



TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO  
TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

ANNALEENA VALLA  
HUOKOISEN KOMPOSIITIN BIOHAJOAVUUDEN ALKUVAIHEI-  
DEN ELEKTRONISPEKTROSKOOPPINEN TUTKIMUS  
Diplomityö

Tarkastajat: professori Mika Valden  
DI Leena Vuori  
Tarkastajat ja aihe hyväksytty  
Luonnontieteiden ja ympäristö-  
tekniikan tiedekuntaneuvoston  
kokouksessa 7.11.2012

## TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN TEKNILLINEN YLIOPISTO

Teknis-luonnontieteellinen koulutusohjelma

**VALLA, ANNALEENA: Huokoisen komposiitin biohajoavuuden alkuvaiheiden elektronispektroskooppinen tutkimus**

Diplomityö, 73 sivua, 10 liitesivua

Marraskuu 2012

Pääaine: Teknillinen fysiikka

Tarkastajat: professori Mika Valden ja DI Leena Vuori

Rahoittaja: Tekes – Teknologian ja innovaatioiden kehittämiskeskus

Avainsanat: Huokoinen biohajoava komposiitti,  $\beta$ -trikalsiumfosfaatti, poly(L-laktidi-co-kaprolaktoni), röntgenviriteinen fotoelektronispektroskopia, XPS, hydrolyysi

Tämän diplomityön tarkoituksena oli tutkia huokoisen komposiitin biohajoavuuden alkuvaiheita materiaalin pinnalla. Materiaalista kehitetään huokoisia, biohajoavia kudostukirakenteita lääketieteellisiin sovelluksiin. Materiaalien pinta-analyttisellä tutkimuksella pyritään selvittämään biomateriaalin pinnan rakennetta ja rakenteen muutoksia biohajoavuuden alussa. Tässä työssä tutkittu materiaali on poly(L-laktidi-co-kaprolaktoni):n  $\beta$ -trikalsiumfosfaattikomposiittia ja tutkimuksen kohteena on sekä ylikriittisellä hiilidioksidilla ( $scCO_2$ ) huokoistettuja että huokoistamattomia näytteitä. Pinta-analyttisenä tutkimusmenetelmänä on käytetty röntgenviriteistä fotoelektronispektroskopiaa (XPS) ja näytteiden biohajoaminen on toteutettu upottamalla tutkittavat näytteet suunnitelluiksi ajoiksi hydrolyysiliuokseen, joka jäljittelee biomateriaalin ympäristöä ihmiskehossa.

Varsinaisten biohajoamisen alkuvaiheiden tutkimusten lisäksi on määritetty materiaalin sopivuutta elektronispektroskooppiseen tutkimukseen sekä röntgenviriteisen fotoelektronispektroskopian vaikutuksia tutkittavan materiaalin pinnalle. Röntgensäteilyn on todettu muokkaavan materiaalin pintaa ja se on huomioitava mittauksissa, vaikka se ei merkittävästi rajoitakaan mittauksia. Työn tulosten analysoinnissa on kehitetty sovitussparametrit erottamaan kopolymerin eri monomeereista tulevat signaalit.

Tämän työn tutkimuksissa on havaittu, että materiaalin biohajoaminen hydrolyysiliuoksessa käynnistyy 2 ja 12 viikon välisenä aikana. Biohajoamisen käynnistyminen voidaan havaita hydroksyyliyhmiä suhteellisen pintakonsentraation kasvuna ja komonomeerien suhteiden muutoksena. Tulos on biomateriaalin ja biologisen ympäristön vuorovaikutuksen kannalta hyvä, koska tavoitteena on biomateriaalin biohajoamisen eteneminen kudoksen kasvun kanssa samassa tahdissa. Lisäksi pinta-analyttisissä tutkimuksissa on havaittu, että  $\beta$ -trikalsiumfosfaatti on materiaalissa kopolymerikalvon peittämänä. Tässä työssä saavutettujen tulosten avulla voidaan ymmärtää materiaalin pinnan koostumus ja biohajoaminen, ja tulosten avulla materiaalin ominaisuuksia voidaan parantaa entistä biofunktionalisemmiksi.

## ABSTRACT

TAMPERE UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

Master's Degree Programme in Science and Engineering

**VALLA, ANNALEENA:** Electron spectroscopy study of initial states of biodegradation of a porous composite

Master of Science Thesis, 73 pages, Appendix, 10 pages

November 2012

Major: Engineering Physics

Examiners: Professor Mika Valden and M.Sc. (Tech) Leena Vuori

Funding: Tekes – the Finnish Funding Agency for Technology and Innovation

Keywords: a porous biodegradable composite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, poly(L-lactide-co-caprolactone), X-ray photoelectron spectroscopy, XPS, hydrolysis

The aim of this Master of Science Thesis was to study initial states of biodegradation of a surface of a porous composite material. Biodegradable tissue scaffolds are developed from the composite material for the use in medical applications. Surface analytical study of composites aims to investigate surface chemical states of the biomaterial and changes in the structure at the early stages of the biodegradation. The studied material in this work is a poly(L-lactide-co-caprolactone)  $\beta$ -tricalcium phosphate composite and both porous, supercritical carbon dioxide (scCO<sub>2</sub>) treated and non-porous samples were studied. The surface analytical method used in this study was X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and the biodegradation tests of the samples were carried out by incubating the samples for predetermined times in hydrolysis solution, which simulates body fluid.

In addition to the actual initial stages of biodegradation studies the suitability of the composite for electron spectroscopy and the X-ray irradiation effects on the sample surface has been determined. It has been found that the X-ray irradiation modifies the surface of material. This must be taken into account in experiments even though it does not significantly constrain experiments. A fitting procedure for separating the signals of polylactide and polycaprolactone monomers of the copolymer was developed during analysis of the results.

In this study, it has been found that the biodegradation of studied composite begins between 2 and 12 weeks in hydrolysis. The beginning of biodegradation can be detected from the increase in the relative surface concentration of hydroxyl groups and changes in comonomer ratio. This result is significant as the rate of the biodegradation should proceed at similar rate as tissue growth on the scaffold. In addition, surface-analytical studies show that  $\beta$ -tricalcium phosphate is covered with copolymer coating. The obtained results provide understanding of the surface composition and biodegradation and the results can be used to improve the properties of the composite to more biofunctional direction.

## ALKUSANAT

Tämä diplomityön on tehty Tampereen teknillisen yliopiston Optoelektroniikan tutkimuskeskuksen Pintatieteen laboratoriossa. Haluan kiittää työni ensimmäisenä tarkastajana toiminutta professori Mika Valdenia kaikista erittäin asiantuntevista neuvoista ja ohjauksesta työn aikana sekä opiskelijaystävällisistä järjestelyistä. Työni toisena tarkastajana toimi diplomi-insinööri Leena Vuori, jota haluan kiittää asiantuntevista kommentteista ja keskusteluista kaikissa työn vaiheissa sekä kivasta työilmapiiristä ja rohkaisusta työn eri vaiheissa.

Työn rahoituksesta esitän kiitokseni Kurko - Kudoksen rakenteellinen komposiitti -projektin rahoittavalle Teknologian ja innovaatioiden kehittämiskeskukselle (TEKES). Tässä työssä tutkittavista näyttemateriaaleista kiitän Tampereen teknillisen yliopiston Biolääketieteen tekniikan laitosta ja tutkijoita Niina Aholaa ja Kaarlo Paakinahoa, joita haluan kiittää myös avusta ja vastauksista työn näytteisiin liittyvissä kysymyksissä.

Mukavasta työilmapiiristä ja avusta matkan varrella haluan kiittää kaikkia Pintatieteen laboratorion nykyisiä ja entisiä työntekijöitä, joiden kanssa olen saanut työskennellä. Erityisen kiitokseni, avusta työn suorituksessa ja opastuksesta edellisenä kesänä, haluan esittää tarkastajien lisäksi TkK Markku Hannulalle, DI Jaakko Mäkelälle, DI Harri Ali-Löytylle sekä TkT Kimmo Lahtoselle. Heidän apunsa sekä laboratoriossa että tulosten analysoinnissa on aina ollut asiantuntevaa ja pyyteetöntä.

Iso kiitos tuesta ja kannustuksesta kuuluu perheelleni, joka tuellaan on helpottanut kohtaamaan uusia haasteita. Haluan kiittää myös läheisiä kavereitani, joiden kommentit ja tuki, työn teon aikana ja kaikkina opiskeluvuosina, ovat olleet tärkeitä. Lopuksi haluan esittää kiitokseni rakkaalle kihlatulleni Jukalle, joka on kaikissa työn vaiheissa jaksanut kärsivällisesti jakaa ongelmani ja valaa uskoa minuun. Apu ja tuki ovat olleet korvaamattomia tämän diplomityön suorituksen aikana ja kaikkina menneinä yhteisinä vuosina.

Kiitos!

Tampereella 26.11.2012

Annaleena Valla  
Kaarle Halmeen katu 1 B 5  
33720 Tampere  
annaleena.valla@gmail.com

## SISÄLLYS

<b>1</b>	<b>Johdanto.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Biomateriaalin pinta .....</b>	<b>3</b>
2.1	Pinta-analyyttinen tutkimus .....	3
2.2	Vuorovaikutus biologisen ympäristön kanssa.....	4
2.3	Biomateriaalin pinta ja biohajoavuus.....	6
2.3.1	Polymeerin pinnan rakenne .....	7
2.3.2	Biohajoava polyesteri .....	9
<b>3</b>	<b>Biohajoava komposiitti .....</b>	<b>11</b>
3.1	Kopolymeeri.....	11
3.2	Komposiitti.....	15
3.2.1	Valmistus .....	16
3.2.2	Biohajoavuus .....	16
3.2.3	Huokoisuus .....	18
3.2.4	Hydrolyysi .....	19
<b>4</b>	<b>XPS pinta-analyyttisenä tutkimusmenetelmänä .....</b>	<b>20</b>
4.1	Valosähköinen ilmiö .....	20
4.2	XPS-menetelmä.....	22
4.2.1	Toimintaperiaate .....	23
4.2.2	Röntgenlähde .....	24
4.2.3	Fotoelektronin emissio.....	25
4.3	XPS-menetelmä pinnan tutkimuksessa .....	27
4.3.1	XPS:n pintaherkkyys .....	27
4.3.2	Elektronin kulkeutuminen materiaalissa.....	29
4.4	Fotoelektronin energian analysointi ja spektrit .....	30
4.4.1	Energia-analysaattorit .....	30
4.4.2	Yleisspektri .....	31
4.4.3	Tarkkuusspektrit .....	33
4.5	Eristävän näytteen mittaus .....	34
4.6	Huokoisen näytteen mittaus .....	35
<b>5</b>	<b>Tutkimusten suoritus .....</b>	<b>37</b>
5.1	Tutkittavat materiaalit .....	37
5.2	Multilab-laitteisto.....	38
5.3	Mittausten vaikutus ja emissioikulman valinta .....	40
5.3.1	Tyhjiön vaikutus näytteen pintaan.....	40
5.3.2	Mittausten vaikutus näytteen pintaan .....	43
5.3.3	Emissioikulman määrittäminen.....	44

5.4	Suoritetut mittaukset .....	45
5.5	Sovitusparametrien haku .....	47
<b>6</b>	<b>Tutkimustulokset .....</b>	<b>54</b>
6.1	Biohajoavan komposiitin pinta lähtötilanteessa.....	54
6.2	Hydrolyysiajan vaikutus.....	57
6.2.1	Kalsiumin suhteellinen pintakonsentraatio .....	57
6.2.2	Komonomeerien suhteelliset osuudet .....	58
6.2.3	Hydroksyyliyhmiin suhteellinen pintakonsentraatio .....	60
6.2.4	Alkuaineiden suhteelliset osuudet .....	62
6.3	Työn tulosten vertailu muihin tutkimuksiin.....	64
<b>7</b>	<b>Yhteenveto .....</b>	<b>66</b>
	<b>Lähteet.....</b>	<b>68</b>
	<b>Liite A: Tarkentavia taulukoita.....</b>	<b>74</b>
	<b>Liite B: Pinnan muutos röntgensäteilyn vaikutuksesta .....</b>	<b>75</b>
	<b>Liite C: Yleisspektrejä .....</b>	<b>77</b>
	<b>Liite D: Hiilen tarkkuusspektrit .....</b>	<b>78</b>
	<b>Liite E: Hapen tarkkuusspektrit .....</b>	<b>81</b>

## LYHENTEET JA MERKINNÄT

AES	Auger-elektronispektroskopia (Auger Electron Spectroscopy)
AL, $\lambda$	Vaimenemissyvyys (Attenuation Length)
at-%	Atomiprosenttiosuus
$\beta$ -TCP	$\beta$ -trikalsiumfosfaatti
$C_X$	Alkuaineen suhteellinen konsentraatio
$d$	Informaatiosyvyys
$E_B$	Sidosenergia
$E_f$	Yksittäisen sähkömagneettisen värähtelijän energia
$E_F$	Fermi-energia
$E_g$	Energia-aukko
$E_{kin}$	Kineettinen energia
ESCA	XPS-menetelmän alkuperäinen nimitys (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis)
eV	Energian yksikkö, elektronivoltti, $1 \text{ eV} \approx 1,602 \cdot 10^{-19} \text{ J}$
$E_{vac}$	Potentiaalienergia, kun ympäristön vuorovaikutus voidaan arvioida mitättömäksi
FAT	Vakioläpäisyenergiamoodi (Fixed Analyser Transmission)
FEAL	Latauskammio (Fast Entry Air Lock)
FRR	Vakiohidastussuhdemoodi (Fixed Retarding Ratio)
FWHM	Puoliarvonleveys (Full Width Half Maximum)
$h$	Planckin vakio, $h \approx 6,6260 \cdot 10^{-34} \text{ Js} \approx 4,1357 \cdot 10^{-15} \text{ eVs}$
HSA	Puolipalloanalyysointilaite (Hemispherical Analyser)
$I$	Intensiteetti
$I_0$	Vaimentumaton intensiteetti
IMFP	Epäelastinen vapaamatka (Inelastic Mean Free Path)
$I(z)$	Intensiteetti syvyydeltä $z$
$K\alpha$	Karakteristisen röntgensäteilyn spektriviiva
$K\beta$	Röntgenlähteen valenssitilojen relaksaation aiheuttama spektriviiva
K, L, M	Pääkvanttilukuja 1, 2 ja 3 vastaavien elektronikuorten merkintätapa
$L_1, L_2, L_3$	L-kuoren eri energiatiloja
M1, M2	Monomeerit 1 ja 2
m-%	Massaprosenttiosuus
mol-%	Mooliprosenttiosuus
$n$	Ainemäärä
n-p	Huokoistamaton (non-porous)
p	Huokoinen (porous)
$p_{1/2}, p_{3/2}$	Sivukvanttilukua 2 vastaavien silpoutuneiden energiatilojen merkintätapa
PCL	Polykaprolaktoni
PDLA	Poly(D-laktidi)
PDLLA	Poly(DL-laktidi)

PLCL	Poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni)
PLLA	Poly(L-laktidi)
$S$	Sensitiivisyyskerroin
scCO <sub>2</sub>	Ylikriittinen hiilidioksidi (supercritical carbon dioxide)
SEM	Pyyhkäiselektronimikroskooppi (Scanning electron microscope)
s, p, d	Sivukvanttilukuja 1, 2 ja 3 vastaavien elektronikuorten orbitaalien merkintätapa
STM	Tunnelointimikroskopia (Scanning Tunneling Microscopy)
TGA	Termogravimetrinen analyysi (thermogravimetry analysis)
XPS	Röntgenviriteinen fotoelektronispektroskopia (X-ray Photoelectron Spectroscopy)
$z$	Syvyys näytteen pinnalta mitattuna
$\theta$	Elektronien emissiokulma suhteessa näytteen normaaliin
$\nu$	Sähkömagneettisen säteilyn taajuus
$\mu$ -CT-kuva	Mikro computed topography -kuva
$\phi$	Työfunktio
$\phi_{sp}$	Spektrometrin työfunktio



# 1 JOHDANTO

Biohajoavat polymeeripohjaiset materiaalit ovat viimeisellä vuosikymmenellä olleet merkittävässä asemassa kudosteknologian sovelluksissa. Esimerkiksi luun vaurioituessa voi parantuminen ennalleen vaatia leikkauksen, jossa vioittunutta luuta tuetaan ja korjataan väliaikaisella kudostukirakenteella. Kun lisätty kudostukirakenne on hoitanut tehtävänsä ja vaurioitunut luu on parantunut, voidaan väliaikainen rakenne poistaa. Työnsä tehneen tukirakenteen poistaminen voi vaatia uuden leikkauksen ja siitä toipumisen. Jotta jälkimmäinen kipua aiheuttava leikkaus voidaan välttää, on kehitetty materiaaleja, jotka hajoavat samassa tahdissa niiden pinnoille kasvavan uuden kudoksen muodostumisen kanssa. Tehtävän täytettyään ja ihmisen toivuttua synteettinen kudostukirakennemateriaali on hajonnut myrkyttömiksi lopputuotteiksi, jotka ovat poistuneet kehosta luonnollisia teitä. Lisäksi synteettisen materiaalin hyvä biofunktionaalisuus voi nopeuttaa parantumista. [1, 2]

