Zahndurchbruch (sog. **Eruption**) die den Schmelz bildende Zellschicht aus **Ameloblasten** zerstört wird und nicht mehr erneuert werden kann, ist das Zahnbein zu einem stetigen Wachstum in der Lage. Dies führt im Laufe der Zeit zu einer Verengung der Pulpa, bis diese schließlich im hohen Alter vollständig zuwachsen kann.

Der Kieferknochen, in dem der Zahn verankert ist, ist zur Mundhöhle hin mit dem **Zahnfleisch** (*gingiva*) bedeckt. Es ist stark durchblutet und eine wichtige immunologische Barriere in der Mundhöhle. Auf Knochengewebe ausgeübter Druck führt zu dessen Abbau. Daher würde ein schlicht im Knochen steckender Zahn durch die bei seinem Gebrauch auftretenden Kräfte zum Abbau des Knochengewebes in seinem Umfeld führen. Das gesamte Zahnorgan sitzt daher in einer passgenau ausgestalteten Knochenhöhlung des Kiefers, einem sogenannten **Zahnfach** (*alveole*), und ist dort an einem komplizierten Bänderapparat (Desmodont, Sharpey-Fasern) aufgehängt. Auf diese Weise werden die auftretenden Kaukräfte in Zugkräfte umgewandelt, die zu Knochenaufbau führen. Diese Art der „Zahnaufhängung“ sorgt für eine durch den physiologischen Gebrauch der Zähne geförderten Erhaltung des Knochengewebes im Wurzelbereich.

Der gesamte, in der Mundhöhle sichtbare und daher umgangssprachlich als Zahn bezeichnete Kronenteil des Zahnorgans ist mit einer bis zu einigen Millimeter dicken Schicht aus Zahnschmelz überzogen, das Zahninnere und der Wurzelbereich werden hingegen ausschließlich aus dem weicheren und etwas weniger HAP enthaltenden Zahnbein gebildet. In der Entstehungsphase des Zahnes werden beide Gewebsarten gleichzeitig gebildet, und zwar jeweils auf der Rückseite einer Schicht aus zugehörigen Bildnerzellen. Zu Beginn der Gewebsbildung ordnen

---

sich Ameloblasten und Odontoblasten zu einer Doppelschicht zweier Zellularlamellen. Zahnschmelz und Zahnbein werden sukzessive in dem Zwischenzellraum zwischen den beiden Zelllagen gebildet, während die jeweilige Front aus Bildnerzellen von dem dahinter entstehenden Gewebe verdrängt wird. Nach Abschluss der Gewebebildung befinden sich die Odontoblasten geschützt im Inneren der gebildeten Pulpahöhle, die Ameloblasten hingegen sind an der Außenseite des neu entstandenen Zahnes angeordnet. Spätestens beim Zahndurchbruch sind sie dadurch nicht mehr vor mechanischer Beanspruchung geschützt und werden abgetragen.

## Entstehung, Struktur und Eigenschaften der Zahnhartgewebe

### Zahnbein

Zahnbein ist die weichere der am Aufbau des Zahnorgans direkt beteiligten Hartgewebsarten. Die im Vergleich zu Zahnschmelz größere Elastizität erlaubt dem Zahn eine gewisse Anpassung, denn das innenliegende Material kann bei ungleichmäßiger Belastung etwas nachgeben und die Bruchneigung des harten, aber auch spröden Zahnschmelzes vermindern.

Dentin entsteht in mehreren Schritten als eine ungeordnete Abscheidung nanokristalliner Partikel, die im extrazellulären Raum hinter der Odontoblastenlamelle gebildet werden. Die Kristallisationskeime als auch die für das Kristallwachstum benötigten Materialien werden von den Odontoblasten gebildet und während der Wachstumsphasen abgegeben. Während die Dentinschicht durch diesen Ablagerungsvorgang in ihrer Dicke zunimmt, verbleibt ein Teil jedes Odontoblasten als sukzessive wachsender **Odontoblastenfortsatz** in dem neu gebildeten Gewebe. Anhand der hierdurch gebildeten, das gesamte Gewebe durchziehenden **Dentinkanäle** lässt sich Dentin leicht vom kompakten Zahnschmelz unterscheiden (vgl. Abbildung A.2). Die Zellfortsätze bleiben innerhalb des Kanals bestehen und erreichen eine Länge von der Dicke der Dentinschicht, also im Millimeterbereich.

Dentin unterliegt einem Reifungsprozess, und in unterschiedlichen Abständen zur Sekretionsfront werden unterschiedliche Reifungsgrade von Dentin unterschieden. Sie unterscheiden sich in ihrem Wasser- und/oder Proteingehalt. Das ausgereifte Dentin besitzt neben der mineralischen Phase (70% Massenanteil) eine Proteinphase mit einem Anteil von 20% an der Gesamtmasse. Weitere 10% entfallen auf in das Gewebe eingelagertes Wasser.

### Zahnschmelz

Zahnschmelz zeigt einen geordneteren Aufbau als Dentin und hat einen höheren Mineralisationsgrad (95%). Der Massenanteil von Protein und Wasser liegt zusammengenommen bei lediglich 5%. Senkrecht zur Schmelz-Dentin-Grenzfläche verlaufen innerhalb des Zahnschmelzes sogenannte **Schmelzprismen**, die die Schmelzschicht scheinbar vom Zahnninneren ausgehend annähernd strahlenförmig durchlaufen. Man unterscheidet dabei **Prismenstäbe** und den sogenannten **interprismatischen Schmelz**, der um Prismenstäbe herum zu finden ist. Entlang des Verlaufs der einzelnen Prismen variiert deren relative Orientierung zueinander. Schnitte senkrecht zum Prismenverlauf besitzen daher fallweise unterschiedliches Aussehen. Aufgrund

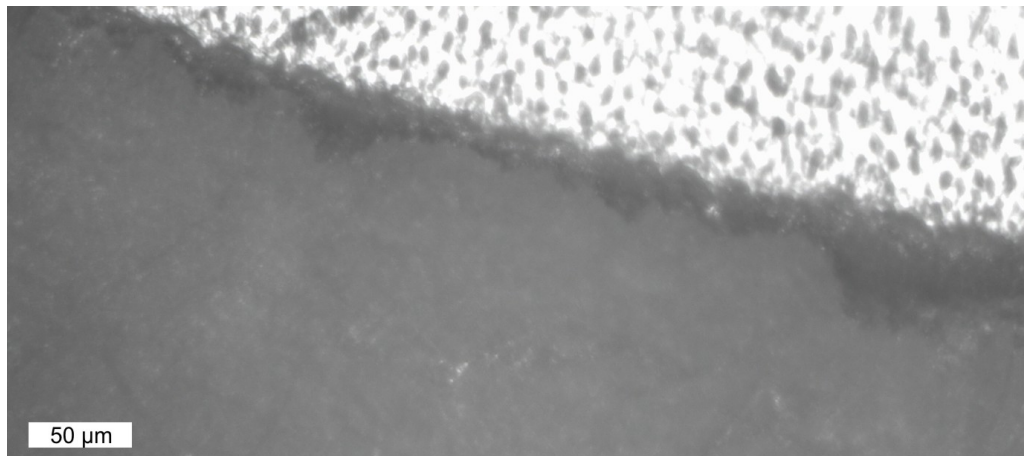


Abbildung A.2: Optische Vergrößerung eines polierten Schnittes horizontal durch einen menschlichen Mahlzahn (Molar) knapp oberhalb der Pulpahöhle. Beim Dentin sind die Dentinkanäle als ovale Löcher in der Oberfläche zu erkennen. Von dieser Schmelz-Dentin-Grenze aus startet die Entstehung der beiden Zahngewebe.

dessen werden hierbei die **Schlüssellochform** von der **Hufeisenform** unterschieden, was sich auf die Form der Querschnitte bezieht, die die Prismen durch ihren variierenden Verlauf nebeneinander hervorrufen. Insgesamt ist das Auftreten unterschiedlichster Muster entlang von Schnittflächen möglich, entscheidend dafür ist die lokale Orientierung der Prismenstäbe relativ zur Schnittebene und relativ zueinander. Abbildung A.3 zeigt beispielhaft eine geätzte Zahnoberfläche.

