

Krystallisation af calciumfosfat i vægtløshed

Hans Erik Lundager Madsen
Kemisk Institut, KVL

Under de fleste længerevarende rummissioner, der har været gennemført i de senere årtier, har der været udført krystallisationsforsøg med forskellige stoffer. Betydningen af sådanne forsøg ligger i, at man kan forvente at få krystaller af bedre kvalitet, når systemet ikke påvirkes af tyngdekraften. På EURECA-rumplatformen, der var i kredsløb fra august 1992 til juni 1993, var der 4 forskellige opstillinger til krystallisation. To af disse var indrettet til krystallisation fra opløsning: Protein Crystallization Facility og Solution Growth Facility (SGF). SGF omfattede 4 reaktionsbeholdere, hvoraf de to var ens; i disse udførtes forsøg af eller under medvirken af danske forskergrupper på hhv. Kemisk Institut KVL og Fysisk Institut DTU. Det ene af disse forsøg og de foreløbige resultater vil her blive beskrevet.

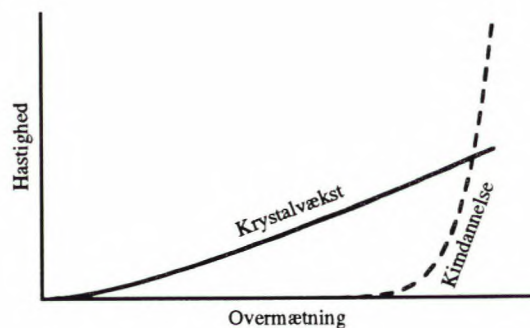
Formål med krystallisationsforsøg i rummet

De fleste, der har prøvet at udkrystallisere et stof fra en opløsning, ved, at bevægelse i væsken spiller en afgørende rolle for størrelsen og kvaliteten af de krystaller, der dannes. Hvis man lader opløsningen stå i ro, dannes der som regel få, store og ret klare krystaller, men hvis man rører rundt eller ryster beholderen, kommer der mange små krystaller. For et stof, der udskilles ved afkøling af en opløsning, er det også af betydning, hvor hurtigt afkølingen sker; vil man have store krystaller, må man afkøle langsomt. Den samlede stofmængde, der udskilles, er under alle omstændigheder lig med forskellen mellem den mængde, der oprindeligt er opløst, og det, der kan opløses ved slutbetingelserne, opløseligheden. Det er altså antallet af krystaller, der varierer med måden, man får stoffet til at krystallisere på.

For at et stof kan krystallisere fra en opløsning, må opløsningen være overmættet. Det er overmætningen, der udgør drivkraften for krystallisationsprocessen, og jo højere den er, desto højere er processens hastighed. Imidlertid består en krystallisationsproces af to trin: krystallernes dannelse, kaldet kimdannelsen, og deres vækst. Disse to delprocessers hastigheder afhænger på hver sin måde af overmætningen, således som Figur 1 viser. Medens allerede dannede krystaller kan vokse selv ved lav overmætning, vil der først dannes nye krystaller, når overmætningen når et vist kritisk niveau; derover går det til gengæld hurtigt. Heri ligger forklaringen på den rolle, som afkølingshastigheden spiller for krystallernes størrelse; ved hurtig afkøling kan man nå op på en høj overmætning og dermed en høj kimdannelseshastighed.

Når der først er dannet krystaller, vil disse vokse og optage stof fra opløsningen. Dens overmætning vil derved aftage og efterhånden nå ned under den kritiske værdi, og