Hyvin toimiva kudostukirakenne on mekaanisilta ominaisuuksiltaan tehtävänsä sopiva ja ihmiskeholle täysin haitaton. Lisäksi materiaalin on oltava bioyhteensopiva, jolloin vuorovaikutus biologisen ympäristön kanssa etenee solujen tarttumiseen asti. Tämäkään ei riitä, hyvän kudostukirakennemateriaalin on oltava myös biofunktionaalinen, jotta se edistää solujen erilaistumista sovelluksen kannalta tärkeään suuntaan. Synteettisen materiaalin pitää muistuttaa luonnollista materiaalia ja olla esimerkiksi läpihuokoinen, jotta solut voivat tarttua kauttaaltaan materiaaliin. Näiden kaikkien tarpeellisten ominaisuuksien lisäksi biohajoava kudostukirakenne hajoaa muodostamatta haitallisia tai myrkyllisiä lopputuotteita. Tällaisen ideaalisen synteettisen kudostukirakenteen avulla ihmiskeho voi korvata oman vaurioituneen kudoksen. [1]

Lista hyvin toimivan kudostukirakenteen ominaisuuksista on pitkä ja vaativa. Materiaalien kehitys on kuitenkin pitkällä ja vaatimukseen voidaan vastata. Esimerkiksi polymeereistä polyesterit ovat biohajoavia ja useimmat myrkyttömiä. Lisäksi niiden biohajoaminen tapahtuu reaktiossa veden kanssa, joten ne voivat hajota myös biologisessa ympäristössä. Yhden yksittäisen polyesterin ominaisuudet eivät kuitenkaan riitä täyttämään kaikkia vaatimuksia. Yksittäisen polyesterin ominaisuuksia voidaan muokata yhdistämällä polymeeriketjuun myös toisen polyesterin monomeereja. Näin tuloksena saadaan kopolymeeri, jonka ominaisuuksia voidaan muokata muuttamalla komonomerisuhteita. Usein pelkkä kopolymeerikään ei ole riittävä ominaisuuksiltaan, jolloin seostamalla kopolymeeriin esimerkiksi keraamia, voidaan edelleen parantaa mekaanisia ominaisuuksia ja biofunktionaalisuutta. [2, 3]

Materiaalien reaktiot ympäristönsä kanssa tapahtuvat aina rajapinnoilla. Esimerkiksi synteettisen kudostukirakenteen vuorovaikutus biologisen ympäristön kanssa tapahtuu materiaalin pinnalla. Tällöin pinnan on vastattava ympäristön haasteisiin. Materiaalin ominaisuuksien ja biofunktionaalisuuden ymmärtämiseksi on ymmärrettävä materiaalin pinnan suuri merkitys vuorovaikutuksessa. Kun pinnan kemiallinen ja fyysinen

rakenne tunnetaan ja pinnalla tapahtuvat ilmiöt materiaalin ja ympäristön välillä ymmärretään, voidaan materiaalin ja ympäristön vuorovaikutusta ohjata muokkaamalla pintaa. [4, 5]

Pintailmiöt tapahtuvat pinnalla usein vain uloimpien atomikerrosten vuorovaikutuksessa ympäristön kanssa. Pintatieteen tutkimus vaatii materiaalin pinnasta tulevan signaalin erottamisen sisäfaasin signaalista. Tässä työssä tutkittiin biohajoavan komposiitin pinnalla tapahtuvia muutoksia biohajoamisen alkuvaiheissa. Tutkimusmenetelmänä käytettiin röntgenviritteistä fotoelektronispektroskopiaa, jonka pintaherkkyys perustuu materiaalista emittoituvien fotoelektronien lyhyeen elastisesti kulkemaan matkaan. Valosähköisen ilmiön mukaan fotonin voi luovuttaa elektronille liike-energiansa, jonka ansiosta elektroni voi poistua isäntäatomin vuorovaikutuksesta. Koska elektronien tilat atomin sisäkuorilla ovat kvantittuneet, emittoituvan fotoelektronin liike-energiasta voidaan selvittää elektronin alkuperäinen sidosenergia. Sidosenergian avulla voidaan määrittää pinnalla olevat alkuaineet ja niiden välinen sitoutuminen. [6-8]

Tämän työn tutkimuksen kohteena olevasta komposiittimateriaalista ja sen pinnalla mahdollisesti tapahtuvista ilmiöistä kerrotaan luvussa 2 ja 3. Luvussa 4 esitellään käytetty tutkimusmenetelmä, röntgenviritteinen fotoelektronispektroskopia, johon työn tutkimukset perustuvat. Näiden työn tutkimuksen taustalla vaikuttavien ilmiöiden ja menetelmän jälkeen käydään läpi työn tutkimuksen suorittaminen luvussa 5. Luvussa 5 on esitelty käytetty mittaustaliteisto, suoritettu mittausarja ja mittauksista tehdyt analyysit. Analysoidut tulokset ja niiden pohjalta tehdyt päätelmät on esitelty luvussa 6. Lopuksi, luvussa 7, tehdään yhteenveto työstä ja sen tuloksista.

## 2 BIOMATERIAALIN PINTA

Materiaali on vuorovaikutuksessa ympäristönsä kanssa materiaalin pinnan välityksellä, jolloin pinnan rakenteella ja ominaisuuksilla on suuri rooli materiaalin ja ympäristön vuorovaikutuksen tutkimisessa ja kehityksessä. Tietämys bioyhteensopivista materiaaleista ja niiden valmistuksesta on hyvä, joten biomateriaalien kehitys tapahtuukin lähinnä biofunktionaalisuuden osa-alueella. Pinnan fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien tietäminen on tärkeää, jotta voidaan kehittää materiaalin vuorovaikutusta ympäristönsä kanssa funktionaalisempaan suuntaan. Lisäksi pitää ymmärtää ilmiöt materiaalin pinnalla, jolloin vaikuttamalla materiaalin pinnan ominaisuuksiin, voidaan ohjata pinnalla tapahtuvia ilmiöitä ja sitä kautta myös vuorovaikutusta materiaalin ja ympäristön välillä. Tässä työssä on keskitytty huokoisen biomateriaalin biohajoavuuden alkuvaiheiden elektronispektroskooppiseen tutkimukseen. [2, 9, 10]

Biomateriaalin tarkoitus on usein korvata ihmiskehon osa tai toiminto, jolloin sen on oltava bioyhteensopiva. Bioyhteensopivuus on suhteellinen käsite ja bioyhteensopivuutta on arvioitava sen perusteella, miten hyvin biomateriaali sopii yhteen biologisen ympäristön kanssa lopullisessa sovelluksessa ja miten hyvin sovelluksen odotukset täyttyvät biomateriaalin bioyhteensopivuuden suhteen. Biologisessa ympäristössä voi toimia rakenteeltaan toisistaan täysin poikkeavia materiaaleja. Esimerkkejä yleisesti käytetyistä lääketieteen materiaaleista ovat kulta, silikonikumi, polymeerit, titaani ja alumiini. Eri käyttökohteissa korostuvat esimerkiksi erilaisten mekaanisten ominaisuuksien tarpeet, jolloin materiaalivalinta on tehtävä tarpeiden pohjalta. Tässä työssä tutkittu materiaali on kopolymeeria, jossa kahdesta erilaisesta polyesterin monomeerista koostuu polymeeriketju. Kopolymeerin mekaanisia ominaisuuksia sekä bioyhteensopivuutta ja biofunktionaalisuutta solujen kanssa on muutettu seostamalla kopolymeeriin keraamia. Materiaalia, joka koostuu kahdesta tai useammasta yhdisteestä, mutta yhdisteet erottuvat omia faaseinaan, kutsutaan komposiitiksi. Tässä työssä käytetyistä materiaaleista kerrotaan tarkemmin luvussa 3. [2, 4, 11-17]

### 2.1 Pinta-analyyttinen tutkimus

Pinnaksi määritellään usein materiaalin uloimmat kerrokset, mutta käsite pinta on myös suhteellinen. Kiinteän aineen reagoidessa kaasun kanssa vuorovaikutuksessa on usein vain aivan uloimpien atomikerrosten atomit. Toisaalta esimerkiksi sähköinen vuorovaikutus voi ulottua useiden atomikerrosten syvyyteen eristemateriaalissa. [5] Pinnan ominaisuuksien tutkimiseen vaaditaan tekniikka, jolla voidaan erottaa materiaalin uloimmista atomikerroksista tuleva signaali sisäfaasin signaalista. Pinnan tutkimuksessa näiden signaalien erottaminen on tärkeää, koska pinnan ominaisuudet eroavat koko

materiaalin ominaisuuksista. Pinnan atomien ympäristö ei ole kauttaaltaan samaa materiaalia samassa faasissa, kuten materiaalin sisällä on. Tästä johtuen pinta-atomit ovat sitoutuneet vain niille tyypillisellä tavalla eivätkä välttämättä täysin samoin kuin sisäfaasin atomit. Tämä ero sitoutumisessa aiheuttaa eroja sisäfaasin ja pinnan ominaisuuksien välille. [18]

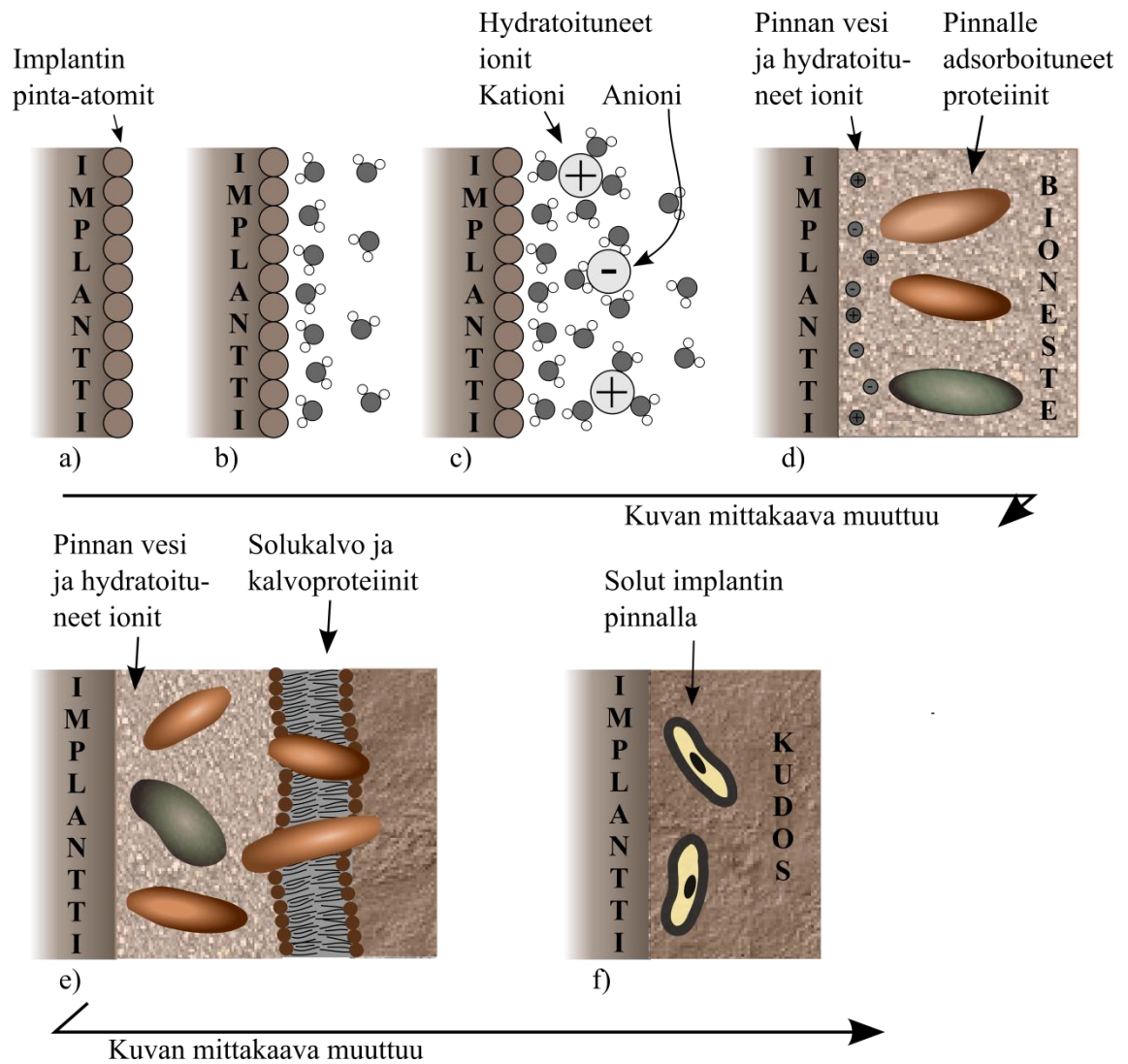
Pinnalle spesifisiä ja pinnan reaktiokykyyn vaikuttavia ominaisuuksia ovat esimerkiksi: pinnan topografia, kemiallinen koostumus, kemiallinen rakenne, atomirakenne, elektronitilat ja molekyylien välinen sitoutuminen. Tutkimusmenetelmää, jolla kaikkia edellä lueteltuja ominaisuuksia voitaisiin tutkia, ei ole. Pintatieteen tutkimukseen yhdistyykin usein monimenetelmällisyys. Tämä tarkoittaa, että saman asian tutkimiseen hyödynnetään kahden tai useamman menetelmän antamaa informaatiota. Vertailemalla eri menetelmistä saatuja tuloksia, voidaan ymmärtää pinnan käyttäytymistä syvällisemmin ja samalla varmistua, että tehdyt päätelmät ovat oikein. Menetelmät eroavat luonnollisesti toisistaan, mutta pintatieteen menetelmissä pintaherkkyys vaatii usein tutkimusolosuhteiden hallintaa. Pintaherkkyuden vaatimat hallitut mittausolosuhteet saadaan parhaiten toteutettua tyhjiöolosuhteissa. Tästä syystä useat pintatieteen menetelmät vaativatkin tyhjiölaitteiston. [10]

Biomateriaalin tutkiminen vaatii ymmärrystä biologiasta ja materiaaleista ja niiden kehittämisestä, mutta ilmiöt tapahtuvat kuitenkin faasien rajapinnoilla, jolloin pintatieteen ymmärrys on oleellinen osa kattavaa biomateriaalien ja bioyhteensopivuuden sekä funktionaalisten pintojen tutkimusta ja kehitystä. [4] Proteiinien ja solujen vuorovaikutus materiaalin kanssa tapahtuu lähinnä muutaman uloimman atomikerroksen kanssa. Tyypillisillä kemiallisilla tutkimusmenetelmillä on vaikea tutkia vain uloimpia atomikerroksia, mutta pintatieteen tutkimusmenetelmät mahdollistavat uloimpien atomikerrosten analysoinnin. [19] Tässä työssä pinta-analyyttisenä tutkimusmenetelmänä käytettiin röntgenviritteistä fotoelektronispektroskopiaa (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS, toiselta nimeltään Electron Spectroscopy for Chemical Analysis, ESCA) ja projektissa, jonka osana tämä diplomityö tehtiin, pinta-analyytiset tulokset yhdistyvät solukokeisiin, materiaalin kehitykseen ja sisäfaasista saatuihin tuloksiin. Luvussa 4 käsitellään tarkemmin työssä käytetty pinta-analyyttinen tutkimusmenetelmä.