Prismenstäbe und auch der interprismatische Schmelz sind ihrerseits aufgebaut aus einer parallelen Anordnung von nadelförmigen HAP-Kristalliten. Sie besitzen eine Breite von ca. 70 nm, eine Dicke von etwa 25 nm und eine stark variierenden Länge zwischen 100 und 1000 nm [116]. Der derzeit angenommene Entstehungsmechanismus dieser gleichartig orientierten Domänen geht von einer aus Proteinen bestehenden, durch Selbstorganisation herbeigeführten Molekülanordnung aus, die die spätere Form und Richtung der Kristallite innerhalb eines zusammenhängenden Gebietes vorgibt [60, 117]. Hinzu kommt der Einfluss von an der Entstehung der Kristallite beteiligter spezieller Schmelzproteine. Dabei handelt es sich um nicht-globuläre Moleküle, die einen steuernden Effekt auf die Kristallisation des HAP aus den Ausgangsmaterialien besitzen. Zunächst wird durch den Einfluss von **Enamelin** die Kristallisation ausgelöst. Gleichzeitig wird noch **Amelogenin** bereitgestellt. Dieses Protein hemmt das Kristallwachstum, indem es sich entlang der {010}-Kristallflächen anlagert [60, 118]. Dadurch zeigen die Kristallite ein vermehrtes und unproportionales Wachstum entlang der (001)-Richtung, und es kommt zu einer parallelen Anordnung der Kristallite. In der Reifephase der Schmelzentstehung werden durch die Ameloblasten Proteasen ausgeschüttet, die diese Proteine zerteilen und dadurch inaktivieren. Dies führt zu einer raschen Dickenzunahme der langgezogenen Kristallite, die am Ende der Reifephase 95% des Gewebevolumens einnehmen [60].

Die Orientierung der Kristallite liegt bei den Schmelzprismen parallel zum Verlauf des Pris-



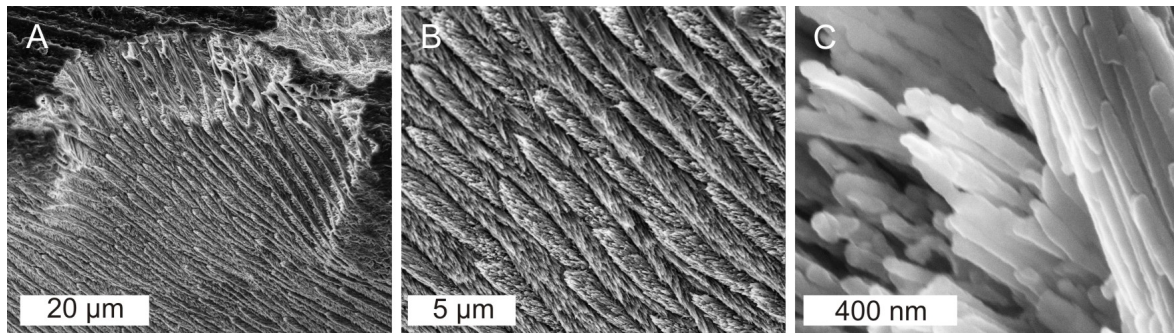


Abbildung A.3: Geätzte ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 1M, 15s) Schnittfläche in Zahnschmelz eines menschlichen Zahnes, betrachtet mit einem Rasterelektronenmikroskop. Zu erkennen sind jeweils die unterschiedlichen Prismenbereiche, die sich durch unterschiedliche Ätzgeschwindigkeiten entsprechend ihrer eigenen Orientierung auszeichnen. In C gut zu erkennen sind die einzelnen Kristallite, aus denen der Schmelz aufgebaut ist.

men, im interprismatischen Schmelz verlaufen die Kristallite um bis zu  $90^\circ$  gedreht. Die Ursache dieser eigentümlichen Gestalt liegt im Entstehungsprozess des Gewebes. Ähnlich wie Zahnbein wird Zahnschmelz ebenfalls in den Zwischenzellraum der bei Beginn der Gewebsbildung vorhandenen Odontoblasten/Amenoblasten-Membran abgeschieden. Der Entstehungs- und Reifungsprozess findet hingegen in sehr viel größerer Nähe zur Zelle statt. Daher hat die relative Anordnung der Zellen und die Morphologie der Oberfläche auf der Innenseite der Amenoblastenlamelle einen größeren Einfluss auf die Struktur des Gewebes. Ameloblasten besitzen einen speziell ausgebildeten Sekretionsbereich, den sog. **Tomes-Fortsatz**, der für die Entstehung der charakteristischen Struktur verantwortlich ist. Grundsätzlich geschieht die Anordnung der Kristallite immer senkrecht zur Zellmembran eines einzelnen Ameloblasten, die allerdings aufgrund der speziellen Form des Tomesfortsatzes entlang der gesamten Wachstumslamelle nicht mit der Bewegungsrichtung der Zellen während des Wachstums des Gewebes übereinstimmen muss. Richtungsabweichungen sorgen dafür, dass an unterschiedlichen Stellen des Schmelzes unterschiedliche Kristallitorientierungen vorliegen und damit eine Unterscheidung nach Prismenstab und interprismatischem Schmelz erlauben.

Die unterschiedliche Kristallitorientierung hat Konsequenzen für das Ätzverhalten eines Gewebeschnittes: Da HAP entlang unterschiedlicher Kristallachsen unterschiedliche Ätzgeschwindigkeiten besitzt, werden mit zunehmender Ätzdauer die verschieden ausgerichteten Kristallitstränge unterschiedlich schnell aufgelöst. Die Oberfläche kann dadurch lamellenartig erscheinen, so wie es in Abbildung A.3 zu erkennen ist.

Die äußerste Schicht des Zahnschmelzes unterscheidet sich von der gerade beschriebenen inneren Struktur, denn die Prismenstruktur ist nicht bis an die Schmelzoberfläche fortgeführt. Die letzten bis zu  $100\ \mu\text{m}$  bestehen aus einer dichten Nebeneinanderreihung von Kristalliten, deren Längsachse zum Zahninneren hin orientiert ist. Die Kristallite besitzen dabei eine laterale Größe von  $30\ \text{nm}$  Breite. Weiterhin sind an der Oberfläche um die gesamte Krone her-

umlaufende, waagrecht orientierte Riefen, sog. **Imbrikationsfurchen** zu finden. Bei näherer Betrachtung handelt es sich dabei um im Querschnitt dachziegelartig überlappende Strukturen, von denen sich bei frisch eruptierten Zähnen zehn bis 30 Stück pro Millimeter zählen lassen.