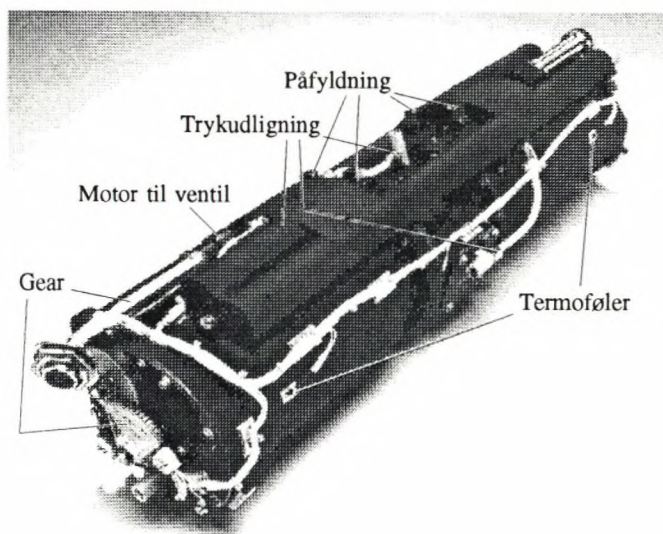
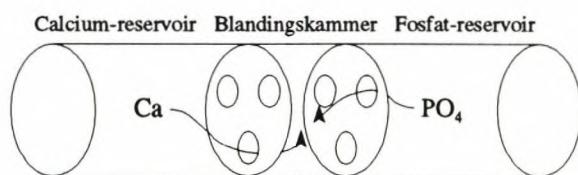
fra dette tidspunkt dannes der ingen nye krystaller. De eksisterende krystaller vil fortsætte med at vokse stadig langsommere, indtil opløsningen ikke længere er overmættet.



Figur 1. Kimdannelses- og krystalvæksthastigheder (hhv. antal pr. cm^3 opløsning pr. s og stofmængde pr. cm^2 krystaloverflade pr. s) som funktioner af overmætningen for en typisk krystal.

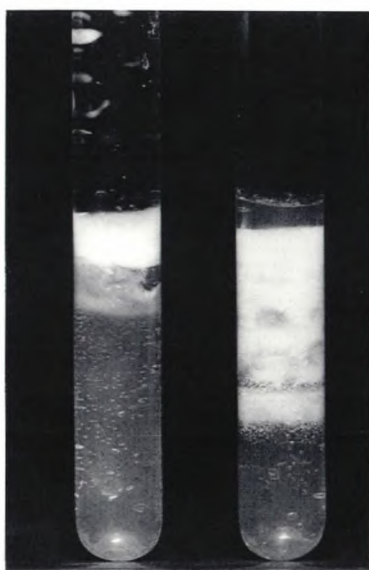
Normalt er det kun forholdsvis letopløselige stoffer, man kan få til at krystallisere i rimelig grad ved afkøling af en opløsning. De stoffer, der er tungtopløselige ved 20°C , er som regel også tungtopløselige ved 100°C , og der er endda mange tungtopløselige stoffer, hvis opløselighed aftager ved stigende temperatur. Krystaller af et tungtopløseligt stof får man normalt ved at blande to stoffer, der reagerer med hinanden og danner de ønskede krystaller; man taler her om reaktionskrystallisation. Det er imidlertid i dette tilfælde meget vanskeligere end ved letopløselige stoffer at styre overmætningen og dermed krystallisationsprocessen. Hvis man blot hælder opløsninger af de to reagerende stoffer - reaktanterne - sammen, vil overmætningen blive meget høj, og der dannes mange småkrystaller. Selv ved dråbevis tilsætning kan man næppe undgå en høj lokal overmætning der, hvor dråben rammer.

Den langsomste form for stoftransport er diffusion, som skyldes molekylernes tilfældige bevægelser. Hvis man kan blande reaktanterne ved diffusion, har man derfor en chance for at få store krystaller. Det er dog ikke tilstrækkeligt at bringe de to opløsninger i kontakt med hinanden meget forsigtigt, for hvis de har forskellig vægtfylde, vil denne forskel bevirke en hurtig blanding ved konvektion. Man kan fremstille opløsninger med nøjagtig samme vægtfylde og dermed opnå, at stofferne i begyndelsen blandes ved diffusion, men så snart der er dannet krystaller, begynder opløsningens koncentration og dermed dens vægtfylde i nærheden af disse at falde. Desuden bliver krys-



Figur 3. SGF-krystallisatoren, til venstre principskitse, til højre praktisk udførelse.

tallerne efterhånden så store, at de synker til bunds i beholderen, og dette giver ligeledes bevægelse i væsken.