## 2.2 Vuorovaikutus biologisen ympäristön kanssa

Biomateriaalin ja biologisen ympäristön vuorovaikutus tapahtuu faasien rajapinnalla. Kasemo *et al.* ovat artikkelissaan *Implant Surface and Interface Processes* [20] kuvanneen implantin ja biologisen ympäristön välistä vuorovaikutusta monivaiheisena. Biologinen ympäristö on monimutkainen ja ilmiöt kiinteän biomateriaalin pinnalla ovat monivaiheisia. Monivaiheisuudesta huolimatta, ja toisaalta ehkä juuri siitä syystä, pinta on ratkaisevassa asemassa vuorovaikutuksen ymmärryksessä, tutkimuksessa ja ohjauksessa. Kuvassa 2.1 on esitetty biomateriaalin pinnan, kyseisessä kuvassa esimerkkinä implantin, ja biologisen ympäristön vuorovaikutus vaihe vaiheelta. Kuvasta on huomioitava, että mittakaava muuttuu kuvasarjan aikana, koska esimerkiksi pinnan

atomit ja vesimolekyylit kuvasarjan alussa ovat eri kokoluokkaa kuin pinnalle tarttuneet edellisiin verrattuna suurikokoiset solut kuvasarjan lopussa. [20]



**Kuva 2.1:** Implantin ja biologisen ympäristön monivaiheinen vuorovaikutus rajapinnalla. Mukailtu lähteestä [20].

Lähtökohtana on puhdas implantin pinta, kuten kuvassa 2.1a on esitetty. On kuitenkin huomioitava, että implantin pinta ei säily täysin puhtaan vaan se kontaminoituu väistämättä. Tyypillisiä ilmakehästä peräisin olevia epäpuhtauksia pinnalla ovat hiilivedyt, sekä orgaaniset että epäorgaaniset rikin ja typen yhdisteet. [20] Vaikka implantin pinta kontaminoituu joka tapauksessa, vaikuttaa kontaminoitumiseen oleellisesti myös kyseinen pinta. Esimerkiksi polymeerit, jotka koostuvat tyydyttyneistä hiilivetyketjuista, reagoivat huomattavasti vähemmän kuin puhdas metallipinta, joka on reaktiivinen ja kontaminoituu siis herkemmin. Pintoja voidaan myös käsitellä, jolloin reaktiivisuuteen ja sitä kautta kontaminoitumiseen voidaan vaikuttaa. [21]

Biologiseen ympäristöön istutuksen jälkeen implantin pinta reagoi välittömästi veden kanssa. Vesi muodostaa implantin pinnalle yksi- tai kaksikerrosrakenteen, jonka

rakenne riippuu pinnan atomimittakaavan ominaisuuksista. Vesikerros on esitetty kuvassa 2.1b ja se voi muodostua kolmella erilaisella tavalla. 1) Mikäli implantin pinta on hyvin reaktiivinen, vesi dissosioituu pinnalle. 2) Vesi voi myös sitoutua molekyylinä tiukasti pintaan. 3) Mikäli pinta on hydrofobinen, vesi voi sitoutua vain heikosti siihen. Veden sitoutuminen pintaan on kohdassa kaksi vahvempaa kuin vetysidos ja kohdassa kolme heikompaa kuin vetysidos. Kohtien 1 ja 2 rakenteiden tapauksessa pinta on hydrofiilinen ja kohdan kolme rakenteen tapauksessa pinta on hydrofobinen. [20]

Kun pinnalle on muodostunut vesikerros, alkavat pintaan sitoutua myös hydratoituneet ionit. Bionesteessä on mm. kloorin ja natriumin ioneita. Kuten vesikerroksen muodostumiseen, myös ionien sitoutumiseen, vaikuttaa pinnan ominaisuudet. Hydrofiiliselle ja hydrofobiselle pinnalle muodostuu eri tavalla orientoitunut vesikerros ja myös ionien spesifinen järjestäytyminen on erilaista. Kuvassa 2.1c on esitetty hydratoituneiden ionien sitoutuminen pintaan. Kun pinnalle on muodostunut vesikerros ja siihen sisältyvät hydratoituneet ionit, alkaa pintaan adsorboitua myös kerros proteiineja. Implanttia ympäröivä bioneste sisältää lukuisia erilaisia proteiineja ja proteiinien pintaan kiinnittymistä ohjaa pinnalla oleva kerros vettä ja hydratoituneet ionit. Lisäksi proteiinkerros muuttuu koko ajan, eli pinnalta poistuu ja siihen sitoutuu uusia proteiineja jatkuvasti. Proteiinien sitoutuminen pintaan on esitetty kuvassa 2.1d. [20]

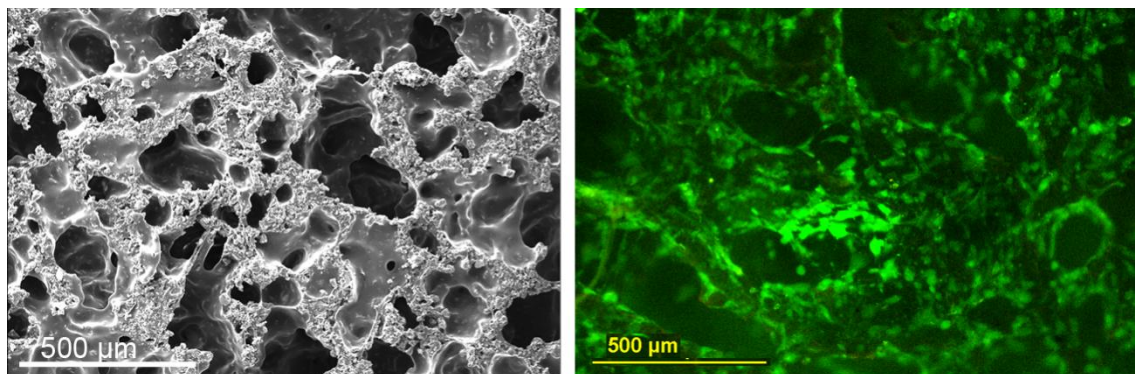
Vasta kun pintaan on muodostunut myös kerros proteiineja, on soluilla mahdollisuus tarttua siihen. Solut voivat siis vuorovaikuttaa vasta monen vaiheen jälkeen implantin pinnan kanssa. Kuvassa 2.1e on kuvattu pinnalle adsorboituneet proteiinit, sekä solukalvo ja kalvoproteiinien avulla pintaan tarttunut solu. Koska implantin pinnan atomaariset ominaisuudet ohjaavat vesikerroksen muodostumista, joka vaikuttaa muodostuneeseen ionikerrokseen ja sitä kautta muodostuneeseen proteiinkerrokseen, voidaan huomioda, että monivaiheisuudesta riippumatta pohjalla olevan pinnan atomaarisilla ominaisuuksilla on vaikutus pinnalle tarttuviin soluihin. Vaikuttamalla implantin pintaan voidaan ohjata lopulta myös solujen kiinnittymistä. Lopullinen tilanne solujen tarttumisesta pintaan on esitetty kuvassa 2.1f. [20]

### 2.3 Biomateriaalin pinta ja biohajoavuus

Useiden pinta-analyttisten tutkimusmenetelmien vaatima tyhjiö asettaa tiettyjä rajoituksia mitattaville pinnoille. Esimerkiksi kudoksen peittämää biomateriaalin pintaa on vaikea mitata ja se vaatii erityisjärjestelyjä. Tässä työssä tutkituissa näytteissä ongelmaa tyhjiön kanssa ei ollut, koska näytteet olivat kopolymeerin ja keraamin muodostamaa komposiittia ja tutkittiin näytteiden biohajoavuuden alkuvaiheita. Diplomityön tutkimus liittyy laajempaan tutkimusprojektiin, jossa kehitetään mm. kudostukirakennetta, joka soveltuisi korvaamaan luuta ihmiskehossa. Kehitettävän materiaalin tulee hajota täydellisesti samalla, kun ihmiskeho muodostaa oman luusolukon synteettisen kudostukirakenteen pinnalle ja lopulta koko synteettisen materiaalin tilalle. Pinta-analyttisellä menetelmällä tutkitaan biohajoavassa komposiitissa tapahtuvia muutoksia biohajoavuuden alkuvaiheissa.

Biomateriaalin on oltava ominaisuuksiltaan sopiva niin mekaanisesti, fyysisesti kuin kemiallisestikin, jotta se voi korvata jonkin osan esimerkiksi ihmiskehosta. Tämän lisäksi se ei saa aiheuttaa ei-toivottuja reaktioita biologisessa ympäristössään. Tällöin sisäfaasin ominaisuuksien lisäksi rajapinnan ominaisuudet ovat todella oleellisia hyvin toimivassa biomateriaalissa. [12, 22] Pinnan fysikaalisten ja kemiallisten ominaisuuksien lisäksi pinnan mikrotopografia vaikuttaa pinnan ja ympäristön vuorovaikutukseen. Topografian piirteet, jotka ovat pintaan adsorboituvan partikkelin kokoluokkaa, vaikuttavat erityisesti adsorboituvan partikkelin ja pinnan vuorovaikutukseen. Proteiinien, jotka ovat yleisesti pienempiä kuin 40 nm, ja pinnan vuorovaikutukseen vaikuttavat proteiinien kanssa samaa kokoluokkaa olevat pinnan piirteet kuten kuopat, ulokkeet ja askelmat. Vastaavasti solun, jonka kokoluokka on 20  $\mu\text{m}$  tai vähemmän, ja pinnan vuorovaikutukseen vaikuttavat suuremmat pinnan muodot, koska solu on kooltaan proteiinia isompi. [11, 20]

Kuvassa 2.2 vasemmalla on SEM-kuva (Scanning electron microscopy, SEM, pyyhkäisyelektronimikroskoopi), jossa on esimerkkinä materiaali, jollaista vastaavalle materiaalille on tehty pinta-analyyttistä tutkimusta tässä työssä. Rinnakkaisilla näytteillä tutkitaan solujen kiinnittymistä ja selviytymistä materiaalin pinnalla samoissa aikapisteissä. Aikuisen rasvan kantasolujen elämistä on kuvannettu värjäyksen avulla kuvassa 2.2 oikealla. Kuvassa vihreänä kuvantuvat elävät kantasolut ja punaisena kuolleet, joita ei kyseissä kuvassa havaita.



**Kuva 2.2:** Vasemmalla SEM-kuva työssä tutkittua materiaalia vastaavalta materiaalilta ja oikealla kuva samalla materiaalilla kasvavista ihmisen rasvan kantasoluista. [23]

Pinta-analyyttisellä tutkimuksella ja solututkimuksella saatuja tuloksia voidaan vertailla, koska aikapisteet, joissa tutkimuksia tehtiin, valittiin samoiksi. Lisäksi materiaalit olivat samat. Vertailun avulla saadaan kokonaisvaltaisempi kuva biohajoavuudesta, bioyhteensopivuudesta ja biofunktionaalisuudesta kuin saataisiin vain yhdenlaisella tutkimuksella.

### 2.3.1 Polymeerin pinnan rakenne

Polymeerien ominaisuudet ja myös pintaominaisuudet ovat materiaalille hyvin yksilölliset ja eroavat kiderakenteisen materiaalin (esim. metalli) ominaisuuksista sekä sisäfaa-

sin että pinnan osalta [15]. Polymeerin sisäfaasin tiheys on ominaisuus, joka saattaa tiettyissä tapauksissa vaikuttaa polymeerin pinnan rakenteeseen. Sisäfaasin tiheyttä voidaan säädellä muuttamalla polymeerin molekyyli­massaa, eli polymeeriketjun pituutta. Polymeerin molekyyli­massa vaikuttaa koko polymeerin sisäfaasin järjestäytymiseen. Esimerkiksi korkean molekyyli­massan polyeteenin järjestäytyminen sisäfaasissa on suurempaa kuin matalan tiheyden polyeteenin sisäfaasin järjestäytyminen. Näiden sisäfaasin erojen innoittamana on tutkittu pinnan järjestäytymistä ja on todettu, että matalan tiheyden polyeteenin pinta koostuu mutkittelistavista polymeeriketjuista, jotka ovat enemmän tai vähemmän yhdensuuntaisia. Toisaalta korkean molekyyli­massan polyeteenin pinta on järjestäytynyt kiteiseksi rakenteeksi. [15] Yleistäen voidaan siis todeta, että polymeerimateriaalin sisäfaasin tiheys saattaa vaikuttaa pinnan rakenteeseen.

Polymeeriketjun taktisuus on stereoisomerian yksi laji. Stereoisomeria on isomerian luokka, jossa kahden isomeerin sidokset ovat samat, mutta sidosten suuntautuminen on erilaista isomeerista riippuen. Taktisesti erilaisissa polymeeriketjuissa sivuryhmien suuntautuminen on erilaista. Erot taktisuudessa voivat vaikuttaa polymeerin pinnan ominaisuuksiin. Mikäli tietty ryhmä sijoittuu vuorottain molemmiin puolin polymeeriketjua, kyseessä on syndiotaktinen rakenne. Isotaktisessa polymeeriketjussa esimerkiksi metyyli­ryhmä on sijoittunut aina samalle puolelle ketjua. Isotaktisuutta esiintyy usein korkean kiteisyyden polymeereilla, joilla sisäfaasin tiheys on suuri. Ataktisessa polymeeriketjussa sivuryhmä sijaitsee satunnaisesti molemmiin puolin polymeeriketjua. Polymeerin, jossa on ataktinen rakenne, kiteisyysaste on huomattavasti pienempi kuin polymeerilla, jolla on isotaktinen rakenne. [15, 21 s.1041]

Erot polymeeriketjun taktisuudessa aiheuttavat eroja myös ketjun muuhun avaruudelliseen rakenteeseen. Jotta taktisuuteen liittyvien sivuryhmien väliset vuorovaikutukset optimoituisivat, polymeeriketju saattaa hakeutua esimerkiksi kierteiseen rakenteeseen tai siksakrakenteeseen. Taktisuudesta ja sen aiheuttamasta polymeeriketjun avaruudellisesta rakenteesta johtuen tietyt sivuryhmät saattavat suuntautua polymeerin ja esimerkiksi kaasun rajapinnalle. Tällöin kyseisiä sivuryhmiä on mahdollisesti havaittavissa pinta-analyttisessä tutkimuksessa sisäfaasin koostumuksen antamaa hypoteettista määrää enemmän pinnalla. [15, 21 s.1041]

Polymeerin sivuryhmien esiintyminen pinnan ja sisäfaasin välillä voi vaihdella myös muista kuin taktisuudesta riippuen. Polymeeriketju saattaa järjestäytyä siten, että tietty sivuryhmä suuntautuu kohti rajapintaa. Tällöin kyseessä on sivuryhmän segregatio. Sivuryhmän segregatio on seurausta polymeerin energian minimoimisesta, koska sivuryhmät järjestäytyvät mielellään kauas samanlaisista ryhmistä ja niiden lähekkäin saattaminen ja pitäminen vaatii energiaa. Toisaalta segregatio on myös pinnan energian minimoimista. Esimerkiksi pinnan energia voi pienentyä, kun hydrofobinen sivuryhmä suuntautuu kohti rajapintaa ja toista faasia. Aivan kuten sivuryhmät, myös polymeeriketjun pääteryhmät ovat itse ketjusta erottuva ja polymeerin ominaisuuksiin vaikuttava seikka. Polymeeriketjun pääteryhmät saattavat myös suuntautua kohti pintaa, jolloin niiden pintakonsentraatio on suurempi kuin sisäfaasin konsentraa-



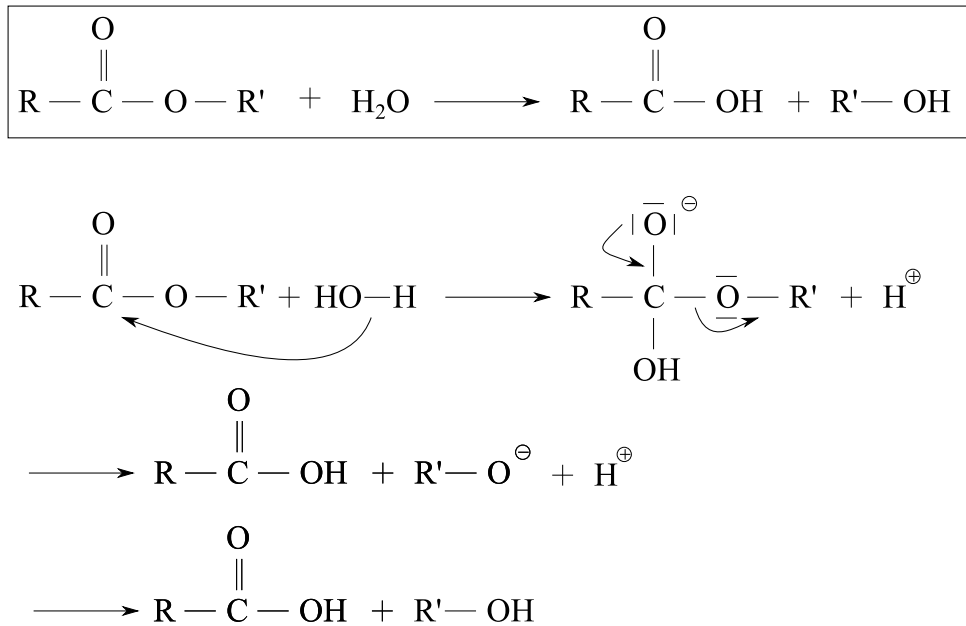
tion pohjalta tehty hypoteesi. Sivu- ja pääteryhmät erottuvat itse polymeeriketjusta ja niillä on usein selvä vaikutus polymeerin ominaisuuksiin. [15]

Polymeerista koostuvaa materiaalia voidaan seostaa myös muilla materiaaleilla. Seosaineen pienikin osuus sisäfaasin koostumuksesta voi muuttaa pinnan ominaisuuksia tai näkyä radikaalina muutoksena pinnan seossuhteissa. Toisaalta myös päinvastainen tilanne on mahdollinen. Tällöin sisäfaasin koostumuksen antamaa hypoteettista pinta-koostumusta lisätyn seosaineen osalta ei havaita. Seosaineen osuus ja käyttäytyminen riippuu paljon myös käytetystä yhdisteestä ja tavasta, jolla seostus on tehty. [15] Tässä työssä tutkittua kopolymeeria on seostettu keraamilla ja keraamin esiintymiseen pinnalla on kiinnitetty huomiota tulosten analysointivaiheessa. Käytetty kopolymeeri koostuu kahden esterimonomeerin muodostamasta polymeeriketjusta ja keraami on trikalsiumfosfaattia. Tämän työn materiaaleista kerrotaan tarkemmin luvussa 3.