Zahnschmelz bedeckt alle unter Abnutzung stehenden Oberflächen des Zahns, und seine Struktur sorgt für eine ausgesprochene mechanische Stabilität. Seine hierarchische Struktur (1. Kristallite unterschiedlicher Orientierung, 2. Prismenstäbe und Interprismenschmelz) ist eine der auffälligsten Eigenschaften des Gewebes. Während bei Dentin eine gleichmäßige Ausfällung der mineralischen Substanz und Einlagerung von Wasser und Protein abläuft, gibt es bei Zahnschmelz eine Phase der Schmelzreifung, bei der dem neuen Gewebe über aktive Transportvorgänge der Ameloblasten Wasser und Proteine entzogen werden. Da dies zu einer späten Phase geschieht, in der die Schmelzkristallite bereits gebildet sind, sammeln sich Reste von Wasser und Proteinen zwischen den Kristalliten an und machen einen Massenanteil von insgesamt 5% des Zahnschmelzes aus.

Die mechanischen Eigenschaften von Zahnschmelz differieren je nach Messverfahren und je nach der Oberfläche, von der der Schmelz gewonnen wurde. Ein Übersichtsartikel von He et al. [119] listet verschiedene durchgeführte Studien und die darin gewonnenen Elastizitätsmodule auf. Es zeigt sich, dass entlang weniger beanspruchter Seiten (bukkal, palatinal oder approximal) das Material mit um 60 GPa weicher ist als entlang der Kauflächen okklusal mit ungefähr 90 - 100 GPa. Die Vergleichbarkeit der Studien gestaltet sich aufgrund der Vielfalt der Präparationstechniken und der angewendeten Messverfahren schwierig.

## B XRD-Messungen an gesinterten HAP2-Proben

Während die HAP3-Proben systematisch mittels XRD charakterisiert worden sind, haben sich die Untersuchungen der HAP2-Proben in der frühen Phase dieser Arbeit hauptsächlich auf Ergebnisse aus der XPS konzentriert. Um die Ergebnisse beider Messungen einem Vergleich zu unterziehen, wurden die XRD-Messungen an HAP2-Pellets zu einem späteren Zeitpunkt nachgeholt. Hierbei stellte sich heraus, dass die XRD-Daten dieser Proben deutlich von denen einer idealen HAP-Struktur, wie z.B. bei HAP3, abweichen.

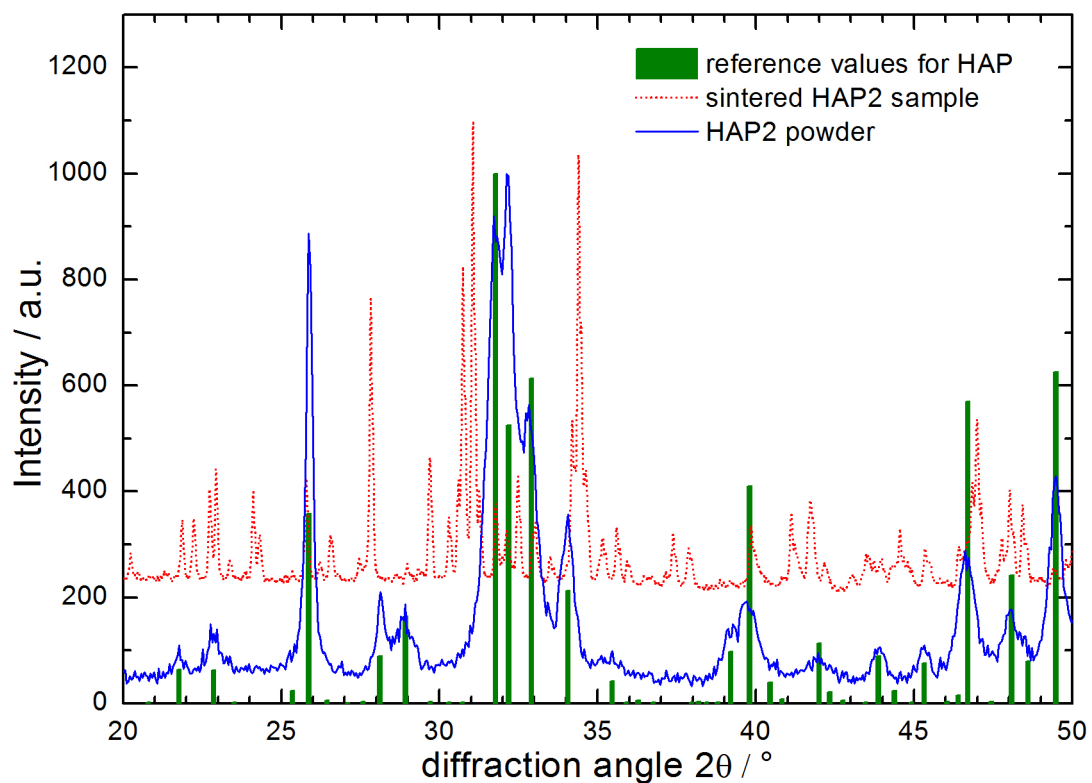


Abbildung B.1: Vergleich der XRD-Spektren A) gewaschenen HAP2-Pulvers und B) einem gesinterten HAP2-Pellet aus dem gewaschenen Ausgangsmaterial.

Abbildung B.1 zeigt als durchgezogene Linie das XRD-Spektrum des ungesinterten HAP2-Pulvers aus dem Jahr 2007. 200 Einheiten oberhalb ist als gepunktete Linie das aus dem Jahre 2013 stammende Spektrum eines nach dem im Kapitel 5 beschriebenen Verfahren hergestellten HAP2-Pellets abgebildet. Das Referenzspektrum [38] ist als Balkendiagramm in den Graphen

eingezeichnet. Im Spektrum der gesinterten Probe fallen gegenüber der Pulverprobe und auch gegenüber der Referenz Abweichungen in Form zusätzlicher Maxima auf.

Zum Zeitpunkt der XPS-Messungen wiesen die HAP2-Proben nach Sintern von allen untersuchten Proben (inklusive der Pulverproben) dasjenige Verhältnis der Anzahlen der Calcium- und Phosphoratome auf, das mit 1,75 die geringste Abweichung vom HAP-Sollwert von 1,66 zeigte. Abbildung B.2 fasst alle Messergebnisse zusammen: Neben der XPS-Ergebnisse der gesinterten Probe („HAP2 sintered“) sind zusätzlich die Ergebnisse einer alten Pulverprobe („HAP2 washed old“) und zweier aktueller Proben desselben Pulvers („HAP2 washed new 1/2“) angegeben. Unter der grafischen Darstellung sind die Verhältnisse der Zahl von Calcium- und Phosphoratomen aufgeführt. Die Sollwerte für HAP sind durch die Linien (O bei 61,9%, Ca bei 23,8%, P bei 14,3%) repräsentiert. Die Pulverproben zeigen im Rahmen der Messgenauigkeit identische Elementverhältnisse. Dies ist zwar kein strikter Nachweis der bevorzugten HAP Struktur, allerdings deutet dieses Ergebnis stark auf die korrekte Zusammensetzung der Probe hin.