Figur 2. Calciumfosfat-krystallisation i kiselsyregele. Samme opløsninger i de to glas, men med den lettere fosfatopløsning øverst i det venstre glas, nederst i det højre.

Man kan løse problemet delvis ved at gøre væsken eller en del af den stiv med et geleringsmiddel. Her-til bruger man oftest kiselsyre, der fremstilles enten ved tilsætning af en passende mængde syre til en opløsning af vandglas (natriumsilikat) eller ved at blande lidt af en ester af kiselsyre i en vandig opløsning. Andre stoffer som gelatine, agar eller polyacrylamid kan også bruges. Den enkleste metode består i, at man fylder et reagensglas

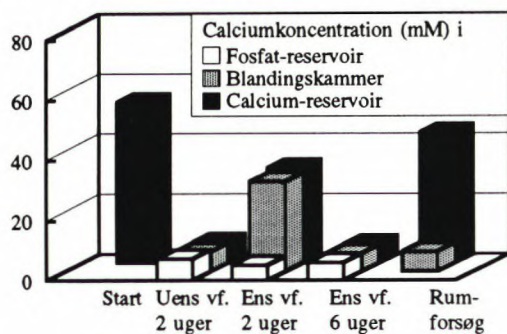
halvt med en opløsning af den ene reaktant, hvortil man har sat geleringsmidlet. Når væsken er stiv, fylder man op med en opløsning af den anden reaktant, som derefter vil diffundere ned i gelen og danne krystaller ved reaktion med den første reaktant. Metoden udgør dog ikke nogen fuldstændig løsning. For det første vil mange stoffer reagere med geleringsmidlet, eller dette kan blive indesluttet som urenhed i krystallerne, og for det andet kan man ikke regne med, at stoftransporten i gelen udelukkende er diffusion. Figur 2 viser resultaterne af to krystallisationsforsøg med calciumfosfat, hvor den ene opløsning, calciumklorid, har højere vægtfylde end den anden, ammoniumfosfat. Det ses tydeligt på udfældningen, at calciumopløsningen, når den er øverst, når meget længere ned i gelen til trods for, at de to stoffer diffunderer næsten lige hurtigt. Her bevirker tyngdekraften en hurtigere transport af det tungere stof.

Den eneste måde, hvorpå man kan sikre sig stof-transport udelukkende ved diffusion og undgå uønskede bivirkninger, er at eliminere tyngdekraften, d.v.s. sende forsøgsopstillingen i kredsløb om jorden. Derved opnår man samtidig, at krystallerne ikke synker til bunds og kommer til at ligge tæt op ad hinanden, men bliver på det sted i væsken, hvor de er dannet. Ulempen er de store krav, der stilles til udstyrets sikkerhed, og de høje omkostninger.

Apparatur til reaktionskrystallisation i rummet

En reaktionsbeholder eller krystallisator til brug ved rumforsøg består normalt af 3 kamre, to reservoirer til reaktanterne og et blandingskammer, der tjener til yderligere forsinkelse af blandingsprocessen. Kamrene er adskilt af vægge med ventiler, der skal kunne åbnes på en sådan måde, at det enkelte kammers rumfang ikke ændres, og at bevægelsen i væsken bliver minimal; dette sidste nødvendiggør meget langsom åbn-

ing. Da man ikke kan regne med, at de tre væsker har nøjagtig samme varmeudvidelseskoefficient, er krystallisatoren udstyret med et system til udligning af trykforskelle mellem kamrene, idet en trykforskel kan medføre bevægelse i væske, når ventilerne åbnes. Endelig skal kamrene kunne fyldes helt med væske, da der ved en væske-luft-overflade kan optræde Marangoni-konvektion; denne skyldes forskelle i overfladespænding i forskellige områder af overfladen. Det er en selvfølge, at de materialer, der er i kontakt med væske, under ingen omstændigheder må kunne angribes af disse. Dette er ikke kun et spørgsmål om beholderens holdbarhed, men i mindst lige så høj grad om at undgå forurening af væske; selv meget lave koncentrationer af urenheder kan påvirke krystallisationen. Et overordnet krav til apparaturet er en meget høj grad af sikkerhed og pålidelighed. Udsivning af væske kan beskadige andet apparatur og i alvorlige tilfælde bringe rumfærgen og astronauterne i fare. Der er ingen mulighed for reparation undervejs, og hvis noget svigter eller bryder sammen, betyder det sædvanligvis et mislykket forsøg, som i bedste fald først vil kunne gentages efter længere tids forløb.