### 2.3.2 Biohajoava polyesteri

Polymeereja, joiden monomeerit ovat estereitä, kutsutaan polyestereiksi. Polyesterit ovat vahvoja ja kestäviä, joten ne ovat usein ominaisuuksiltaan lääketieteen sovelluksiin sopivia. Lisäksi esteriryhmän kemiallisen rakenteen ansiosta, polyesterit voivat hajota reagoidessaan veden kanssa. Tämä tarkoittaa, että hajoaminen voi tapahtua myös biologisessa ympäristössä, jolloin puhutaan biohajoavuudesta. Biomateriaalien biohajoavuus on ominaisuus, jonka avulla säästetään resursseja. Esimerkiksi haavan ompeleiden poistamista ei vaadita, kun lanka hajoaa sopivan ajan kuluttua tehtävänsä täytettyään. Tässä työssä kehitteillä olevat kudostukirakenteet, korvaavat esimerkiksi ihmiskehon vaurioituneen osan ja toimivat tukena samalla mahdollistaen uuden kudoksen kasvun. Biohajoava kudostukirakenne toimittaa alussa ihmiskehon osan tehtävää, mutta samalla se tarjoaa ihmiskehölle mahdollisuuden kasvattaa synteettisen materiaalin tilalle omaa kudosta. Synteettinen kudostukirakenne hajoaa samalla, kun keho korvaa sen uusiutuneella omalla rakenteella. Tällöin synteettistä materiaalia ei tarvitse poistaa leikkaamalla. [14]

Esterin hajoaminen tapahtuu aina veden läsnä ollessa, mutta hajoamista voidaan nopeuttaa katalyyteillä, esimerkiksi hapolla tai emäksellä. Kuvassa 2.3 on esitetty esterin hajoamisen mekanismi. Esteri hajoaa alkoholiksi ja karboksyylihapoksi. Kuvasta 2.3 voidaan havaita, että hydroksyyli-ioni vuorovaikuttaa karbonyyliryhmän hiilen kanssa. Muodostuu epästabiili tetraedritila, jonka seurauksena esteriryhmä hajoaa ja muodostuu karboksyylihapo. Alkoksidi-ioni, eli irronnut hiiliketju ja happi, reagoivat protonin kanssa ja muodostuu alkoholi. Kun kyseessä on esterin sijaan polyesteri, on hajoamismekanismi täysin sama, mutta lopputuotteena on kaksi lyhempää polyesteriketjua. Lopulta polyesteri hajoaa oligomeereiksi, joissa monomeereja on vain muutama, tai jopa monomeereiksi asti, ja nämä pilkkoutuneet osat poistuvat luonnollista tietä kehosta. Polyesterit ovat lääketieteen sovellusten kannalta hyviä biohajoavien komponenttien materiaaleja, koska hajoamistuotteista mikään ei ole ihmiskehölle haitallista. Hajoaminen saadaan siis aikaan biologisessa ympäristössä ja lisäksi hajoamisessa ei muodostu biologiselle ympäristölle haitallisia tuotteita. [14]



**Kuva 2.3:** Laatikossa on esitetty esterin hajoaminen ja alapuolella mekanismi sekä välitilat, joita hajoamisessa muodostuu. Mukailtu lähteestä [14].

Tässä työssä tutkitaan polyesterimateriaaliin perustuvan kudostukirakenteen biohajoavuuden alkuvaiheita pinta-analyyttisellä menetelmällä. Työssä tutkittu kopolymeri koostuu kahdesta eri polyesteristä, polylaktidista ja polykaprolaktonista. Kahden eri polyesterin hajoamisen mekanismi on sama, mutta hajoamiseen kuluvaan aikaan vaikuttaa polyesterin kemiallinen rakenne, kuten hiiliketju pituus ja sivuryhmien määrä sekä laatu. Seuraavassa luvussa 3 käsitellään työssä tutkitut materiaalit yksityiskohtaisemmin ja samalla esitellään niiden biohajoavuusominaisuuksia.

### 3 BIOHAJOAVA KOMPOSIITTI

Komposiittimateriaalissa on kaksi tai useampia aineita, jotka vaikuttavat yhdessä, mutta erottuvat omina faaseinaan materiaalissa. Yhdistämällä eri aineita voidaan muuttaa ja parantaa kokonaisuuden ominaisuuksia, kuten kestävyyttä ja yhteensopivuutta solujen kanssa. [17] Tässä työssä tutkittu komposiitti koostuu kopolyesteristä ja keraamista.

#### 3.1 Kopolymeeri

Kahdesta eri monomeerista koostuvaa polymeeriketjua kutsutaan kopolymeriksi. Kuvassa 3.1 on selvennetty kopolymerien rakennetta. Vertailun vuoksi kuvassa 3.1a on esitetty myös polymeerien seos, joka on siis kopolymeereista rakenteeltaan täysin eroava. Polymeerien seoksessa on kahdenlaisia polymeeriketjuja samassa materiaalissa ja molempien polymeerien polymeeriketjut koostuvat omanlaisistaan monomeereista. Kopolymerissa samassa polymeeriketjussa on kahden tai useammanlaisia monomeereja.



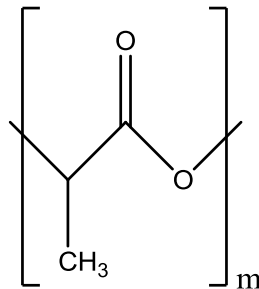
**Kuva 3.1:** Erilaisten kopolymerien rakenne ja vertailuna myös kahden polymeerin seos. M1 ja M2 viittaavat monomeereihin 1 ja 2, joista kopolymerit muodostuvat. a) kahden polymeerin seos, b) vuorotteleva kopolymeeri, c) lohkokopolymeeri ja d) haarautunut kopolymeeri.

Kopolymerin rakenteesta riippuen se voi olla tilastollinen, vuorotteleva, satunnainen, lohko- tai haarautunut kopolymeeri (engl. statistical, alternating, random, block, or graft copolymer). Tilastollisessa kopolymerissa eri monomeerien vuorottelu tapahtuu jonkin tilastollisen lain perusteella, vuorottelevassa kopolymerissa monomeerit sijoittuvat polymeeriketjussa vuorotellen ja satunnaisessa kopolymerissa monomeerit seuraavat tois-

taan satunnaisessa järjestyksessä. Näissä kaikissa kahta tai useampaa monomeeria on samassa polymeeriketjussa ja niiden vaihtelu on tiheää. Lohkokopolymeerissa polymeeriketju koostuu kyllä kahdenlaisista monomeereista, mutta yhtä monomeeria voi olla pitkä ketju ja vasta sitten toisen monomeerin muodostama pidempi polymeeriketjun osa. Haarautuneessa kopolymeerissa eri monomeerit sijaitsevat saman polymeeriketjun eri haaroissa, jolloin on myös pitkiä yhtenäisiä ketjuja tiettyä monomeeria. [21, 24] Tässä työssä tutkitaan komposiittimateriaalia, jonka matriisina toimii kopolymeeri, joka koostuu polylaktidista ja polykaprolaktonista. Työn kopolymeeri on rakenteelta lohkokopolymeeri.

### ***Polylaktidi***

Polylaktidi syntetisoidaan maitohaposta. Maitohappo on asymmetrinen eli kiraalinen molekyyli, joten maitohapolla on kaksi toisistaan eroavaa optista isomeeria: D-maitohappo ja L-maitohappo. Vastaavat polymeerit ovat poly(L-laktidi) (PLLA) ja poly(D-laktidi) (PDLA) sekä edellisten raseeminen seos poly(DL-laktidi) (PDLLA). Tässä työssä käytetyistä kopolyesterin monomeereista toinen on poly(L-laktidi), eli sen lähtötuotteena on L-maitohappo. Homogeenisena polymeerina poly(L-laktidi) on puolikiteinen, sillä on korkea ominaiskimmomoduuli, hyvä vetolujuus ja vähäinen laajeneminen. Lisäksi poly(L-laktidi) on jäykkä polyesteri. Kuvassa 3.2 on esitetty polylaktidin monomeeri. [1, 14, 25-27]



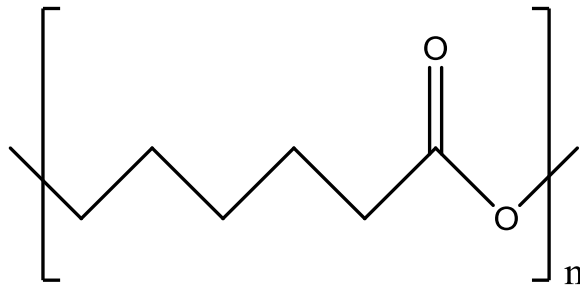
***Kuva 3.2: Polylaktidimonomeeri***

Kuten kuvastakin havaitaan, polylaktidimonomeerissa sivuryhmänä on metyyli-ryhmä, joka lisää polylaktidin hydrofobisuutta ja amorfisuuutta. Taktisuuden seurauksena metyyli-ryhmän suuntautuminen voi vaihdella suhteessa pintaan, jolloin myös koko polymeerin pintaominaisuudet voivat muuttua. Lisäksi sivuryhmän segregaaation seurauksena polymeeriketju voi kiertyä siten, että metyyli-ryhmä on kohti pintaa tai päinvastoin. Myös tällä ilmiöllä on vaikutusta polylaktidin pinnan ominaisuuksiin. Polylaktidin hajoamisaikaan vaikuttavat puolikiteinen rakenne ja metyyli-ryhmä hiiliketjun sivuryhmänä. Molemmat ominaisuudet pidentävät hajoamisaikaa, koska niiden seurauksena rakenne on tiivis ja vettä hylkivä. Mitä vähemmän kiteisyyttä rakenteessa on sitä nopeammin vesi pääsee diffundoitumaan polymeerin sisään. Lisäksi hydrofobisuus hidastaa reaktiota veden kanssa, jonka seurauksena polymeeri hajoaisi. Polylaktidin hajoamis-

aika on lyhimmillään 24 kuukautta. Polylaktidi on laajalti käytössä lääketieteen sovelluksissa kuten haavanommellangoissa, kudostukirakenteissa ja lääkeaineenkantajana. [1, 3, 14, 26, 27]

### ***Polykaprolaktoni***

Polykaprolaktoni (PCL) on sovelluksissa yleisesti käytetty ja tärkeä polymeerimateriaali. Polykaprolaktonin ominaisuuksista erityisesti osteoinduktiivinen potentiaali, eli kyky aktivoida ympäröiviä kantasoluja erilaistumaan luusolun suuntaan, hidas hajoamisnopeus, hyvät mekaaniset ominaisuudet ja lopputuotteiden myrkyttömyys edistävät polykaprolaktonin käytettävyyttä lääketieteellisissä sovelluksissa. [1] Polykaprolaktoni on homogeenisena polymeerina puolikiteinen ja sen kiteisyysaste nousee, kun molekyyli-massa pienenee eli polymeeriketjun pituus lyhenee. Kuvassa 3.3 on esitetty polykaprolaktonin monomeeri. Kaprolaktonimonomeerissa on viiden hiilen hiiliketju, jonka ansiosta polykaprolaktoni on elastinen, termoplastinen (lämpömuovattava) ja kevyt.



***Kuva 3.3: Polykaprolaktonimonomeeri***

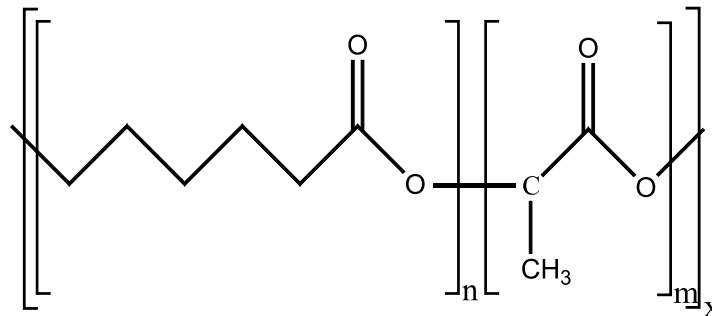
Sekä poly(L-laktidi) että polykaprolaktoni hajoavat samalla estereiden hajoamisen mekanismilla, joka on esitetty kuvassa 2.3. Polykaprolaktonin hajoamisaika on yli kaksi vuotta, mutta se riippuu myös kyseessä olevan homogeenisen polykaprolaktonin molekyylimassasta, joka vaikuttaa kiteisyyden kautta hajoamisnopeuteen. [1, 25-27]

### ***Poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni)***

Kuten aiemmin on esitelty polyesteri hajoaa hydrolyyttisesti biologisessa ympäristössä, eli se on biohajoava. Lääketieteellisissä sovelluksissa biohajoavuutta hyödynnetään, kun luonnollinen kudokse korvaa hitaassa prosessissa synteettisen biomateriaalin, jolloin biomateriaali hajoaa samalla pois. Hajoamisnopeus on biohajoavien materiaalien tärkeä ominaisuus ja erilaisilla sovelluksilla on erilaisia tarpeita hajoamisnopeuden suhteen. [1] Polyesterin hajoamisnopeuteen voidaan vaikuttaa, kun yhdistetään polymeeriketjuun kahta monomeeria. Kaikissa polyesterin monomeereissa molekyyli-rakenne on hyvin samanlainen, mutta sivuryhmät ja hiiliketjun pituus vaihtelevat. Kyseiset rakenteelliset seikat vaikuttavat kuitenkin radikaalisti lopullisen polyesterin molekyylimassaan ja kiteisyyteen, jolloin ne vaikuttavat myös polyesterin ominaisuuksiin kuten hajoamisnopeuteen. [21] Kun yhdistetään samaan polymeeriketjuun kahta eri monomeeria, saadaan

ominaisuuksiltaan uusi polymeeri. Tällöin voidaan optimoida entisestään materiaalin ominaisuuksia.

Poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni) (PLCL) polyesteriä on käytetty tässä työssä tutkituissa komposiittimateriaaleissa matriisimateriaalina eli materiaalina, jota on jatkuva faasi ja johon muita materiaaleja voidaan seostaa saavuttaen komposiittimateriaali. Työssä tutkituissa näytteissä poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni) on valmistettu suhteella 70 mol-% poly(L-laktidi):a ja 30 mol-% polykaprolaktonia. Polymeerimateriaalin valmistajan (Purac Biomaterials, Hollanti) ilmoittama lopullinen seossuhde on 69 mol-% poly(L-laktidi):a ja 31 mol-% polykaprolaktonia. Kuvassa 3.4 on esitetty poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni) rakenteen mallikuva.



**Kuva 3.4:** Mallikuva poly(L-laktidi): $n$  ja polykaprolaktonin muodostamasta kopolymerista. Kuvassa  $m$  kuvaa poly(L-laktidi): $n$  toistuvien yksikköjen määrää,  $n$  polykaprolaktonin ja  $x$  toistuvien komonomeeriyksikköjen määrää.

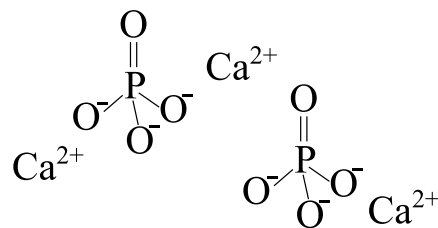
Kyseistä kopolymeria ei käytetä yhtä yleisesti kuin poly(L-laktidia) tai polykaprolaktonia itsenäisenä homogeenisena polymeerina. Kopolymerin ehdoton hyöty on kuitenkin kahden jo itsenäisestikin toimivan polyesterin hyvien ominaisuuksien yhdistyminen. Lisäksi säätelemällä monomeerien suhteita voidaan vaikuttaa ominaisuuksiin. Esimerkiksi poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni): $n$  mekaaniset ominaisuudet, kuten jäykkyys, vaihtelevat jäykästä hyvin elastiseen riippuen monomeerien suhteesta [28, katso 55]. Kuten aiemmin on kerrottu, polykaprolaktoni on osteoinduktiivinen; myös poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni) on osteoinduktiivinen ja soveltuu siten luusovelluksiin. [29, 1, 14, 17, 30]

Huolimatta poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni): $n$  lukuisista hyvistä ominaisuuksista, se on hydrofobinen, jolloin solujen kiinnittyminen on heikompaa. Tätä heikkoutta bioyhteensopivuudessa voidaan parantaa yhdistämällä poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni):iin keraamia, jolloin muodostuu komposiittirakenne. Keraamista kopolyesterin seosaineena on myös neutraloivaa hyötyä. Polyesterien hajotessa syntyy alkoholia ja karboksyylihappoa, joka happona vaikuttaa ympäristön pH-arvoon. Toisaalta happamuus voi toimia katalyyttinä hajoamisreaktiolle, mutta toisaalta siitä voi olla haittaa ympäristön kannalta. Ioniyhdisteisellä keraamilla on siis myös neutraloiva vaikutus polyesterin hajotessa. [28, 31]

### 3.2 Komposiitti

Komposiittimateriaalit tarjoavat lähes loputtomasti mahdollisuuksia materiaalin ominaisuuksien kehittämässä ja muuntelussa. Esimerkiksi polymeereja käytetään laajasti lääketieteen biomateriaaleissa, mutta usein polymeerien mekaaniset ja biofunktionaaliset ominaisuudet eivät yksin riitä. Tällöin seostamalla polymeeriin sopivaa ainetta, voidaan muokata ominaisuuksia funktionalisempaan suuntaan. Seostettavien materiaalien kirjo on laaja ja toisaalta sopivan seosaineen löytyessä ominaisuuksiin voidaan vaikuttaa radikaalistikin seossuhdetta muuttamalla. Tällä tavalla on mahdollista kehittää biomateriaalien ominaisuuksia entistä biofunktionalisemmiksi. [2, 3]

Poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni) on mekaanisilta ominaisuuksiltaan taipuisa ja joustava, tästä syystä itsenäisenä kopolyesterinä se ei sovellu tukirakenteeksi, jonka pitää kantaa painoa. Kuitenkin seostamalla poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni):iin keraamista täyteainetta, voidaan muuttaa kokonaisuuden mekaanista ominaisuutta kovempaan ja kantavampaan suuntaan. Tämän työn komposiittimateriaalissa kopolyesteriin on seostettu trikalsiumfosfaattia. Kuvassa 3.5 on esitetty trikalsiumfosfaatin ioninen rakenne.