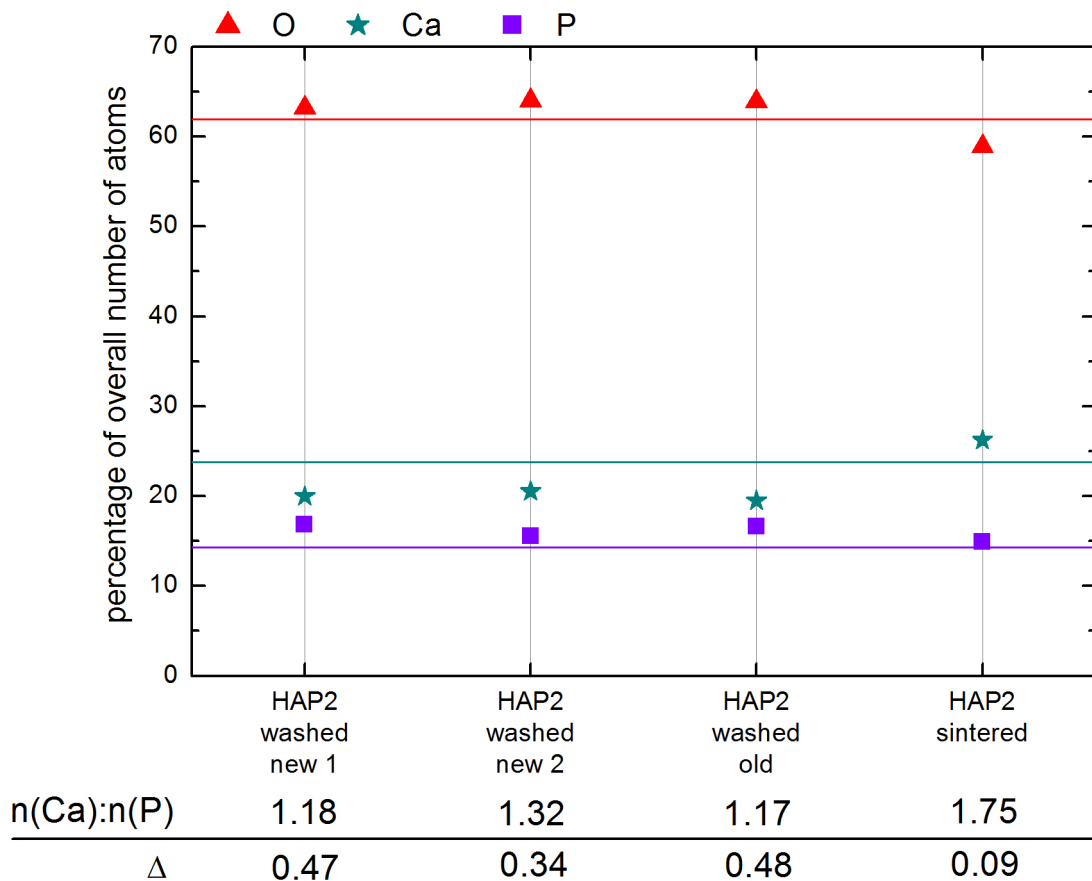


Abbildung B.2: Vergleich der XPS-gemessenen atomaren Anteile von Sauerstoff, Calcium und Phosphor an unterschiedlichen HAP2-Proben.

---

Eine zusätzliche Schwierigkeit bei der Interpretation der XRD-Ergebnisse und deren Einordnung besteht in der langen Lagerdauer der für die XRD verwendeten Proben. Grundsätzlich sind sog. Dehydroxilierungsreaktionen bereits bei Umgebungstemperatur denkbar, bei denen die relativ leicht gebundenen Hydroxidgruppen unter Wasserabgabe und Bildung eines Oxidions aus dem Kristallgitter entfernt werden. Ein Beispiel für solche Reaktionen ist nachfolgend dargestellt [82]:



Durch den Zerfall des Materials entstehen Fehlstellen ( $\Box$ ) in der Struktur, und zwar in dem Maße, in dem die Hydroxidgruppen aus dem Material entfernt werden.

Über den Einfluss langfristiger Lagerung der gesinterten Proben unter Standardbedingungen ist bislang nichts bekannt. Daher kann vermutet werden, dass sich im Laufe der Zeit Veränderungen an den HAP2-Pellets ergeben haben, die zu dem oben dargestellten Ergebnis führen.

Aus der derzeitig verfügbaren Datenlage lassen sich jedenfalls keine verlässlichen Schlüsse über die Ursachen und die Auswirkungen der beobachteten XRD-Spektren ziehen. Dazu müssen weitere systematische Messungen unternommen werden.



# Publikationen und Konferenzbeiträge

## Publikationen

- F. Müller, C. Zeitz, H. Mantz, K.-H. Ehses, F. Soldera, J. Schmauch, M. Hannig, S. Hüfner and K. Jacobs. Elemental depth profiling of fluoridated hydroxyapatite: Saving your dentition by the skin of your teeth?; *Langmuir* **26** (2010) 18750
- F. Müller, S. Grandthyll, C. Zeitz, K. Jacobs, S. Hüfner, S. Gsell, M. Schreck. Epitaxial growth of graphene on Ir(111) by liquid precursor deposition; *Phys. Rev. B* **84** (2011) 075472
- A. Uchugonova, M. Lessel, S. Nietzsche, C. Zeitz, K. Jacobs, C. Lemke and K. König. Nanosurgery of cells and chromosomes using near-infrared twelve-femtosecond laser pulses; *J. Biomedical Optics* **17** (2012) 101502
- P. Loskill, C. Zeitz, C. Grandthyll, N. Thewes, F. Müller, M. Bischof, M. Herrmann and K. Jacobs. Reduced adhesion of oral bacteria on hydroxyapatite by fluoride treatment; *Langmuir* **29** (2013) 5528

## Konferenzbeiträge

- Teeth In-formation (*Talk*), *Winterschool Oberstdorf, March 2006*
- Teeth - a nanostructured multicomponent material (*Poster*), *DPG Spring Meeting, Regensburg, March 2007*
- Analysis of enamel and prosthesis materials - Structure of teeth and effects of fluoridation (*Talk*), *Group seminar Magerle, TU Chemnitz, August 2007*
- Protein adsorption on tailored surfaces (*Poster*), *Nano2Life - Scientific Meeting, Lund University, Sweden, October 2007*
- Enamel: a structural and chemical investigation (*Talk*), *Feldberg Winter School, Feldberg, December 2007*
- Structural effects on enamel by fluoridation: an XPS and AFM study (*Talk*), *DPG Spring Meeting, Berlin, February 2008*
- Fluoridation of teeth: material properties and consequences (*Poster*), *GRK 1276 - Summer School, Saarbrücken, September 2008*

- Fluoridation of teeth: material properties and consequences (*Poster*), *AFM User Workshop, AtomicForce, Nancy, France, October 2008*
- Protein Adsorption on Enamel: An Example of Protein Interaction on Medically Relevant Surfaces (*Talk*), *Feldberg Winter School, Feldberg, December 2008*
- Protein film formation on hydroxyapatite surfaces (*Poster*), *DPG Spring Meeting, Berlin, March 2009*
- Thin films of simple and complex (bio)fluids (*Poster*), *DPG Summerschool „Biointerfaces“, Bad Honnef, September 2009*
- Protein film formation on hydroxyapatite surfaces (*Poster*), *GRK 1276 - Status Seminar, Saarbrücken, Oktober 2009*
- Protein adsorption on tooth surfaces and the effects of fluoridation (*Talk*), *GRK 1276 - Status Seminar, Saarbrücken, Oktober 2009*
- Fabrication and fluoridation of hydroxyapatite samples: How to create artificial teeth and why? (*Talk*), *Feldberg Winter School, Feldberg, December 2009*
- Proteinadsorption an natürlichen und naturnahen Oberflächen (*Poster*), *Evaluation GRK 1276, Saarbrücken, January 2010*
- Structure of and protein adsorption on hydroxyapatite surfaces (*Poster*), *GRK 1276 - Summer School, Saarbrücken, September 2010*
- Out of the deep: Differences in sub-surface structure and their effects on surface events (*Talk*), *University of the greater Region (UGR) - Scientific Meeting, Saarbrücken, September 2010*
- Structure of and protein adsorption on hydroxyapatite surfaces (*Poster*), *GRK 1276 - Status Seminar, Saarbrücken, December 2010*
- Hydroxyapatite pellets - Structure and other properties compared to natural enamel (*Talk*), *Feldberg Winter School, Saarbrücken, December 2009*
- Saving your dentition by the skin of your teeth ? (*Talk*), *PhD students' day, Uni Saarbrücken, March 2011*
- Homogenous hydroxyapatite surfaces for dental studies (*Poster*), *DPG Spring Meeting, Dresden, March 2011*
- Measurement of adhesion forces of bacteria on controlled hydroxyapatite surfaces (*Talk*), *GRK 1276 - Status Seminar, Saarbrücken, September 2011*
- Minkowski measures (*Talk*), *INM Miniworkshop, Saarbrücken, October 2011*
- Artificial hydroxyapatite pellets - mimicking hard tissues with simple surfaces (*Poster*), *DPG Spring Meeting, Regensburg, March 2013*
- Artificial hydroxyapatite pellets - mimicking hard tissues with simple surfaces (*Poster*), *DGM - BioMAT 2013, Jena, April 2013*