Figur 4. Fordeling af calcium mellem de tre kamre i krystallisatoren i forskellige jordbaserede forsøg og i rumforsøget. "Uens vf." betegner et forsøg med ammoniumsalte. Den forsvundne stofmængde findes i det udfældede stof.

SGF-krystallisatoren, der blev anvendt på EURECA, er vist på Figur 3. Den er konstrueret af Oerlikon-Contraves i Z-rich og består hovedsagelig af aluminium med en indvendig beklædning af en fluorholdig plasttype kaldet halar. Bælgene i trykdigningssystemet er ligeledes af halar; der er en i enden af hvert reservoir og tre i siden af blandingskammeret. Ventilerne, der åbnes ved drejning om krystallisatorens længdeakse, er af borsilikatglas. Åbning og lukning besørges af en lille motor, der trækker på ventilakslen via et gear med en udveksling på 1:13.000.000; dermed bliver tiden for åbning eller lukning knap et døgn. De to ventiler har hver sin motor, så at de kan åbnes og lukkes uafhængigt af hensyn til fyldning og tømning. Der er, som det fremgår af skitsen på Figur 3, 3 huller mellem hvert reservoir og blandingskammeret. Hvert reservoir har et rumfang på 2 liter, og blandingskammerets rumfang er 0,5 liter. For at kunne holde en konstant forsøgstemperatur er krystallisatoren anbragt i en lukket cylinder med udvendig kobberbevikling, som

forsynes med strøm fra rumplatformens solpaneler. Da der kun er 15 W til rådighed for hver krystallisator, er det nødvendigt med en god varmeisolering uden om cylinderen. Mellemrummet mellem krystallisator og cylinder er ligesom trykdigningssystemet fyldt med argon.

Resultater af jordbaserede forsøg

Omhyggelige, forberedende laboratorieforsøg er af største betydning for et godt resultat af et rumforsøg. Samtidig kan det være af stor interesse, bl.a. af hensyn til fortolkning af resultaterne, at udføre et jordbaseret referenceforsøg, der er så vidt muligt identisk med rumforsøget.

På KVL havde vi rådighed over to såkaldte "engineering models" af SGF-krystallisatoren; disse er identiske med dem, der bruges til rumforsøget ("flight models"). Med disse udførte vi en halv snes forsøg med varighed fra 2 uger til 6 måneder. I 4 af forsøgene anvendtes de samme opløsninger som ved rumforsøget: i det ene reservoir en kaliumfosfatopløsning med pH 7,6, i det andet en calciumkloridopløsning og i blandingskammeret en 0,16 M kaliumkloridopløsning. Alle tre opløsninger havde samme vægtfylde, hvilket for calciumkloridopløsningens vedkommende opnåedes ved tilsætning af kaliumklorid.

Edwards High Vacuum Turbomolekularpumper

- ★ 4 basistyper
- ★ High Power DC-motor
- ★ 40 flangevarianter
- ★ Ny EXT E økonomiversion
- ★ 17 modeller
- ★ Lavt støj- og vibrationsniveau