**Kuva 3.5:** Trikalsiumfosfaatin eli TCP:n ionisen rakenteen mallikuva. Trikalsiumfosfaatin rakennekaava on  $Ca_3(PO_4)_2$ . [28, katso 1]

Trikalsiumfosfaatti on monilta ominaisuuksiltaan lähes päinvastainen polymeeri-materiaalille. Keraamit ovat yleisesti kuumuutta kestäviä, hauraita, mutta toisaalta kestäviä ja epäorgaanisia. Luonnollisen luun koostumuksessa on kalsiumin fosfaatteja, jolloin trikalsiumfosfaatin rakenteessa on samankaltaisuutta luonnollisen luun kanssa. Kalsiumfosfaatti voi hajota biologisessa ympäristössä ja se on myrkytön. Trikalsiumfosfaatilla on kaksi konformaatiomuotoa  $\alpha$ - ja  $\beta$ -muoto, joista  $\beta$ -trikalsiumfosfaatti ( $\beta$ -TCP) on parempi vaihtoehto luusovelluksiin, kun huomioidaan osteokonduktiivisuus eli luun muodostusta edistävä ominaisuus. Yksi oleellisimmista seikoista, miksi trikalsiumfosfaattia seostetaan kopolymeeriin, on kuitenkin kopolymerin hydrofobisuuden muuttuminen hydrofiiliseen suuntaan lopullisessa komposiitissa trikalsiumfosfaatin ansiosta. Poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni):n ja trikalsiumfosfaatin muodostama komposiitti muistuttaa luuta, jolloin tällaista komposiittia on luonnollista käyttää luun väliaikaisena tukirakenteena samalla, kun keho muodostaa uutta luukudosta. [28, 29]

### 3.2.1 Valmistus

Materiaalit tämän työn tutkimuksiin on valmistettu Biolääketieteen tekniikan laitoksella Tampereen teknillisessä yliopistossa, josta vastaavaa materiaalia olevia näytteitä toimitetaan myös soluviljelykokeisiin Tampereen yliopiston Biolääketieteellisen teknologian yksikköön Aikuisen kantasolujen tutkimusryhmään. Kopolymeeri on kaupallisesti tuotettu ja sen valmistaja on Purac Biomaterials Hollannissa. Keraamimateriaali, eli jauhemainen trikalsiumfosfaatti, on hankittu Plasma Biototal Ltd:ltä Isosta Britanniaasta. Lähtötilanteessa molemmat materiaalit, sekä kopolymeeri että  $\beta$ -TCP, säilytettiin jääkaapissa. [28, 29]

Komposiittimateriaali on valmistettu kaksiruuviekstruusiolla. Siinä komposiitin ainesosat syötetään lämmitettävän ekstruuderin läpi. Matriisikopolymeeria syötetään granuloina tai pulverina syöttösuppilosta ja komposiitin seosainetta jauheena kahden sivusyötön kautta. Ekstruuderiin syötettyä ainesta työnnetään eteenpäin kahden lomitain pyörivän ruuvin avulla. Ruuvien kierteisyys muuttuu ja tästä syystä sekoitettavaan materiaaliin kohdistuu kasvava paine ja leikkausjännitys, lisäksi lämpötila muuttuu ekstruuderin läpi kuljettaessa. Komposiitin matriisimateriaali, kopolymeeri, tiivistyy, sulaa ja homogenisoituu samalla kun siihen sekoittuu trikalsiumfosfaatti. Lopputuloksena suuttimesta saadaan komposiittimateriaalia sylinterin muodossa. Sylinteri voidaan leikata halutun pituisiin ja mallisiin kappaleisiin. [28, 29]

Valmis poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni):n trikalsiumfosfaattikomposiitti pitää huokoistaa, jotta rakenne olisi mahdollisimman lähellä luonnollisen luun rakennetta. Huokoistuksen aiheuttamista muutoksista rakenteeseen ja ominaisuuksiin sekä sen tarpeellisuudesta on kerrottu luvussa 3.2.3. Huokoistus tehdään ylikriittistä hiilidioksidia (supercritical carbon dioxide,  $scCO_2$ ) käyttäen. Tällöin huokoistusprosessi ei jätä materiaaliin myrkyllisiä jäämiä, jotka haittaisivat istutusta ihmiskehoon. Näytemateriaalin, joka päätyy ihmiskehoon, on oltava myös steriloitavissa. [14, 28, 29]

Biolääketieteen tekniikan laitoksella komposiittimateriaalin lopullinen koostumus on analysoitu termogravimetrinen analyysin avulla (thermogravimetry analysis, TGA). Menetelmässä materiaalin massaa mitataan ajan ja lämpötilan funktiona. Tällä tavalla voidaan selvittää lopullisessa näytemateriaalisylinterissä olevan trikalsiumfosfaatin määrä. Sylinterit, joiden trikalsiumfosfaatin määrä poikkeaa enintään kaksi massaprosenttia valmistuksessa käytetystä määrästä, on otettu myöhempään tutkimuskäyttöön. Näin ollen voidaan siis olettaa, että trikalsiumfosfaatin määrä massaprosenteissa on tämän työn näytteissä joko  $40 \pm 2$  m-% tai  $60 \pm 2$  m-% riippuen näytteestä. [28, 29]

### 3.2.2 Biohajoavuus

Biohajoavuuden oleelliset seikat lopullisen sovelluksen kannalta ovat biohajoamisen nopeus ja lopputuotteiden myrkyttömyys. Biohajoavuuden nopeuden tulee olla samaa luokkaa kuin synteettisen kudostukirakenteen tilalle muodostuvan luonnollisen rakenteen kasvunopeus. Tällöin synteettinen kudostukirakenne hajoaa ja poistuu uudel-



leen kasvaneen luonnollisen rakenteen tieltä optimaalisessa ajassa. [14] Taulukossa 3.1 on esitetty polylaktidipohjaisten materiaalien biohajoavuuteen vaikuttavat seikat.

**Taulukko 3.1:** *Polylaktidipohjaisten materiaalien biohajoavuuteen vaikuttavat seikat. Mukailtu lähteestä [32 s. 54].*

<b>Molekyylirakenne ja järjestäytyminen</b>	<b>Materiaalin muoto</b>
Molekyylimassa	Kappaleen muoto
Taktisuus	Ulottuvuudet
Monomeerirakenne	Huokoisuus
Pääteryhmät	Huokosten koko
Haarautuminen	
Kiteisyys	
Seosaineet	

Biohajoaminen on seurausta materiaalin reaktiosta veden kanssa. Tällöin biohajoamiseen vaikuttavat kaikki seikat, jotka vaikuttavat reaktioon veden kanssa. Kopolymeerin rakenne on ratkaisevassa osassa; eri monomeereilla on erilaisia ominaisuuksia, jolloin valitut monomeerit ja niiden suhde vaikuttavat suoraan reaktioon veden kanssa. Lisäksi seostettu materiaali, joka yhdessä kopolymeerin kanssa muodostaa komposiitin, voi vaikuttaa kokonaisuuden biohajoavuuteen. Myös muista rakenteeseen liittyvistä seikoista, kuten taktisuudesta, sivu- ja pääteryhmien segregatiosta ja seosmateriaalin partikkelien koosta, määrästä ja esiintymisestä, voi tulla kontribuutio biohajoamisen nopeuteen. Molekyylimassa ja polymeeriketjun haarautuneisuus vaikuttavat polymeerin sisäfaasin tiheyteen vaikuttaen samalla komposiitin, jossa polyesteri on matriisimateriaalina, biohajoamiseen. Jopa materiaalin ulkoiset muodot ja ulottuvuudet sekä huokoisuus ja huokosten koko vaikuttavat reaktioon veden kanssa. Huokoisuutta ja sen vaikutusta biohajoavuuteen on käsitelty lisää luvussa 3.2.3. [3, 32]

Kuten taulukosta 3.1 voidaan havaita, kiteisyysaste vaikuttaa biohajoavuuteen. Korkean kiteisyyden polymeerien hiiliketjut ovat järjestäytyneet, jolloin vesi ei pääse tunkeutumaan järjestäytyneeseen rakenteeseen yhtä helposti kuin matalamman kiteisyyden epäjärjestäytyneeseen rakenteeseen. Matalan kiteisyyden polymeerissa hajoaminen hydrolyysiliuoksessa alkaa useista kohdista materiaalia samanaikaisesti ja siten myös hajoamisprosessi on nopeampi. Polylaktidi on hyvä esimerkki biohajoavuuden eroista, jotka johtuvat pelkästään materiaalin rakenteesta kemiallisen koostumuksen ollessa sama. Puolikiteinen poly(L-laktidi) hajoaa vasta muutamassa vuodessa, kun taas raseeminen seos poly(DL-laktidi):a, joka on amorfainen, hajoaa jo 12-16 kuukaudessa. [1, 14, 33] Amorfiset osat polylaktidista ovat huomattavasti herkempiä hydrolyyttiselle hajoamiselle, kuin kiteiset osat. [32] Komposiitin seosmateriaali voi vaikuttaa biohajoamiseen vaikuttamalla esimerkiksi kokonaisuuden hydrofiilisyyteen.

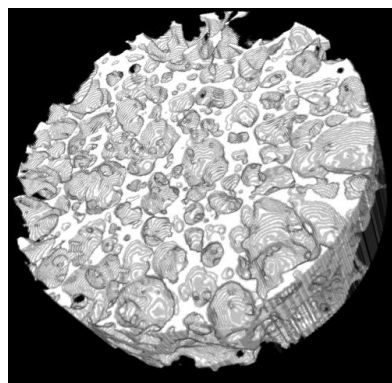
Edellä kuvatut biohajoamiseen vaikuttavat asiat ovat merkittävämpiä sisäfaasin hajoamisen kannalta. Tässä työssä tutkittiin biohajoavuutta materiaalin pinnalla, jolloin

esimerkiksi oligomeerien ja monomeerien kulkeutumisella pois materiaalista ja veden kulkeutumisella materiaalin sisään ei ole vastaavaa merkitystä kuin sisäfaasin tapauksessa. Pinta on vuorovaikutuksessa ympäristön nesteiden kanssa välittömästi. Biohajoavuutta on tutkittu sisäfaasin osalta paljon ja tämän työn pinta-analyyttisten tulosten onnistunut vertailu muihin tuloksiin vaatii biohajoavuuden kattavan ymmärryksen.

### 3.2.3 Huokoisuus

Materiaalin, jota suunnitellaan synteettiseksi kudostukirakenteeksi ihmiskehoon, on hyvä jäljitellä mahdollisimman hyvin kehon omia vastaavia rakenteita. Tällöin synteettistä materiaalia ympäröivät solut käyttäytyvät mahdollisimman luonnollisesti ja tarttuvat materiaalin pintaan, elävät siinä ja voivat lopulta luoda kudoksen, joka korvaa synteettisen materiaalin. Luonnollinen luukudos kehossa on läpihuokoista ja tästä syystä myös synteettisen kudostukirakenteen on tarve olla läpihuokoinen. Huokoistuksella saadaan aikaiseksi suuri pinta-ala, johon solut voivat kiinnittyä. Tämä lisää solujen kiinnittymistä ja kasvua. Lisäksi bionesteen, jossa on mm. proteiineja ja soluja, on mahdollista diffundoitua huokoisen materiaalin sisään. Tällöin solujen kiinnittymistä ja kasvua tapahtuu kauttaaltaan synteettisen kudostukirakenteen tilavuudessa. Optimaalinen huokoskoko riippuu materiaalin lopullisesta käyttötarkoituksesta. Kun kehitetään materiaalia, johon halutaan kasvavan uutta luukudosta, optimaalinen huokoskoko on 100-350  $\mu\text{m}$  [34 s. 683]. [28, 34, 35]

Huokoisuuden tuottamisen yksi suurimmista ongelmista on saada materiaalin huokoisuus sopivaksi säilyttäen silti materiaalin hyvät mekaaniset ominaisuudet kuten kantavuuden. Tällaisia kudostukirakenteeksi sopivia materiaaleja on tutkittu ja kehitetty Biolääketieteen tekniikan laitoksella Tampereen teknillisessä yliopistossa. Kuvassa 3.6 on esitetty tässä työssä tutkitun huokoisen biohajoavan komposiitin rakenne mikro computed topography kuvana eli  $\mu$ -CT-kuvana. Kuvan komposiitin valmistuksessa on käytetty 40 m-%  $\beta$ -TCP:tä ja 60 m-% PLCL-kopolymeeria. Kuvassa olevan näytteen huokoisuusprosentti on 66.



**Kuva 3.6:** Mikro computed topography -kuva huokoiselta poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni):n trikalsiumfosfaattikomposiitilta, jonka valmistuksessa on käytetty 60 m-% kopolymeeria ja 40 m-% trikalsiumfosfaattia. [23]

Materiaalin huokoisuus vaikuttaa polyesterin biohajoamiseen muuttamalla keskimääräistä aikaan, jossa hydrolyysissä muodostuneet, veteen liukenevat oligomeerit ja monomeerit kulkevat materiaalista pois ja toisaalta vesimolekyylit kulkeutuvat materiaalin sisään. Polyesterin hajotessa muodostuu karboksyylihapporyhmän sisältäviä oligomeereja, eli lyhyitä polymeeriketjuja. Kun näiden siirtonopeus kasvaa, laskee niiden katalyyttinen vaikutus hydrolyyttiseen hajoamiseen, mutta toisaalta korkeampi veden siirtonopeus kohottaa hajoamisen nopeutta. Nämä kaksi toisiaan kumoavaan efektiä vaikeuttavat huokoisuuden aiheuttamien muutosten päättelemistä. On raportoitu, että huokoisen poly(L-laktidi):n hajoamisnopeus on pienempi kuin huokoistamattoman poly(L-laktidi):n. Tällöin siis katalyyttisen vaikutuksen heikentyminen laskee merkittävämmiin hajoamisnopeutta, kuin veden nopeampi diffundoituminen näyttemateriaalissa nostaisi sitä poly(L-laktidin) tapauksessa. [32, 36]

### 3.2.4 Hydrolyysi

Biohajoavan materiaalin biohajoavuuden *in vitro* –tutkimus voidaan jakaa kolmeen erillaiseen tutkimustapaan. Ensimmäinen tutkimustavoista on seurata muutoksia materiaalin mekaanisissa ja fyysisissä ominaisuuksissa. Mahdolliset muutokset johtuvat materiaalin altistamisesta fysiologiselle ympäristölle. Toisena tutkimustapana on tutkia biohajoamista kehon nestettä jäljittelevässä nesteessä (simulated body fluid, SBF). Ja kolmantena tapana tutkia biohajoamista *in vitro* –menetelmällä on soluviljely, jossa materiaali vuorovaikuttaa myös solujen kanssa. [17 s. 75] Tämän diplomityön biohajoavuuden tutkimukset perustuvat kehon nestettä jäljittelevän nesteen aiheuttamaan biohajoamiseen. Työssä tutkittuja näytteitä on pidetty suunnitellut ajat Sörensenin puskuriliuoksessa. Sörensenin puskuriliuos sisältää: 37,8 g dinatriumvetyfosfaattia ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) ja 8,25 g kaliumdivetyfosfaattia ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) viidessä litrassa tislattua vettä. Tällaisen liuoksen pH on 7,4. Lisäksi liuoksen lämpötila on pyritty pitämään ihmiskehon lämmössä eli n. 37 asteessa. Hydrolyysi on toteutettu ISO 15814 standardin mukaisesti. [29, 37]

Pinta-analyttinen tutkimus ja hydrolyysin aiheuttama biohajoaminen toteutettiin siten, että Biolääketieteen tekniikan laitoksella valmistettiin kutakin näytettä, sekä huokoistamatonta että huokoista, kaksi kappaletta jokaista haluttua aikapistettä kohti (aikapisteet: 0, 1, 3, 7, 14 ja 85 vuorokautta). Lähtötilanteen näytteet, eli näytteet, jotka mitattiin ilman puskuriliuokseen kastelua, olivat valmiit mittaukseen heti. Kaikki muut näytteet upotettiin hydrolyysiliuokseen, josta kunkin aikapisteen näytteen nostettiin pois ja huuhdeltiin, kun ne olivat olleet hydrolyysiliuoksessa suunnitellun ajan. Huuhdellut näytteet säilytettiin ruskeissa läpinäkyvissä lasipurkeissa valolta suojattuna siten, että samassa purkissa säilytettiin kaksi rinnakkaista näytettä. Lasipurkit sijoitettiin tyhjiökaappiin, josta ne noudettiin elektronispektroskooppiseen tutkimukseen. Elektronispektroskooppisen tutkimuksen vaiheet on kerrottu tarkemmin luvussa 5.