## Literaturverzeichnis

- [1] C. Hannig and M. Hannig. The oral cavity - a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. *Clinical Oral Investigations*, 13(2):123–139, 2009.
- [2] Y. Schmitt, H. Hähl, C. Gilow, H. Mantz, K. Jacobs, O. Leidinger, M. Bellion, and L. Santen. Structural evolution of protein-biofilms: Simulations and experiments. *Bio-microfluidics*, 4(3):032201, 2010.
- [3] H. Hähl, F. Evers, S. Grandthyll, M. Paulus, C. Sternemann, P. Loskill, M. Lessel, A. K. Hüsecken, T. Brenner, M. Tolan, and K. Jacobs. Subsurface influence on the structure of protein adsorbates as revealed by in situ x-ray reflectivity. *Langmuir*, 28(20):7747–7756, 2012.
- [4] Parsegian. *Van der Waals forces: A handbook for biologists, chemists, engineers, and physicists*. Cambridge University Press, New York, 2006.
- [5] A. Quinn, H. Mantz, K. Jacobs, M. Bellion, and L. Santen. Protein adsorption kinetics in different surface potentials. *Europhysics Letters*, 81(5):56003, 2008.
- [6] Israelachvili. *Intermolecular and surface forces*. Academic Press, Burlington, MA, USA, 3<sup>rd</sup> edition, 2011.
- [7] E. E. Meyer, K. J. Rosenberg, and J. Israelachvili. Inaugural article: Recent progress in understanding hydrophobic interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(43):15739–15746, 2006.
- [8] B. Derjaguin and L. Landau. Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and of the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Progress in Surface Science*, 43(1-4):30–59, 1993.
- [9] E. J. W. Verwey. Theory of the stability of lyophobic colloids. *Journal of Physical Chemistry*, 51(3):631–636, 1947.
- [10] C. J. van Oss. Hydrophobicity of biosurfaces - origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 5(3-4):91–110, 1995.
- [11] P. Loskill. *Unraveling the impact of subsurface and surface properties of a material on biological adhesion - a multi-scale approach*. PhD thesis, Universität des Saarlandes, Saarbrücken, 2012.

- [12] H. J. Busscher, H. C. van der Mei, and V. Miller. How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathogens*, 8(1):e1002440, 2012.
- [13] H.-C. Flemming and J. Wingender. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 2010.
- [14] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemie*. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg [u.a.], 5 edition, 2003.
- [15] K. O’Neil and W. DeGrado. A thermodynamic scale for the helix-forming tendencies of the commonly occurring amino acids. *Science*, 250(4981):646–651, 1990.
- [16] A. Kuhne. X-ray structure of active site-inhibited clotting factor Xa. implications for drug design and substrate recognition. *Journal of Biological Chemistry*, 271(47):29988–29992, 1996.
- [17] T. Ogura and A. J. Wilkinson. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes to Cells*, 6(7):575–597, 2001.
- [18] D.C Carter and J.X Ho. Structure of serum-albumin. *Advances in Protein Chemistry*, 45:153–203, 1994.
- [19] M. Rabe, D. Verdes, and S. Seeger. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in Colloid and Interface Science*, 162(1-2):87–106, 2011.
- [20] M. T. Madigan, J. M. Martinko, and T. D. Brock. *Brock Mikrobiologie*. Pearson Studium, München [u.a.], 11<sup>th</sup> edition, 2006.
- [21] E. P. Vieira, S. Rocha, M. Carmo Pereira, H. Möhwald, and M. A. N. Coelho. Adsorption and diffusion of plasma proteins on hydrophilic and hydrophobic surfaces: Effect of trifluoroethanol on protein structure. *Langmuir*, 25(17):9879–9886, 2009.
- [22] J. R. Lu, T. J. Su, P. N. Thirtle, R. K. Thomas, A. R. Rennie, and R. Cubitt. The denaturation of lysozyme layers adsorbed at the hydrophobic solid/liquid surface studied by neutron reflection. *Journal of Colloid and Interface Science*, 206(1):212–223, 1998.
- [23] G. Raffaini and F. Ganazzoli. Protein adsorption on biomaterial and nanomaterial surfaces: a molecular modeling approach to study non-covalent interactions. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, 8(3):135–145, 2010.
- [24] C. Hannig, J Hoch, K. Becker, M. Hannig, and T. Attin. Lysozyme activity in the initially formed in situ pellicle. *Archives of Oral Biology*, 50(9):821–828, 2005.
- [25] S. Servagent-Noinville, M. Revault, H. Quiquampoix, and M.-H. Baron. Conformational Changes of Bovine Serum Albumin Induced by Adsorption on Different Clay Surfaces: FTIR Analysis. *Journal of Colloid and Interface Science*, 221(2):273–283, 2000.
- [26] Malmsten, editor. *Biopolymers at interfaces*. Marcel Dekker, New York, 2<sup>nd</sup> edition, 2003.

- [27] T. Baikie, P. H. J. Mercier, M. M. Elcombe, J. Y. Kim, Y. Le Page, L. D. Mitchell, T. J. White, and P. S. Whitfield. Triclinic apatites. *Acta crystallographica. Section B, Structural science*, 63(Pt 2):251–256, 2007.
- [28] T. White. Apatite - an adaptive framework structure. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 57(1):307–401, 2005.
- [29] E. C. Moreno, T. M. Gregory, and W. E. Brown. Preparation and solubility of hydroxyapatite. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, 72(6):773, 1968.
- [30] Elliott. *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. Elsevier, Amsterdam [The Netherlands] and New York, 1994.
- [31] M. A. Meyers, P.-Y. Chen, A. Y.-M. Lin, and Y. Seki. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science*, 53(1):1–206, 2008.
- [32] Schroeder. *Orale Strukturbiologie: Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart- und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. Thieme, Stuttgart [u.a.], 5., unveränd edition, 2000.
- [33] T. Kawasaki, M. Niikura, and Y. Kobayashi. Fundamental study of hydroxyapatite high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 515:125–148, 1990.
- [34] I. Mobasherpour, E. Salahi, and M. Pazouki. Comparative of the removal of  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  and  $Ni^{2+}$  by nano crystallite hydroxyapatite from aqueous solutions: Adsorption isotherm study. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(4):439–446, 2012.
- [35] S. Gao, J. Cui, and Z. Wei. Study on the fluoride adsorption of various apatite materials in aqueous solution. *Journal of Fluorine Chemistry*, 130(11):1035–1041, 2009.
- [36] T. S. B. Narasaraju and D. E. Phebe. Some physico-chemical aspects of hydroxylapatite. *Journal of Materials Science*, 31:1–21, 1996.
- [37] J.C. Elliott, P.E. Mackie, and R.A Young. Monoclinic hydroxyapatite. *Science*, 180(4090):1055–1057, 1973.
- [38] K. Kandori, S. Toshima, M. Wakamura, M. Fukusumi, and Y. Morisada. Effects of modification of calcium hydroxyapatites by trivalent metal ions on the protein adsorption behavior. *The Journal of Physical Chemistry B*, 114(7):2399–2404, 2010.
- [39] H. Suda, M. Yashima, M. Kakihana, and M. Yoshimura. Monoclinic-hexagonal phase transition in hydroxyapatite studied by x-ray powder diffraction and differential scanning calorimeter techniques. *Journal of Physical Chemistry*, 99(17):6752–6754, 1995.
- [40] D. Haverty, S. Tofail, K. Stanton, and J. McMonagle. Structure and stability of hydroxyapatite: Density functional calculation and rietveld analysis. *Physical Review B*, 71(9), 2005.