EDWARDS

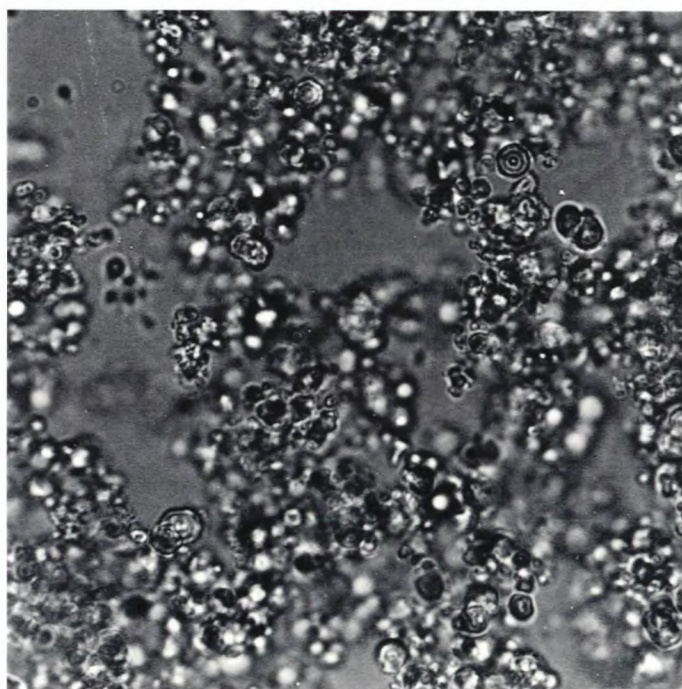


Edwards High Vacuum er en af verdens førende producenter af vakuumpumper og -udstyr. Den nye EXT E version gør det nu muligt at anskaffe en Turbomolekular Vakuumpumpe til en fornuftig pris. Kan køles enten med luft eller vand, og kan styres af den normale EXC350 og EXC500 Turbo-kontroller. Edwards High Vacuum er også Dry Pumps, Diff. Pumps, Vakuummåleinstrumenter, Frysetørningsanlæg og Pådampningsanlæg.

Ring for yderligere oplysninger!

Marielundvej 36
2730 Herlev
42 91 75 11

Buch & Holm A/S



Figur 5. Til venstre fasekontrastmikrofotografi, til højre transmissions-elektronmikrofotografi med elektrondiffraktogram af produkt fra jordbaseret referenceforsøg.

Et af de fire forsøg tjente som referenceforsøg. For at få yderligere information om vægtfyldeforskellenes betydning benyttedes ved 3 andre opløsninger af samme koncentrationer som i de 4 nævnte og rumforsøget, men med ammoniumsalte i stedet for kaliumsalte. Opløsningerne af ammoniumsalte har lavere vægtfylde end opløsningerne af kaliumsalte, hvorved calciumkloridopløsningen får højere vægtfylde end de andre opløsninger. I øvrigt er der meget ringe forskel på kalium- og ammoniumionens opførsel i opløsning.

Efter afslutning af hvert forsøg blev der bestemt calcium- og fosfatkoncentration i hvert af krystallisatorens tre kamre, og det udfældede calciumfosfat blev undersøgt ved mikroskopi og ved røntgen- og elektrondiffraktion. Figur 4 viser fordelingen af calcium mellem kamrene i udvalgte forsøg; fosfat viste en lignende fordeling, blot fra den anden ende af krystallisatoren. Det er tydeligt, at forskelle i vægtfylde bevirker en fuldstændig udjævning af koncentrationsforskelle i løbet af et par uger, hvorimod der skal udfældes en del stof i opløsningerne med samme vægtfylde, førend der kommer gang i konvektionen. Når man sammenligner med rumforsøget, der varede 5 måneder, er det dog klart, at der selv med ens vægtfylde har været nogen væskestrømning inden for de første to uger.

Det udfældede stof bestod i samtlige forsøg af hydroxylapatit ($\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$) i form af submikroskopiske krystaller (1 m og mindre). Det kunne således kun identificeres ved diffraktion og transmissionselektronmikroskopi. Krystallerne var samlet i kugleformede aggregater med en