## 4 XPS PINTA-ANALYYTTISENÄ TUTKIMUSMENETELMÄNÄ

Röntgenviritteinen fotoelektronispektroskopia eli XPS on laajalti pintatieteessä käytetty tutkimusmenetelmä, joka perustuu valosähköisen ilmiöön. Valosähköisen ilmiön taustalla on se, että valon fotoneilla on liikemäärä ja energia, jonka ne voivat törmäyksessä luovuttaa. Törmätessään näytteen pinnan elektroniin fotoni luovuttaa energiansa elektronille. Mikäli elektronin fotonilta absorboima energia on riittävä irrottamaan elektroni isäntäatomin Coulombisesta vuorovaikutuksesta, voi elektroni emittoitua näytteen pinnalta. Tällöin fotonin energia kuluu elektronin irtoamiseen ja kineettiseen energiaan. Kineettinen energia, joka elektronilla on emittoitumisen jälkeen, on riippuvainen toisaalta virittävän säteilyn energiasta ja toisaalta elektronin sidosenergiasta, joka on spesifinen elektronin ympäristöön nähden. Mittaamalla elektronien kineettisestä energiasta voidaan siis päätellä kemiallinen ympäristö, josta elektroni on peräisin. Näin saadaan tietoa pinnan alkuainejakaumasta ja sidoksista. XPS-menetelmä on pintaherkä ja siten informaatio saadaan vain uloimmista atomikerroksista. [6-9, 38, 39]

### 4.1 Valosähköinen ilmiö

Heinrich Hertz huomasi valosähköiseksi ilmiöksi kutsutun tapahtuman ensimmäisenä vuonna 1887 [39]. Myös Wilhelm Hallwachs ja Joseph John Thompson tutkivat 1880-luvulla metallipinnan elektronien emittoitumista, mutta vasta vuonna 1905 Albert Einstein loi ilmiölle teoreettisen mallin. Einsteinin malli perustuu Max Planckin vuonna 1900 esittämään oletukseen, jonka mukaan valon energialla ja taajuudella on yhteys, ja yksittäisen sähkömagneettisen värähtelijän energia  $E_f$  voidaan kirjoittaa muodossa

$$E_f = h\nu. \quad (4.1)$$

Yhtälössä  $h$  on Planckin vakio ja  $\nu$  on kyseessä olevan sähkömagneettisen säteilyn taajuus. Planck oletti siis, että energia on kvantittunut ja sai tästä työstään fysiikan Nobelpalkinnon vuonna 1918. Einsteinin yhtälön mukaan valosähköisessä ilmiössä emittoituneen elektronin alkuperäinen sidosenergia  $E_B$  saadaan yksittäisen sähkömagneettisen värähtelijän energian  $E_f$  ja emittoituneen elektronin kineettisen energian  $E_{kin}$  avulla seuraavasti

$$E_B = h\nu - E_{kin}. \quad (4.2)$$

Valosähköisessä ilmiössä fotonin, eli sähkömagneettisen värähtelijän energia siirtyy elastisessa törmäyksessä elektronille, joka voi saamansa energian avulla emittoitua

aineesta. Valon ajatellaan koostuvan energiakvanteista, joita elektronit voivat absorboida. Einstein sai teoriastaan fysiikan Nobelpalkinnon vuonna 1921. [6-8, 39]

Einsteinin yhtälö ei kuitenkaan ollut vielä täydellinen, koska kiinteän materiaalin pinnan elektronien potentiaalienergioilla on erotus Fermi-energian tason  $E_F$  ja tyhjiössä irrallaan liikkuvan elektronin energiantason  $E_{vac}$  välillä. Tätä erotusta kutsutaan työfunktioiksi  $\phi$  ja se on siis pienin energia, jolla korkeimman tilan elektroni saadaan siirrettyä pinnalta tyhjiöön. Työfunktio on kiinteän materiaalin pinnan elektronirakenteen ominaisuus ja se voidaan kirjoittaa yhtälön

$$\phi = E_F - E_{vac} \quad (4.3)$$

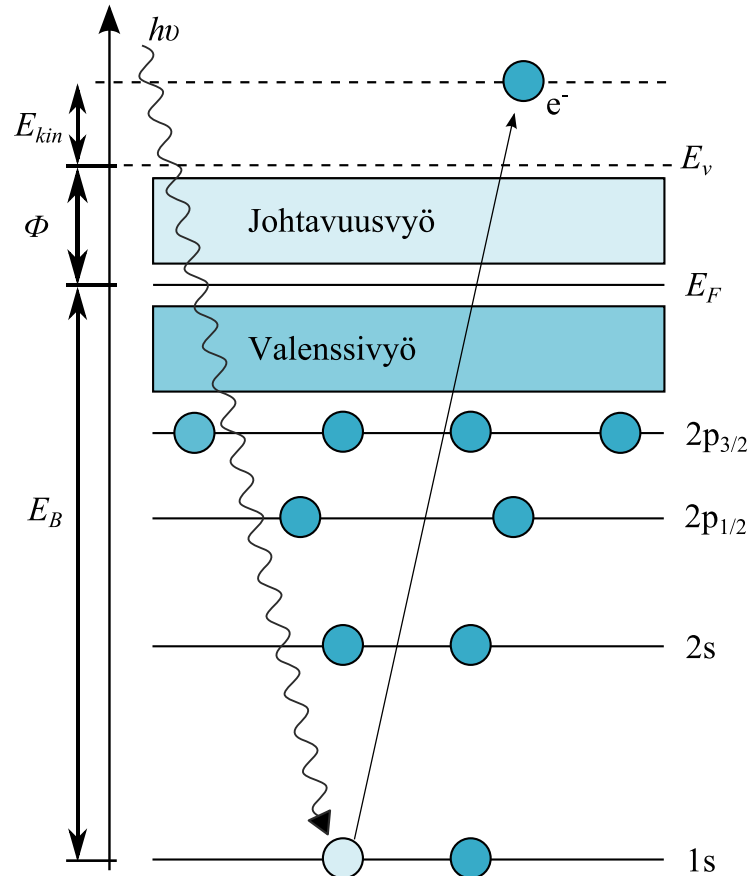
mukaisesti. Työfunktion suuruudessa on lisäksi huomioitava, että näyte on kiinni spektrometrissä ja spektrometrin työfunktio on eri kuin näytteen työfunktio ja molemmat vaikuttavat elektronin kokemaan potentiaaliin. Jotta tietyllä laitteistolla mitattuja sidosenergioita  $E_B$  voidaan verrata muilla laitteilla mitattuihin sidosenergioihin, on sidosenergiat ilmoitettava suhteessa Fermi-tason energiaan. Tällöin spektrometrin ja näytteen yhdessä tuottama työfunktio  $\phi_{sp}$  eliminoidaan kalibroimalla sidosenergiat. Kun huomioidaan työfunktio valosähköisessä ilmiössä, Einsteinin yhtälöä pitää korjata seuraavasti

$$E_B = h\nu - E_{kin} - \phi_{sp} \quad (4.4)$$

Yhtälö 4.4 kuvaa valosähköisessä ilmiössä emittoituneen elektronin sidosenergiaa. Tätä yhtälöä vastaava ja fotoemissiotapahtumaa kuvaava energiatasokaavio on esitetty kuvassa 4.1. Yhtälö 4.4 voidaan ilmaista myös kineettisenä energiana seuraavasti

$$E_{kin} = h\nu - E_B - \phi_{sp} \quad (4.5)$$

Kyseiset yhtälöt 4.4 ja 4.5 kuvaavat ideaalista tapausta, koska ne eivät huomioi elektronin emittoitumisen aikana tapahtuvia relaksaatioilmiöitä. Yhtälöissä oletetaan, että sidosenergia  $E_B$  on suoraan atomin alku- ja lopputilan energioiden välinen erotus. Tätä oletusta kutsutaan Koopman teoreemaksi. Saatuja sidosenergioita olisi mahdollista korjata ns. relaksaatioenergialla, mutta tämä ei ole tarpeen XPS-mittauksissa, koska kaikissa mittauksissa relaksaation aiheuttama virhe on saman suuruinen, myös vertailuarvoissa. [6-8, 39]



**Kuva 4.1:** Kaaviokuva dielektrisen materiaalin  $1s$ -kuorelta emittoituvan elektronin fotoemissiosta. Elektroni absorboi fotonin ja irtoaa atomista.

Edellä on kuvattu XPS-menetelmän perustan, valosähköisen ilmiön, perusperiaate ja historiaa, joka sijoittuu 1800-luvun lopulle ja 1800- ja 1900-lukujen vaihteeseen. Myös mittausmenetelmä kehittyi 1900-luvulla, mutta sen vaatima hyvä tyhjiö oli pitkään haaste luotettavien XPS-mittausten tekemiselle. Vuonna 1914 tutkittiin jo röntgenviritteistä fotoemissiota, kun Robinson ja Rawlingson mittasivat kullan fotoemissiospektrin. Heillä ei kuitenkaan ollut vielä käytössään varsinaista XPS-laitteistoa, jollaisen Kai Siegbahn rakensi ensimmäisenä 1950-luvulla. Hän nimesi menetelmän ESCA:ksi (Electron Spectroscopy for Chemical Analysis) ja sai työstään XPS:n parissa fysiikan Nobel-palkinnon vuonna 1981. [6-8, 39]

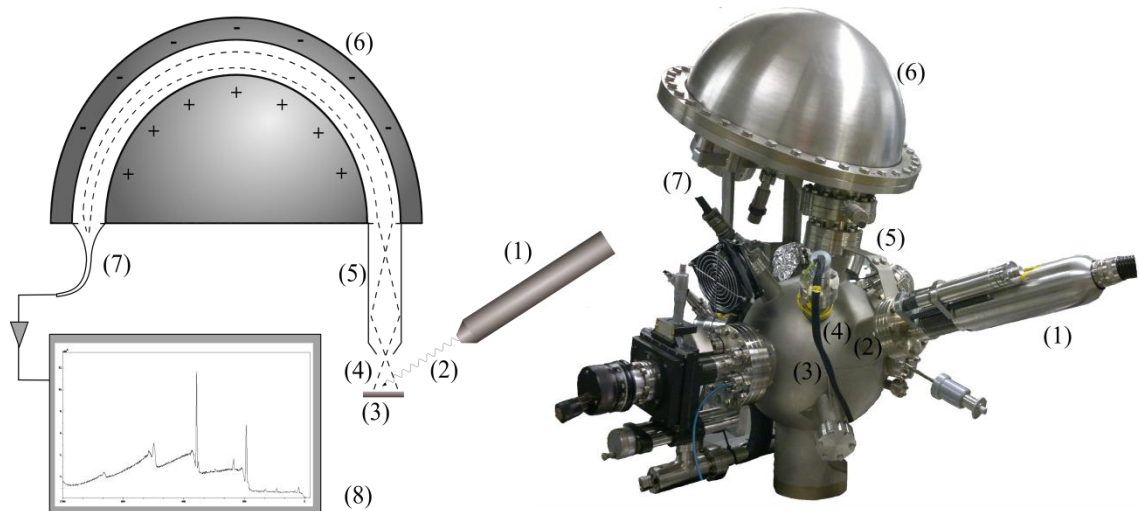
## 4.2 XPS-menetelmä

XPS-menetelmä perustuu fotonin ja elektronin väliseen vuorovaikutukseen, jossa fotoni luovuttaa kimmoisassa törmäyksessä energiansa elektronille. Elektroni voi poistua atomista, mikäli sen saama energiakvantti on riittävän suuri. Fotonin ja elektronin vuorovaikutus voi kuitenkin olla myös muunlaista kuin XPS-menetelmän kannalta oleellinen kimmoisa törmäys. Fotonin ja atomin törmäyksen seurauksena voi tapahtua jokin seuraavista kolmesta tapahtumasta: 1) fotoni kulkee elektronin ohi ilman vuorovaikutusta,

2) fotonit menettää vain osan energiastaan elektronille eli tapahtuu ns. Compton-sironta, 3) fotonit luovuttaa kimmoisassa törmäyksessä kaiken energiansa elektronille, joka emittoituu aineesta. Viimeisin edellä luetelluista kolmesta tapahtumasta on XPS-menetelmän kannalta merkittävä. [6]

#### 4.2.1 Toimintaperiaate

Kuvassa 4.2 on esitetty XPS-menetelmän toimintaperiaate mallikuvana, johon XPS-menetelmään liittyvät osat on nimetty. Lisäksi kuvassa 4.2 on valokuva työssä käytetystä laitteistosta. Röntgenlähteestä (1) kohdistetaan pintaan röntgensäteily (2), joka tunkeutuu näyttemateriaaliin (3) korkeintaan reilun mikrometrin syvyydelle. Röntgensäteilyn fotonit vuorovaikuttavat atomien elektronien kanssa ja tässä vuorovaikutuksessa elektronit voivat absorboida fotonien energiat. Absorboidun energian ansiosta elektronit voivat emittoitua atomista ja pinnalta irtoaa elektronivuo (4). Jotta lopputuloksena saadaan piirrettyä spektri, pinnalta emittoituneet elektronit kulkevat fokusoivaan linssisysteemiin (5) ja puolipalloanalyysoittoriin (6). Puolipalloanalyysoittorin jälkeen elektronit päätyvät monistinputkille (7) ja signaalia vahvistetaan. Lopulta tuloksena saadaan XPS-spektri, jossa elektronivuon intensiteetti on piirretty sidosenergian tai kineettisen energian funktiona. [8, 40, 41]



**Kuva 4.2:** XPS-mittausten periaate ja laitteisto. Kuviin on numeroitu mittausten kannalta oleelliset osat laitteistoa.

Koska XPS-menetelmä kerää mitattavan datan pinnalta emittoituneista elektroneista, on luonnollista, että elektronien on päästävä kulkeutumaan analyysoittorille. Lisäksi koska mitattu data perustuu elektronien kineettiseen energiaan, elektronien pitäisi säilyttää kineettinen energiansa muuttumattomana analyysoittorille asti. Elektronit eivät saa matkalla analyysoittorille törmätä muihin hiukkasiin ja menettää törmäyksissä kineettistä energiaa. Tämä on mahdollista vain hyvässä tyhjiössä. Vaatimus tyhjiöön tulee toisaalta myös XPS-menetelmän pintaherkkyystensä. Koska tutkimusta tehdään vain

uloimmille atomikerroksille, on toivottavaa, että uloimmat atomikerrokset ovat materiaalia, jota halutaan tutkia, eivätkä esimerkiksi epäpuhtauksia. Tyhjiö varmistaa, että näyte kontaminoituisi mahdollisimman vähän mittausten aikana. Edellä esitetyt vaatimukset mittaolosuhteille täyttyvät vain ultratyhjiöolosuhteissa, joissa paine on  $10^{-8}$ - $10^{-10}$  mbar [42]. Tässä työssä mitatut näytteet kestävät tyhjiön hyvin ja ne on valmistettu ilmakehän paineessa, joten kontaminoituminen ei ole ongelma. [8, 40-43]

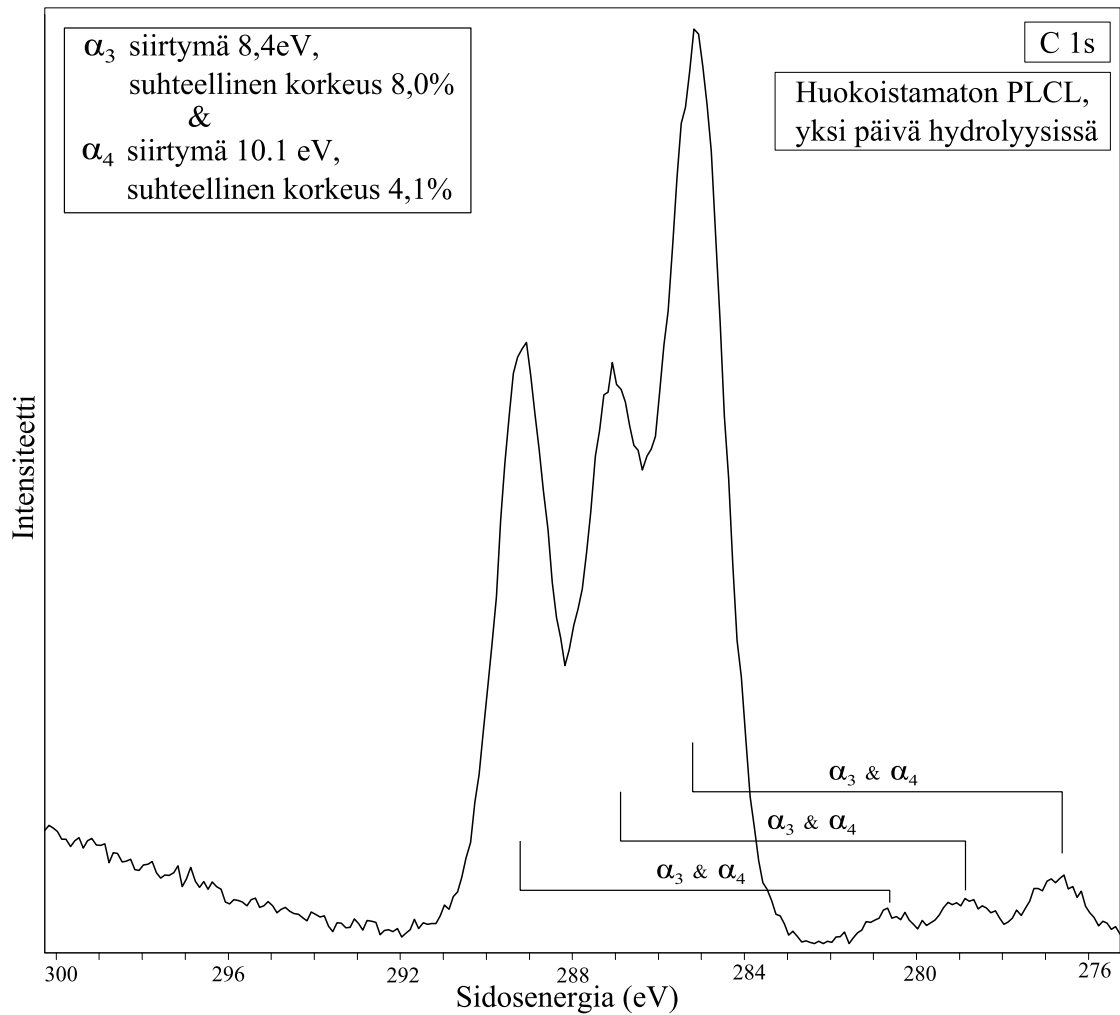
Mittauksissa saadusta spektristä voidaan tehdä kvalitatiivista tai kvantitatiivista analyysiä. Kvalitatiivisessa analyysissä spektristä tunnistetaan sen piirteet eli määritetään jokaisen piikin taustalla oleva tila/ilmiö. Tällöin saadaan tietoon pinnalla havaitut alkuaineet ja osoitetaan myös mittausten menetelmästä johtuvat spektrin muodot, kuten esimerkiksi satelliittihiikit, joista kerrotaan tarkemmin seuraavassa luvussa 4.2.2. Kvalitatiivisen analyysin lisäksi spektriä voidaan analysoida myös kvantitatiivisesti. Kvantitatiivisessa analyysissä määritetään pinnan kemiallinen koostumus. Sekä kvalitatiivisesta että kvantitatiivisesta analyysistä kerrotaan tarkemmin luvussa 4.4. [6, 8, 38, 41, 44]