- [41] J. A. Weatherell, C. Robinson, and A. S. Hallsworth. Variations in the chemical composition of human enamel. *Journal of Dental Research*, 53(2):180–192, 1974.
- [42] D. M. Yebra, S. Kiil, and K. Dam-Johansen. Antifouling technology – past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, 50(2):75–104, 2004.
- [43] T. Mattila-Sandholm and G. Wirtanen. Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International*, 8(4):573–603, 1992.
- [44] H. J. Busscher. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS Microbiology Letters*, 128(3):229–234, 1995.
- [45] M. J. Levine, L. A. Tabak, M. Reddy, and I. D. Mandel. Nature of salivary pellicles in microbial adherence: role of salivary mucins. In Mergenhagen and Rosan, editors, *Molecular basis of oral microbial adhesion*, pages 125–130. American Society for Microbiology, Washington, D.C, 1985.
- [46] J. R. Smith, M. T. Cicerone, and C. W. Meuse. Tertiary structure changes in albumin upon surface adsorption observed via fourier transform infrared spectroscopy. *Langmuir*, 25(8):4571–4578, 2009.
- [47] M. Bellion, L. Santen, H. Mantz, H. Hähl, A. Quinn, A. Nagel, C. Gilow, C. Weitenberg, Y. Schmitt, and K. Jacobs. Protein adsorption on tailored substrates: long-range forces and conformational changes. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20(40):404226, 2008.
- [48] C. D. Nadell, J. B. Xavier, and K. R. Foster. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(1):206–224, 2009.
- [49] Arnebrant. Protein adsorption in the oral environment. In M. Malmsten, editor, *Biopolymers at interfaces*, pages 811–855. Marcel Dekker, New York, 2003.
- [50] A. Dolatshahi-Pirouz, T. Jensen, M. Foss, J. Chevallier, and F. Besenbacher. Enhanced surface activation of fibronectin upon adsorption on hydroxyapatite. *Langmuir*, 25(5):2971–2978, 2009.
- [51] Kandori, Mukai, Fujiwara, Yasukawa, and Ishikawa. Adsorption of bovine serum albumin and lysozyme on hydrophobic calcium hydroxyapatites. *Journal of colloid and interface science*, 212(2):600–603, 1999.
- [52] J.-W. Shen, T. Wu, Q. Wang, and H.-H. Pan. Molecular simulation of protein adsorption and desorption on hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*, 29(5):513–532, 2008.
- [53] A. Rimola, M. Corno, C. M. Zicovich-Wilson, and P. Ugliengo. Ab initio modeling of protein/biomaterial interactions: Glycine adsorption at hydroxyapatite surfaces. *Journal of the American Chemical Society*, 130(48):16181–16183, 2008.
- [54] A. Rimola, M. Corno, C. M. Zicovich-Wilson, and P. Ugliengo. Ab initio modeling of protein/biomaterial interactions: competitive adsorption between glycine and water onto hydroxyapatite surfaces. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(40):9005, 2009.

- 
- [55] M. J. Levine. Development of artificial saliva. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(3):279–286, 1993.
- [56] J. McGuire, M. C. Wahlgren, and T. Arnebrant. The influence of net charge and charge location on the adsorption and dodecyltrimethylammonium bromide-mediated elutability of bacteriophage T4 lysozyme at silica surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 170(1):193–202, 1995.
- [57] M. Johnsson, M. J. Levine, and G. H. Nancollas. Hydroxyapatite binding domains in salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 4(3):371–378, 1993.
- [58] E. C. Moreno, K. Varughese, and D. I. Hay. Effect of human salivary proteins on the precipitation kinetics of calcium phosphate. *Calcified Tissue International*, 28(1):7–16, 1979.
- [59] M. Rykke, T. G. Devold, G. Smistad, and G. E. Vegarud. Comparison of bovine casein micelles and human salivary micelle-like structures. *International Dairy Journal*, 9(3-6):365–366, 1999.
- [60] H. C. Margolis, E. Beniash, and C. E. Fowler. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *Journal of dental research*, 85(9):775–793, 2006.
- [61] J. Arends. Zeta potentials of enamel and apatites. *Journal of Dentistry*, 7(3):246–253, 1979.
- [62] S. Bertazzo, W. F. Zambuzzi, D. D. P. Campos, T. L. Ogeda, C. V. Ferreira, and C. A. Bertran. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78(2):177–184, 2010.
- [63] R. L. Hayes, N. W. Littleton, and C. L. White. Posteruptive effects of fluoridation on first permanent molars of children in grand rapids, michigan. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 47(2):192–199, 1957.
- [64] J.J Yeh and I. Lindau. Atomic subshell photoionization cross sections and asymmetry parameters:  $1 < z < 103$ . *Atomic Data and Nuclear Data Tables*, 32(1):1–155, 1985.
- [65] D. Shirley. High-resolution x-ray photoemission spectrum of the valence bands of gold. *Physical Review B*, 5(12):4709–4714, 1972.
- [66] H. M. Rietveld, E. N. Maslen, and C. J. B. Clews. An x-ray and neutron diffraction refinement of structure of para-terphenyl. *Acta Crystallographica Section B: Structural Crystallography and Crystal Chemistry*, 26:693ff, 1970.
- [67] G. Binnig and C. F. Quate. Atomic force microscope. *Physical Review Letters*, 56(9):930–933, 1986.
- [68] B. Bhushan and O. Marti. Scanning probe microscopy principle of operation, instrumentation, and probes. In B. Bhushan, editor, *Springer handbook of nanotechnology*, Springer handbook, chapter 11. Springer, Berlin [u.a.], 2004.