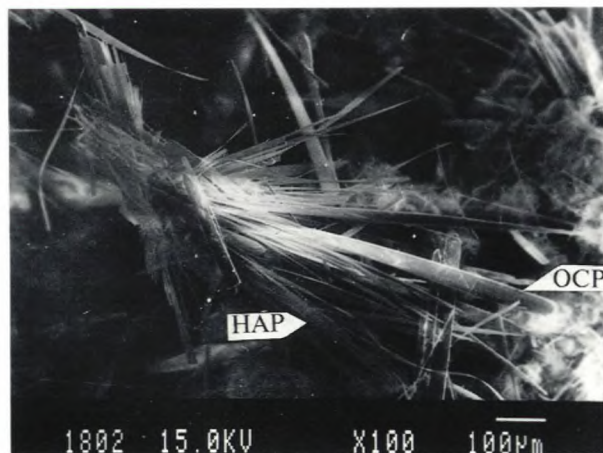
diameter på nogle få m (Figur 5). De forskellige forsøg gav ikke produkter af væsentlig forskellig krystalstørrelse. Der kunne konstateres en lidt bedre krystallinitet ved de langvarige forsøg. Under alle omstændigheder har konvektionen medført en hurtig blanding af reaktanterne, og det har givet høj overmætning og dannelse af et stort antal krystaller.

Krystalstørrelsen er typisk for udfældning ved en temperatur på 40°C . De apatitkrystaller, som findes i knoglerne, og som jo er dannet ved 37°C , er af nogenlunde samme størrelse.

Resultater af rumforsøget

Varigheden af selve krystallisationsforsøget på EURECA var 5 måneder, hvorefter ventilerne i krystallisatoren blev lukket og yderligere stoftilførsel til blandingskammeret afskåret. Det fremgår umiddelbart af Figur 4, at stoftransporten ved rumforsøget har været meget langsommere end ved de jordbaserede forsøg, og en overslagsberegning har vist, at situationen svarer ganske godt til, at der har været tale om ren diffusion. Det har her været en fordel, at rumplatformen var ubemandet, idet astronauternes bevægelser på en bemandet rummission er tilstrækkelige til at forårsage nogen væskestrømning. Udbyttet af krystaller var kun ca. 15% af, hvad det ville have været, hvis reaktanterne var blevet blandet fuldstændigt.

Som følge af den langsomme stoftransport og den deraf følgende lavere overmætning er de enkelte apatitkrystaller blevet mange gange større end ved de jordbaserede forsøg.



Figur 6. Krystaller i produktet fra rumforsøget, til venstre set i lysmikroskop, til højre i scanning elektronmikroskop. "HAP" og "OCP" betyder hydroxylapatit og oktaaluminiumfosfat.

De danner stadig kugleformede aggregater, men nu meget mere regelmæssige, idet de enkelte krystaller ses at stråle ud fra centrum; sådanne aggregater kaldes sfærolitter (Figur 6). De fleste har en diameter på 50-100 µm, men der er fundet enkelte med en diameter på 0,5 mm. Så store apatitkrystaller er ikke tidligere fremstillet ved så lav temperatur; de kan dog muligvis dannes i kiselsyre.

Ud over apatit fandtes der i produktet fra rumforsøget endnu større krystaller af en anden form for calciumfosfat, oktaaluminiumfosfat ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, forkortet OCP), der er en metastabil form. Krystallerne er oftest 0,1-1 mm lange, enkelte dog helt op til 3 mm, ret smalle og meget tynde (Figur 6). De findes dels som enkeltkrystaller, dels som aggregater; det er dog ret sandsynligt, at enkeltkrystallerne oprindeligt har siddet i aggregater, hvorfra de er gået løs enten under nedtagningen af EURECA eller i laboratoriet. OCP udgør mængdemæssigt ca. 2/3 af produktet, men antallet af OCP-aggregater er kun ca. 0,2% af antallet af apatitaggregater. I de jordbaserede forsøg er der ikke fundet OCP.

Så vidt det kan konstateres, er al OCP dannet ved krystallisation på apatit (heterogen kimdannelse), altså ikke ved selvstændig (homogen) kimdannelse. Dels ser man i mange tilfælde OCP-krystaller vokse ud fra apatitaggregater (Figur 6, højre billede), dels består kernen af OCP-aggregaterne af et stof med højere brydningsforhold end OCP ($> 1,60$, mod 1,58 for OCP), hvilket svarer til apatitkrystallers brydningsforhold. At dette er muligt på trods af OCP's metastabilitet, skyldes dels den ret store lighed mellem apatits og OCP's krystalstrukturer, der giver

mulighed for epitaksi, dels, at OCP-krystallerne, når de først er dannet, vokser meget hurtigere end apatitkrystallerne.