#### 4.2.2 Röntgenlähde

XPS-menetelmä on nimensä mukaisestikin röntgenviritteinen, eli mittauksissa virittävänä säteilynä käytetään röntgensäteilyä. Röntgensäteily on sähkömagneettista säteilyä, jonka energia on huomattavan suuri. Röntgensäteilyä syntyy esimerkiksi atomin viritystilojen purkautumisen yhteydessä ja tällä tavalla röntgensäteilyä tuotetaan myös tässä työssä käytetyn mittaustilanteen röntgenlähteessä. Röntgensäteilyä syntyy, kun korkealla potentiaalilla kiihdytetyt elektronit törmäävät anodimateriaaliin ja irrottavat anodimateriaalin sisäkuorten elektroneja. Näiden elektronien jättämät aukot täyttyvät ylemmiltä kuorilta tulevilla elektroneilla ja näissä viritystilojen purkautumisissa vapautuu energiakvantteja, joiden energia on sisäkuorelle jääneen aukon energiatason ja sen täyttävän elektronin alkuperäisen energiatason erotus. [6-8, 41]

XPS-laitteistoissa on usein käytössä kaksoisanodi, jossa anodimateriaalin voi valita kahden alkuaineen väliltä. Useimmiten käytössä olevat anodimateriaalit ovat alumiini ja magnesium ja näiltä materiaaleilta emittoituva  $K\alpha$ -säteily. Alumiinin  $K\alpha$ -säteilyn energia on 1486,6 eV ja magnesiumin 1253,6 eV ja puoliarvonleveydet ovat 0,85 eV alumiinille ja 0,70 eV magnesiumille. XPS-mittauksissa pyritään käyttämään mahdollisimman monokromaattista säteilyä, jotta tutkittavan materiaalin kutakin tilaa vastaisi yksi piikki spektrissä. Käytettävä säteily on pääasiassa  $K\alpha_1$  ja  $K\alpha_2$  säteilyä, joissa  $2p_{1/2}$  ja  $2p_{3/2}$  tilojen (vastaavassa järjestyksessä) elektronit täyttävät  $1s$ -kuorelle jääneen aukon. Ilman monokromaattoria spektreihin tulee kuitenkin ylimääräisiä piirteitä virittävän röntgensäteilyn vaikutuksesta, joita kutsutaan röntgensatelliittihiikeiksi. Kuvassa 4.3 on esimerkki hiilen spektristä, jossa röntgensatelliittihiikit näkyvät selvästi. [6-8, 41]





**Kuva 4.3:** Esimerkkispektri röntgensatelliittihiikkien esiintymisestä XPS-spektrissä. Kyseessä on hiilen 1s-transition spektri, joka on mitattu näytteeltä, joka on ollut hydrolyysissä yhden päivän.

Kyseinen spektri on mitattu magnesiumanodilla. Esimerkiksi magnesiumanodia käytettäessä tulevat pienet piikit 8,4 eV, 10,1 eV ja 48,7 eV päähän matalammalle sidosenergialle, kuin varsinainen fotopiikki. Näistä edellä luetelluista piirteistä ensimmäiset ovat kahdesti ionisoitumisen  $K\alpha_3$ - ja  $K\alpha_4$ -piikit ja ne näkyvät kuvassa 4.3. 48,7 eV päähän fotopiikistä tuleva röntgensatelliittihiikki on  $K\beta$ -piikki, joka johtuu valenssitilojen relaxaatiosta ja se ei näy kuvan 4.3 hiilen spektrin energiavälissä. [6-8, 38 s. 18, 41]

#### 4.2.3 Fotoelektronin emissio

Fotonin törmätessä elektroniin kimmoisasti ja luovuttaessa energiansa elektronille elektroni voi emittoitua atomista. Tätä prosessia kutsutaan fotoemissioksi ja siihen liittyy monia tarkentavia ilmiöitä, jotka ovat XPS-menetelmän ymmärryksen kannalta tärkeitä. Ennen kuin elektroni vuorovaikuttaa fotonin kanssa, sen sidosenergiaan vaikuttavat alkutilaefektit, toisaalta heti vuorovaikutuksen jälkeen elektronin kokemia muutoksia

kutsutaan lopputilaefekteiksi. On huomioitava myös, että fotoemissio ei ole ainut tapahtuma, joka tuottaa XPS-spektriin piirteitä. Piirteitä tulee mm. edellä esitettyjen röntgensatelliittioppiikkien lisäksi myös Auger-prosessista. Seuraavissa osioissa kerrotaan tarkemmin eri fotoemission vaiheissa tapahtuvista XPS-mittausten kannalta merkittävistä seikoista. [6-8, 38]

### ***Alku- ja lopputilaefektit***

Alkutilassa elektroni on tietyssä kemiallisessa ympäristössään: tietyssä atomissa ja atomi on vuorovaikutuksessa ympäröivien alkuaineiden atomien kanssa. Mikäli atomi on esimerkiksi muodostanut kemiallisen sidoksen toisen alkuaineen atomin kanssa, sen valenssielektronit ovat uudelleen järjestyneet. Tämä valenssielektronien uudelleen järjestäytyminen aiheuttaa siirtymää myös sisäkuorten elektronien sidosenergioihin. XPS-menetelmän käytettävyyden kannalta tämä sisäkuorten elektronien kokema sidosenergian siirtymä on oleellinen. Esimerkiksi hiilestä peräisin olevien elektronien sidosenergiat ovat sitä suurempia mitä useampaan happiatomiin kyseinen hiili on sitoutunut. Happi on elektronegatiivisempi kuin hiili ja kovalenttisessa sidoksessa se vetää valenssielektroneja puoleensa, tällöin hiiliatomin efektiivinen varaus on hieman positiivisempi ja elektronien emittoituminen vaatii enemmän energiaa. Tähän perustuen XPS-menetelmällä voidaan havaita pinnan alkuainekonsentraation lisäksi myös yhden alkuaineen eri sidosten konsentraatiot. [6-8]

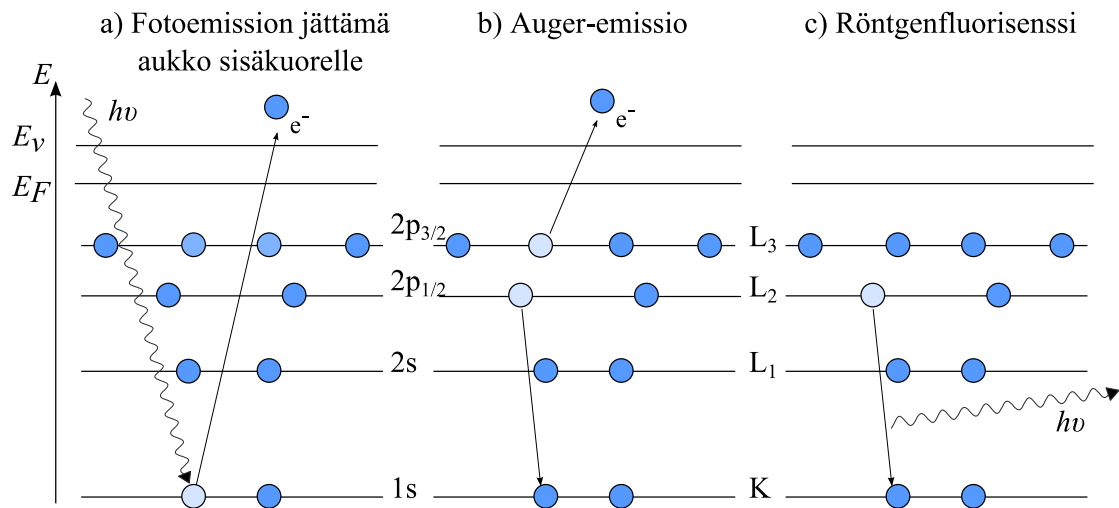
Lopputilaefekteistä aiheutuu myös mahdollisia muita piirteitä spektriin. Tällaisia piirteitä spektriin tuottavia lopputilaefektejä ovat mm. shake-up-prosessi ja multiplet-silpoutuminen. Näistä ensimmäinen syntyy, jos fotoelektronin emittoitumisen seurauksena valenssivyön elektroni virittyy. Mikäli valenssielektroninkin on mahdollista poistua isäntäatomin vuorovaikutuskentästä, puhutaan shake-off-prosessista. Multiplet-silpoutuminen on seurausta elektronin emittoitumisen jälkeen valenssitilalle jääneen parittoman elektronin spinin kokemasta magneettisesta vuorovaikutuksesta, joka aiheuttaa tilojen silpoutumisen kahdeksi toisistaan erottuvaksi tilaksi. [6-8, 42]

### ***Auger-prosessi***

XPS-menetelmä perustuu sisäkuorten elektronien emittoitumiseen, jolloin jokainen emittoitunut elektroni jättää jälkeensä aukon sisäkuorelle. Tällainen aukko ei voi olla pitkäikäinen, koska atomi on tällöin virittyneessä tilassa. Aukko täyttyy ylemmän kuoren elektronilla, jolloin vapautuu energiakvantti, joka on tilojen energioiden erotus. Energiakvantti voi emittoitua fotonina; tätä prosessia kutsutaan röntgenfluoresenssiksi (ks. kuva 4.4c) tai energian avulla voi emittoitua toinen elektroni isäntäatomin Coulombisesta vuorovaikutuskentästä. Tällöin prosessi on nimeltään Auger-prosessi (ks. kuva 4.4b). XPS-spektreihin tulee piirteitä myös Auger-emission seurauksena. [6-8, 38]

Kuvassa 4.4b on esitetty Auger-prosessi. Lähtötilanteessa on fotoelektronin jälkeensä jättämä aukko sisäkuorelle, kuvassa K-kuorella eli 1s-orbitaalilla. Tämä aukko sisäkuorella olisi mahdollista saada aikaan myös esimerkiksi elektronisuihkulla, kuten Auger-elektronispektroskopiassa (Auger Electron Spectroscopy, AES). Auger-emis-

siossa K-kuoren aukko täyttyy esimerkiksi  $L_2$ -kuoren elektronilla. Tässä elektronien relaksaatioissa vapautuu energiaa  $L_2$  ja K kuorien erotuksen verran. Mikäli tämän energian avulla atomista irtoaa toinen elektroni, kuvan tapauksessa  $L_3$ -kuoren elektroni, on tapahtunut Auger-emissio. Kyseinen emissio nimetään siihen liittyvien elektronien kuorien mukaan; tässä tapauksessa  $KL_2L_3$ . [6-8, 38]



**Kuva 4.4:** Virittyneen tilan purkautumisen vaihtoehdot.

XPS-mittausten kannalta huomionarvoista Auger-emissiossa on se, että Auger-emission piikkien paikat eivät ole riippuvaisia virittävän röntgensäteilyn energiasta toisin kuin fotoelektronipiikkien paikat, jotka riippuvat yhtälön 4.4. mukaan virittävän säteilyn energiasta. Onkin siis mahdollista muuttaa foto- ja Auger-elektronipiikkien paikkoja suhteessa toisiinsa, muuttamalla virittävän säteilyn energiaa. Tästä voi olla hyötyä etenkin tilanteissa, joissa piikit sattuvat spektriin samalle sidosenergialle. [6-8, 38]

### 4.3 XPS-menetelmä pinnan tutkimuksessa

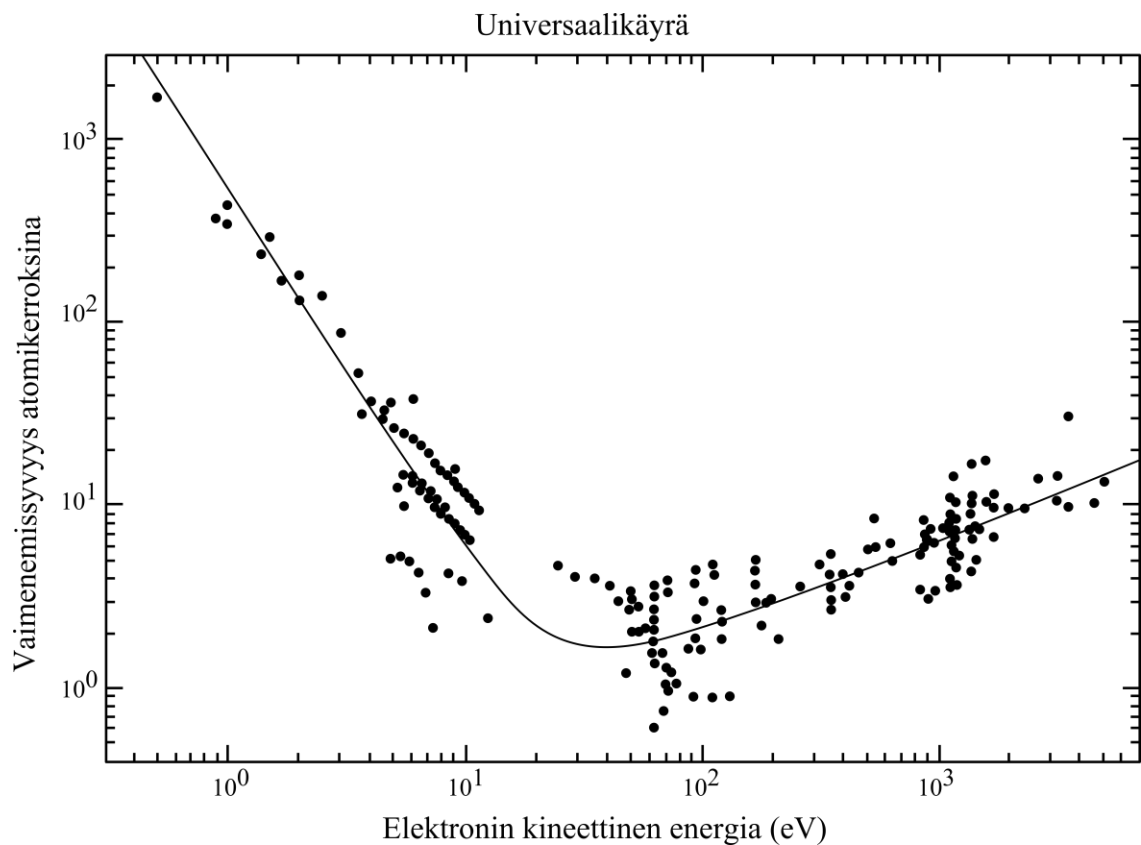
Pintatieteessä tutkitaan materiaalin uloimpia atomikerroksia ja XPS-menetelmä antaa mahdollisuuden pintasensitiivisen tutkimuksen tekemiseen. Virittävä röntgensäteily pääsee tunkeutumaan näyttemateriaaliin n. 1000 nm syvyyteen tai syvemmällekin, mutta elektronit voivat kulkea kiinteässä materiaalissa vain noin 10 nm. XPS:n pintaherkkyys perustuu siihen, että elektronit eivät pääse kulkeutumaan elastisesti detektorille kuin muutaman nanometrin syvyydeltä. Myös elastisesti detektorille päätyviä elektroneja syvemmältä voi detektorille päätyä elektroneja, mutta ne ovat kokeneet epäelastisen tai useita epäelastisia törmäyksiä. [6-8]

#### 4.3.1 XPS:n pintaherkkyys

Röntgensäteily tunkeutuu materiaaliin ja virittää elektroneja jopa mikrometrin syvyydellä näytteen pinnasta, mutta kulkiessaan kiinteässä materiaalissa vapaat elektronit vuoro-

vaikuttavat ympäröivien hiukkasten kanssa. Elektroni törmää ympäristöönsä menettäen törmäyksissä energiaansa aina kuljettuaan keskimäärin epäelastisen vapaamatkansa verran (Inelastic Mean Free Path, IMFP). Epäelastinen vapaamatka on siis pisteiden, joissa tapahtuu peräkkäiset epäelastiset törmäykset, välinen matka. Näiden törmäysten välillä elektroni voi kuitenkin törmätä elastisesti ja muuttaa suuntaansa jopa useita kertoja. Näistä elastisista törmäyksistä epäelastisten törmäysten välillä johtuu, että elektronin kulkema matka kahden epäelastisen törmäyksen välillä on pidempi kuin epäelastinen vapaamatka. Tätä elektronin kulkemaa matkaa kahden epäelastisen sironnan välillä kutsutaan vaimenemissyvyudeksi (Attenuation Length, AL). Vaimenemissyvyys on noin 20-30% suurempi kuin epäelastinen vapaamatka. [6, 44, 45]

Kuvassa 4.5 on esitetty universaalikäyrä, joka havainnollistaa kokeellista riippuvuutta vaimenemissyvyuden ja elektronin kineettisen energian välillä.