- [69] A. Schirmeisen, B. Anczykowski, and H. Fuchs. Dynamic force microscopy. In Bhushan, editor, *Springer handbook of nanotechnology*, Springer handbook, chapter 15. Springer, Berlin [u.a.], 2004.
- [70] H.-J. Eichler. Interferenz, Beugung und Wellenleitung. In L. Bergmann, H.-J. Eichler, H. Niedrig, and C. Schaefer, editors, *Optik*, volume 3 of *Lehrbuch der Experimentalphysik - Bergmann-Schäfer*, pages 301–480. De Gruyter, Berlin [u.a.], 2004.
- [71] L. deBroglie. Recherches sur la théorie des quanta: Dissertation. *Phil. Mag.*, 47:446–458, 1924.
- [72] H. Lichte and H. Niedrig. Materiewellen, Elektronenoptik. In Bergmann, Eichler, Niedrig, and Schaefer, editors, *Optik*, volume 3 of *Lehrbuch der Experimentalphysik / Bergmann-Schäfer*, pages 1031–1132. De Gruyter, Berlin [u.a.], 2004.
- [73] M. Knoll and E. Ruska. Das Elektronenmikroskop. *Z. Physik (Zeitschrift für Physik)*, 78(5-6):318–339, 1932.
- [74] E. Fuchs, H. Oppolzer, and H. Rehme. *Particle beam microanalysis: Fundamentals, methods, and applications*. VCH, Weinheim, F.R.G and New York, NY, USA, 1990.
- [75] Goldstein. *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer, New York [etc.], 3<sup>rd</sup> edition, 2003.
- [76] Callister and Rethwisch. *Materialwissenschaften und Werkstofftechnik: Eine Einführung*. Wiley-VCH, Weinheim, 1<sup>st</sup> edition, 2012.
- [77] Schatt. *Sintervorgänge*. VDI-Verl., Düsseldorf, 1992.
- [78] B.R. Bhussry. Chemical and Physical Studies of Enamel From Human Teeth: IV. Density and Nitrogen Content of Mottled Enamel. *Journal of Dental Research*, 38(2):369–373, 1959.
- [79] O. Prokopiev, I. Sevostianov, J. Genin, S. M. McGee, and C. Woodward. Microstructure and elastic properties of sintered hydroxyapatite. *International Journal of Fracture*, 130(3):L183–L190, 2004.
- [80] D. W. Holcomb and Young R. A. Thermal decomposition of human tooth enamel. *Calcified Tissue International*, 31(1):189–201, 1980.
- [81] S. Bertazzo, W. F. Zambuzzi, D. D. P. Campos, C. V. Ferreira, and C. A. Bertran. A simple method for enhancing cell adhesion to hydroxyapatite surface. *Clinical Oral Implants Research*, 21(12):1411–1413, 2010.
- [82] J. P. Gittings, C. R. Bowen, A. C. E. Dent, I. G. Turner, F. R. Baxter, and J. B. Chaudhuri. Electrical characterization of hydroxyapatite-based bioceramics. *Acta Biomaterialia*, 5(2):743–754, 2009.
- [83] R. P. Shellis and R. M. Duckworth. Studies on the cariostatic mechanisms of fluoride. *International dental journal*, 44(3 Suppl 1):263–273, 1994.

- 
- [84] N. Guha-Chowdhury, A. G. Clark, and C. H. Sissons. Inhibition of purified enolases from oral bacteria by fluoride. *Oral Microbiology and Immunology*, 12(2):91–97, 1997.
- [85] J. Ekstrand and Fejerskov O., editors. *Fluoride in Dentistry: Physicochemical aspects of fluoride/enamel interactions*. Munksgaard International Publishers: Copenhagen, 1988.
- [86] F. Müller, C. Zeitz, H. Mantz, K.-H. Ehses, F. Soldera, J. Schmauch, M. Hannig, S. Hüfner, and K. Jacobs. Elemental depth profiling of fluoridated hydroxyapatite: Saving your dentition by the skin of your teeth? *Langmuir*, 26(24):18750–18759, 2010.
- [87] V. Caslavská and H. Duschner. Effect of a surface-active cation on fluoride/enamel interactions in vitro. *Caries Research*, 25(1):27–33, 1991.
- [88] H. Uchtmann and H. Duschner. Basic biological sciences: Electron spectroscopic studies of interactions between superficially-applied fluorides and surface enamel. *Journal of Dental Research*, 61(2):423–428, 1982.
- [89] H. Duschner and H. Uchtmann. Effect of sodium fluoride, stannous fluoride, amine hydrofluoride and sodium monofluorophosphate on the formation of precipitates adhering to bovine enamel. *Caries Research*, 22(2):65–71, 1988.
- [90] H. Gerth, T. Dammaschke, E. Schäfer, and H. Züchner. A three layer structure model of fluoridated enamel containing  $\text{CaF}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  and FAp. *Dental Materials*, 23(12):1521–1528, 2007.
- [91] C. Chairat, J. Schott, E. H. Oelkers, J.-E. Lartigue, and N. Harouiya. Kinetics and mechanism of natural fluorapatite dissolution at 25 °C and pH from 3 to 12. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 71(24):5901–5912, 2007.
- [92] D. F. G. Poole, H. N. Newman, and G. H. Dibdin. Structure and porosity of human cervical enamel studied by polarizing microscopy and transmission electron microscopy. *Archives of Oral Biology*, 26(12):977–982, 1981.
- [93] C.-J. Liao, F.-H. Lin, K.-S. Chen, and J.-S. Sun. Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere. *Biomaterials*, 20(19):1807–1813, 1999.
- [94] Hüfner. *Photoelectron spectroscopy: Principles and applications*, volume 82 of *Springer series in solid-state sciences*. Springer, Berlin and New York, 2<sup>nd</sup> edition, 1996.
- [95] J. D. B. Featherstone. The science and practice of caries prevention. *The journal of the American Dental Association*, 131(7):889–899, 2000.
- [96] Lowenstam and Weiner. *On biomineralization*. Oxford University Press, New York, 1989.
- [97] Fünfschilling, S. Porosität von mit FAST verdichteten HAP-Proben, 4.11.2009.
- [98] J. H. Leibfarth and R. H. Persellin. Review: Mechanisms of action of gold. *Agents and Actions*, 11(5):458–472, 1981.

- [99] P. Loskill, C. Zeitz, S. Grandthyll, N. Thewes, F. Müller, M. Bischoff, M. Herrmann, and K. Jacobs. Reduced adhesion of oral bacteria on hydroxyapatite by fluoride treatment. *Langmuir*, 29(18):5528–5533, 2013.
- [100] Bruker. Nanoscope analysis, 2012.
- [101] McDowell, H., T. M. Gregory, and W. E. Brown. Solubility of  $Ca_5(PO_4)_3OH$  in the system  $Ca(OH)_2 - H_3PO_4 - H_2O$  at 5 °C, 15 °C, 25 °C and 37 °C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards Section A: Physics and Chemistry*, 81(2/3):273, 1977.
- [102] A. Nordström and D. Birkhed. Effect of a third application of toothpastes (1450 and 5000 ppm  $F^-$ ), including a ‘massage’ method on fluoride retention and pH drop in plaque. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(1):50–56, 2013.
- [103] V. Sternitzke, R. Kaegi, J.-N. Audinot, E. Lewin, J. G. Hering, and C. A. Johnson. Uptake of fluoride from aqueous solution on nano-sized hydroxyapatite: Examination of a fluoridated surface layer. *Environmental Science & Technology*, 46(2):802–809, 2012.
- [104] M. A. Lopes, F. J. Monteiro, J. D. Santos, A. P. Serro, and B. Saramago. Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass-reinforced hydroxyapatite composites. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45(4):370–375, 1999.
- [105] M. K. Y. Rao, P. Somasundaran, K. M. Schilling, B. Carson, and K. P. Ananthapadmanabhan. Bacterial adhesion onto apatite minerals – electrokinetic aspects. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 79(2-3):293–300, 1993.
- [106] P. Somasundaran. Zeta potential of apatite in aqueous solutions and its change during equilibration. *Journal of Colloid and Interface Science*, 27(4):659–666, 1968.
- [107] A. Barroug au J. Lemaitre and P.G Rouxhet. Lysozyme on apatites: A model of protein adsorption controlled by electrostatic interactions. *Colloids and Surfaces*, 37:339–355, 1989.
- [108] E. C. Reynolds and A. Wong. Effect of adsorbed protein on hydroxyapatite zeta potential and streptococcus mutans adherence. *Infect. Immun.*, 39:1285–1290, 1983.
- [109] W. Wu and G. H. Nancollas. Determination of interfacial tension from crystallization and dissolution data: A comparison with other methods. *Advances in Colloid and Interface Science*, 79(2-3):229–279, 1999.
- [110] H. J. Busscher, H.P de Jong, and J. Arends. Surface free energies of hydroxyapatite, fluorapatite and calcium fluoride. *Materials Chemistry and Physics*, 17(6):553–558, 1987.
- [111] N. Takahashi and J. Washio. Metabolomic effects of xylitol and fluoride on plaque biofilm in vivo. *Journal of Dental Research*, 90(12):1463–1468, 2011.
- [112] N. Thewes. Preparation method for single bacteria functionalized AFM probes. *in preparation*.