Det forhold, at al apatit findes som sfærolitter og ingen som enkeltkrystaller, tyder på, at krystallisationen er startet ved høj overmætning. Til gengæld er ingen af sfærolitterne væsentlig mindre end 50 µm i diameter, hvorefter vi kan slutte, at kimdannelsen er gået i stå på et forholdsvis tidligt tidspunkt. Derefter har alt det tilførte stof alene bidraget til krystallernes vækst; overmætningen er derfor holdt nede på en værdi lavere end den kritiske for kimdannelse (jvf. Figur 1). Selv en svag væskebevægelse ville forstyrre denne tilstand og helt forandre produktets karakter i retning af, hvad man får ved jordbaserede forsøg.

Det er højst tænkeligt, at man ved passende ændringer af forsøgsbetingelserne for rumforsøget ville kunne fremstille krystaller, der er store nok til laboratorieforsøg med enkeltkrystaller. En interessant mulighed ville være måling af den enkelte krystalfladers væksthastighed som funktion af opløsningens sammensætning, herunder dens overmætning. Indtil nu har det kun været muligt at bestemme den gennemsnitlige væksthastighed for alle krystalflader, idet man har været nødt til at måle på et pulver bestående af mange småkrystaller af ofte mere eller mindre ukendt form.

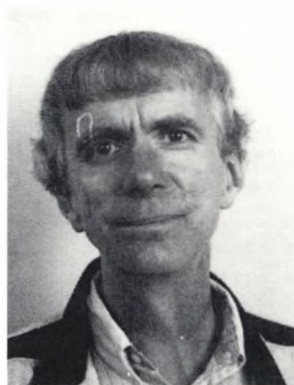
Konklusion

Af de her beskrevne forsøgsresultater fremgår det

klart, hvilken afgørende betydning vægtløshed har for størrelsen og kvaliteten af krystaller, der udskilles fra opløsning. Det, der her er opnået, ligger ganske uden for rækkevidden af normale laboratorieforsøg. Der er desuden opnået væsentlig information om krystallisationsprocessens mekanisme, hvilket der dog ikke er gjort nærmere rede for her. Det er blot beklageligt, at forsøgsomkostningerne er så høje, og at man først kan gentage et forsøg efter adskillige års forløb.

Fotografiet af krystallisatoren på Figur 3 er leveret af European Space Agency. Elektronmikrograferne på Figur 5 og Figur 6 er optaget af dr. E. I. Suvorova ved Institut for Krystallografi, Det russiske Videnskabsakademi i Moskva. De øvrige fotografier er optaget på Kemisk Institut KVL. Vi har i dette projekt haft stort udbytte af samarbejde med den russiske forskergruppe under spon-

soring af Oerlikon-Contraves, Z~rich. Desuden har vi modtaget støtte fra Rumudvalget og fra Statens naturvidenskabelige Forskningsråd.



Hans Erik Lundager Madsen er cand. scient i kemi fra Aarhus Universitet og er nu docent ved KVL. Interesserer sig for krystallisation, fortrinsvis af biologisk betydningsfulde stoffer.

COMPONENTS
SELECT CAPABILITY:
VG QUADRUPOLES
RESIDUAL GAS ANALYSIS
VACUUM GENERATORS
VG MICROTECH

Quartz makes RGA data Crystal clear

Quartz PC-driven RGAs with CrystalWindows RGA Software

Quartz Series is an integrated package of RGA instrumentation and hardware for 100, 200 or 300 amu Mass Ranges with Dual Detection available on all versions. Quartz is PC computer-driven, offering speed, flexibility and post data analysis in UHV and HV studies.

NEW CrystalWindows RGA Software uses an easy-to-operate Windows 3 platform that permits multi-tasking and access to ASCII compatible data for direct transfer into spreadsheet and graphing programs. Quartz and CrystalWindows are part of a complete range of Quadrupole RGAs.

VG QUADRUPOLES

FISONS

Instruments

*Fisons Instruments Nordic AB
Box 1176
S-171 23 SOLNA
Sweden
Tel : +46 08 730 02 95
Fax : +46 08 730 42 42*