- [113] K. S. Ambatipudi, F. K. Hagen, C. M. Delahunty, X. Han, R. Shafi, J. Hryhorenko, S. Gregoire, R. E. Marquis, J. E. Melvin, H. Koo, and J. R. Yates. Human Common Salivary Protein 1 (CSP-1) Promotes Binding of Streptococcus mutans to Experimental Salivary Pellicle and Glucans Formed on Hydroxyapatite Surface. *Journal of Proteome Research*, 9(12):6605–6614, 2010.
- [114] D. C. Phillips. The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Scientific American*, 215(5):78–90, 1966.
- [115] P. Jollès and J. Jollès. What’s new in lysozyme research? *Molecular and Cellular Biochemistry*, 63(2), 1984.
- [116] M. Hannig and C. Hannig. Nanomaterials in preventive dentistry. *Nature Nanotechnology*, 5(8):565–569, 2010.
- [117] A. G. Fincham, J. Moradian-Oldak, T. G. H. Diekwisch, D. M. Lyaruu, J. T. Wright, P. Bringas, and H. C. Slavkin. Evidence for amelogenin ”nanospheres” as functional components of secretory-stage enamel matrix. *Journal of Structural Biology*, 115(1):50–59, 1995.
- [118] N. Bouropoulos and J. Moradian-Oldak. Analysis of hydroxyapatite surface coverage by amelogenin nanospheres following the langmuir model for protein adsorption. *Calcified Tissue International*, 72(5):599–603, 2003.
- [119] L. H. He and M. V. Swain. Understanding the mechanical behaviour of human enamel from its structural and compositional characteristics. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(1):18–29, 2008.



## Danke

Aufgrund der Vielzahl der Disziplinen, die in diese Arbeit eingeflossen sind, wurde ich bei der Erstellung von vielen Seiten unterstützt. Für den Zugang zu ihrem FAST-Sinterofens danke ich Stefan Fünfschilling, Deniz Kahraman und Prof. Hoffmann vom KIT in Karlsruhe, Institut für Angewandte Materialien – Keramik im Maschinenbau. Bei der Charakterisierung der Proben durch elektronenoptische oder -spektrometrische Verfahren (REM, TEM, EDX, EBSD) danke ich Jörg Schmauch (AG Birringer, UdS) und Norbert Pütz (Anatomie UKS Homburg), die mit vielen Vorschlägen auch zur Verbesserung der Ergebnisse beigetragen haben. Für die Unterstützung bei der Charakterisierung der Proben mit Röntgenbeugung danke ich Michael Deckarm und Manuel Grever von der AG Birringer sowie Herrn Prof. Ehses, der in der Frühphase dieser Arbeit sein Wissen über Kristallstrukturen eingebracht hat. Herr Natter (AG Hempelmann, UdS) brachte seine Routine bei der Bewertung einzelner XRD-Spektren ein. Unterstützung und Hinweise habe ich auch von Herrn Falk und anderen Mitarbeitern der Gruppe von Herrn Prof. Clasen (Pulvertechnologie von Glas und Kermaik, UdS) erhalten, wofür ich ebenfalls meinen Dank ausdrücken möchte.

Der gesamten Arbeitsgruppe von Karin Jacobs möchte ich danken. Das familiäre Miteinander, die Offenheit und eine vielfache Unterstützung empfand ich zu jeder Zeit als ein großes Plus, das ich in Zukunft in guter Erinnerung behalten werde. Besonderen Dank möchte ich Judith Rech und Monika Schuck ausdrücken. Viele administrative Angelegenheiten gingen über deren Tisch, die mich binnen kürzester Zeit genervt hätten. Der „Dünnschnittsektion“ unserer Arbeitsgruppe möchte ich danken, denn auch sie hat sich regelmäßig mit ihrer Sichtweise von etwas weiter außerhalb in den Diskussionen während der Gruppenrunden eingebracht. Besonders sei hier neben Oliver Bäumchen, Matthias Lessel und Mischa Klos noch Sabrina Haefner dankend erwähnt, die sich tapfer gegen die Mannsbilder durchzusetzen versteht. Thematisch näher dabei waren natürlich die Bio-Leute, mit denen Projektideen mit biologischem Bezug entstanden und teilweise auch umgesetzt worden sind. Da möchte ich der Bakterienabteilung mit Peter Loskill und Nic Thewes ebenso danken wie den Proteinleuten um Hendrik Hähl und Christian Spengler. Erquickliche Diskussionen durfte ich besonders mit Frank Müller und Samuel Grandthyll in festkörperphysikalischen Zusammenhängen haben. Außerdem haben mir beide trotz ihres allzu oft engen Terminplans zeitweilig eine Nutzungsnische für meine Messungen an ihrem Elektronenspektrometer eingeräumt.

Matthias Lessel muss ich ein zweites Mal danken, er musste mich nämlich nach unserem Umzug als seinen Bürogenossen ertragen. Wann immer gerade eine Diskussion zum Ordnen der eigenen Gedanken notwendig war, konnte ich ihn befragen, und mir haben die zahllosen Gespräche sehr viel genutzt. Gerade gegen Ende der Schreibphase, wenn Detailfragen plötzlich eine große Rolle spielen, erwies sich dies als hilfreich.

Besonderen Dank und Hochachtung möchte ich Prof. em. Stefan Hufner ausdrücken. Ich durfte mit ihm die eine oder andere Diskussion der Art führen, die Erkenntnisse und Einsichten

auch Abseits der Physik stimuliert hat und die sicherlich über ein rein wissenschaftliches Thema hinausging. Daneben war seine Tür aber auch immer dann offen, wenn fachliche Fragen aufkamen.

Karin Jacobs und Ralf Seemann möchte ich danken für ihre offene, ehrliche und herzliche Art, auf die sie ihre Arbeitsgruppen leiten. Ich danke für zahlreiche Anmerkungen, die sicherlich an manchen Stellen aus Kritik, aber – und das ist ein anderenorts eben nicht selbstverständlicher Aspekt – auch immer wieder aus positive Rückmeldungen bestanden. Ich wusste dadurch immer, woran ich war. Dadurch war es auch möglich sehr frei einer Idee nachzugehen, selbst wenn am Ende das Ergebnis vielleicht weniger spektakulär war als gehofft. Durch individuelle Förderung, durch die Möglichkeit zum Besuch zahlreicher Konferenzen oder die Teilnahme an Workshops blieb die Zeit in dieser Arbeitsgruppe sicher nicht ohne Wirkung auf mein eigenes Tun und meine Fähigkeiten.

Zuletzt möchte ich meinem Freundeskreis und meiner Familie danken. Alle haben mich im Rahmen ihrer Möglichkeiten unterstützt, motiviert und gefördert, was insbesondere gegen Ende der Arbeit sehr hilfreich war. Meine Eltern speziell danke ich überdies für ihr Dasein – in allen Facetten.

Vielen Dank!

Christian

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, den 11. November 2013