**Kuva 4.5:** Elektronin vaimenemissyvyys kineettisen energian funktiona useille eri alkuaineelle. Mukailtu teoksesta [46].

Universaalikäyrästä voidaan arvioida elektronin vaimenemista atomikerroksissa, kun tiedetään elektronin kineettinen energia. XPS-mittausten elektronien kineettisten energioiden tapauksessa elektronien vaimenemissyvyys on muutamasta atomikerroksesta noin 30 atomikerrokseen. Kuvassa 4.5 olevat pisteet kuvaavat havaintoja elektronien käyttäytymisestä eri alkuaineissa ja voidaankin havaita, että elektronin vaimenemissyvyys ei juurikaan riipu alkuaineesta, vaan huomattavasti enemmän elektronin kineettisestä energiasta. [6, 44, 45]

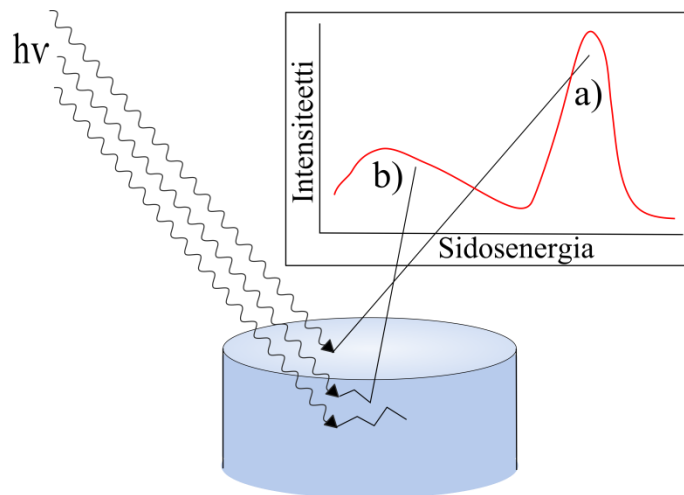
Elektronin vaimenemista kiinteässä aineessa kuvaa Beerin – Lambertin laki

$$I(z) = I_0 e^{\frac{-z}{\lambda \cos\theta}}, \quad (4.6)$$

jossa  $I(z)$  on intensiteetti syvyydeltä  $z$  näytteen pinnalla,  $I_0$  on vaimentumaton intensiteetti,  $\theta$  on elektronien emissioskulma suhteessa näytteen normaaliin ja  $\lambda$  on vaimenemis-syvyys. Beerin – Lambertin lain avulla voidaan arvioida pintatieteen tutkimuksessa kiinnostavaa informaatio-syvyyttä. XPS-menetelmässä informaatio-syvyys on syvyys, jolta tulee 95% saadusta informaatiosta. Kun elektronien emissioskulma on nolla, eli elektronit kerätään pinnan normaalin suuntaisesti, voidaan laskea, että informaatio-syvyys on  $3\lambda$  [45 s. 262]. Emissioskulmaa muuttamalla informaatio-syvyys muuttuu. Tässä työssä käytetty emissioskulma on 45 astetta, jolloin informaatio-syvyys on pienempi (noin  $2,1\lambda$ ). Emissioskulman valintaan on vaikuttanut näytteiden huokoisuus. Huokoisen näytteen mittaamisesta kerrotaan tarkemmin luvussa 4.6, jossa käydään myös emissio-kulman merkitys tarkemmin läpi. [6, 44, 45]

### 4.3.2 Elektronin kulkeutuminen materiaalissa

Elektroni voi isäntäatomin irtautumisen jälkeen päätyä detektorille elastisesti sironneena, jolloin sen informaatio välittyy fotopiikissä tai se voi matkalla menettää kineettistä energiaansa eli kokea epäelastisen törmäyksen tai useita törmäyksiä. Kuvassa 4.6 on havainnollistettu sekä fotopiikin syntyyn että epäelastisen sironnataustan syntyyn liittyvien elektronien kulkeutuminen materiaalissa. [6, 44, 47]



**Kuva 4.6:** Fotopiikin ja epäelastisen sironnataustan muodostuminen. Röntgensäteily tunkeutuu syvälle näytteeseen ja virittää elektroneja, a) jotka siroavat elastisesti muodostavat fotopiikin, b) jotka päätyvät detektorille, mutta ovat matkalla sironneet epäelastisesti, muodostavat epäelastisen sironnataustan. Osa elektroneista vaimenee näyttemateriaalissa kulkiessaan, eivätkä ne päädy detektorille. Mukailtu lähteestä [6].

XPS-menetelmän pintaherkkyys perustuu elastisesti sironneiden elektronien lyhyeen vaimenemissyvyyteen, mutta spektriin tulee kontribuutio myös epäelastisesti sironneista elektroneista. Tällaisella epäelastisesti sironneella elektronilla on vähemmän kineettistä energiaa kuin alun perin virityksen jälkeen. Elektronin mukanaan tuoma informaatio päättyy fotopiikin läheisyyteen suuremmalle sidosenergialle epäelastiseksi sirontataustaksi.

Epäelastisen sirontataustan muotoa voidaan hyödyntää pohdittaessa näytteen alkuaineiden syvyysjakaumaa. Transitiolla, joka on peräisin aivan päällimmäisissä atomikerroksissa olevasta alkuaineesta, on heikompi epäelastinen sirontatausta, koska useimmat alkuaineesta emittoituneet fotoelektronit kulkevat elastisesti detektorille. Tällöin niiden informaatio välittyy fotopiikissä. Muutamia atomikerroksia syvemmältä tulevasta signaalista fotoelektronit kokevat edellistä todennäköisemmin epäelastisen törmäyksen tai useita törmäyksiä kulkiessaan kiinteässä materiaalissa. Tällöin elektronien informaatio päättyy epäelastiseen sirontataustaan, joka on voimakkaampi kuin aivan pintakerrosten transitioiden sirontatausta. [8, 44]

## 4.4 Fotoelektronin energian analysointi ja spektrit

XPS-mittausten tuloksena saadaan spektri/spektrejä, jossa intensiteetti on sidosenergian funktiona. Spektrien perusteella pitää tunnistaa alkuaineet ja niiden kemialliset tilat. Tunnistaminen voidaan tehdä vertailemalla piikkien sidosenergian arvoja erilaisista tietokannoista ja teoksista löytyviin eri alkuaineiden ja transitioiden sidosenergioiden arvoihin. [6, 42]

### 4.4.1 Energia-analysaattorit

Elektronien energia-analysaattori koostuu kolmesta pääkomponentista: kokoavasta linssisysteemistä, puolipalloanalyysointilaitteesta (Hemispherical Analyser, HSA) ja detektorista [6]. Linssisysteemi sijaitsee näytteen yläpuolella ja se kokoaa ja ohjaa elektronit puolipalloanalyysointilaitteen tuloaukulle samalla hidastaen elektronien liikettä. Puolipalloanalyysointilaitteeseen koostuu kahdesta puolipallosta, joiden väliin elektronit ohjataan. Puolipalloanalyysointilaitteeseen ja elektronien kulkureitti on havainnollistettu kuvassa 4.2. Puolipallot kytketään potentiaaliin siten että sisemmällä puolipallolla on korkeampi potentiaali. Tällöin puolipallojen väliin muodostuu sähkökenttä, joka kääntää negatiivisesti varautuneiden elektronien kulkusuuntaa. Vain tietyllä kineettisellä energialla elektronit voivat päätyä puolipalloanalyysointilaitteen ulostuloaukulle ja siellä monistinputkille. Tätä energiaa kutsutaan läpäisyenergiaksi. Monistinputkilla yksi analyysointilaitteesta tullut elektroni irrottaa useita sekundäärisiä elektroneja ja elektronivuo voikin lopulta olla  $10^6$ - $10^8$ -kertainen verrattuna alkuperäiseen. Monistinputkilta elektronit päätyvät analyysointilaitteen detektio-päähän. [6, 8, 41, 42]

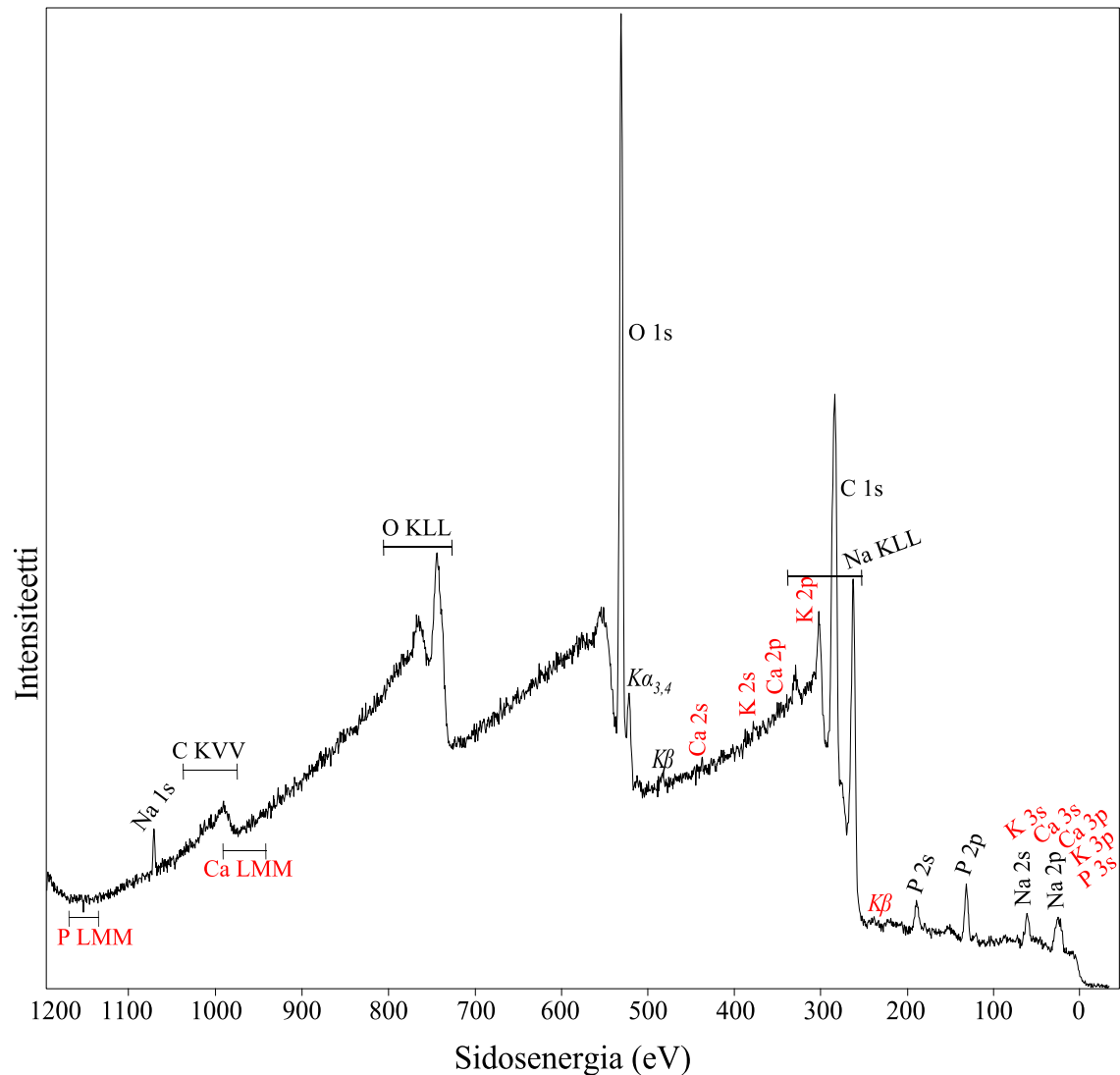
Pinnalta lähteneen fotoelektronin energiaa voidaan mitata kahdella erilaisella mittaamismoodilla: vakioläpäisyenergialla eli FAT-moodilla (Fixed Analyser Transmission) tai vakiohidastussuhteella eli FRR-moodilla (Fixed Retarding Ratio). Va-

kioläpäisyenergialla puolipalloanalysoijan puolipallojen välinen potentiaaliero pidetään vakiona. Tällöin spektrin absoluuttinen resoluutio on vakio eikä riipu elektronin kineettisestä energiasta. Tämän seurauksena voidaan määrittää eri alkuaineiden ja niiden kemiallisten tilojen suhteelliset osuudet. Vakiohidastussuhteella linssisysteemi hidastaa elektroneja vakiokertoimella. Tällöin suurella kineettisellä energialla linssisysteemiin tulevat elektronit omaavat suuremman kineettisen energian myös linssisysteemin jälkeen. Kun elektronien kineettinen energia kasvaa analysoijan absoluuttinen resoluutio heikkenee. Tämän takia FRR-moodissa mitatuista spektreistä ei voida määrittää alkuaineiden ja kemiallisten tilojen suhteellisia osuuksia. [6, 41, 42]

#### 4.4.2 Yleisspektri

XPS-mittauksissa saadaan informaatiota pinnan alkuainekoostumuksesta ja kemiallisista tiloista. Jotta yksittäinen näyte voidaan mitata mahdollisimman luotettavasti, aloitetaan XPS-mittaukset usein yleisspektrin mittauksella. Yleisspektri mitataan edellä esitellyllä FRR-moodilla, jolloin suurien kineettisten energioiden heikosti näkyvien transitioiden intensiteetti on mahdollisimman suuri. Toisaalta, koska suurten kineettisten energioiden transitioiden intensiteetti saadaan suureksi, tarkoittaa se samalla, että suhteelliset intensiteetit ovat vääristyneet. [6, 8, 38, 41, 42]

Yleisspektristä saadaan nopea nimensäkin mukainen yleiskatsaus pinnasta, koska yleisspektri mitataan usein lähes koko virittävän säteilyn mahdollistamalta energialta. Tällöin spektriin saadaan piirre kaikilta näytteen pinnalla olevilta alkuaineilta, vähintään yhdestä transitiosta. Kuvassa 4.7 on esitetty yksi tässä työssä mitattu yleisspektri ja spektriin on tunnistettu kaikki piirteet. Tunnistuksessa spektrin piikkien paikkoja verrataan tietokannoista löytyviin sidosenergian arvoihin ja näin ollen voidaan määrittää pinnalla olevat alkuaineet. XPS-spektriin tulee useista eri syistä piirteitä ja onkin tärkeää, että kaikki spektrin piirteet on tunnistettu. Usein alkuaineen tietyn transition intensiteetti on muita voimakkaampi ja sen perusteella alkuaineen olemassaolo pinnalla havaitaan. On kuitenkin havaittava kaikki muutkin alkuaineesta tulevat transitiot, jotta voidaan varmistua päätelmän oikeellisuudesta. Myös mittaussuunnitelmasta johtuvat spektrin piirteet on huomioitava ja nimettävä. [6, 8, 38]



**Kuva 4.7:** Esimerkki yleisspektristä huokoistamattomalta 84 päivää hydrolyysissä olleelta 60 m-% TCP:tä sisältävältä komposiittinäytteeltä. Spektriin on tunnistettu kaikki piirteet, punaisella ne, joita on vaikea kyseiseltä näytteeltä havaita, mutta jotka työn mittausten kannalta ovat kuitenkin seuraamisen arvoisia.

Kuvaan 4.7 on tunnistettu mustalla värillä kaikki selvästi erottuvat spektrin piirteet. Hiilen, hapen, natriumin ja fosforin fotopiikit ovat selvästi havaittavissa, lisäksi spektristä näkyy hiilen, hapen ja natriumin Auger-piikit. Spektriin on merkitty myös mittausspektristä johtuvat muodot kuten  $K\alpha_{3,4}$ - ja  $K\beta$ -röntgensatelliittipiikit, joista on kerrottu luvussa 4.2.2. Punaisella värillä on merkitty paikat, joihin näyttemateriaalin muiden alkuaineiden tai jo tunnistettujen alkuaineiden toisten transitioiden kuuluisi sijoittua. Kuten kuvasta 4.7 voidaan huomata, kalsiumia ja kaliumia ei juurikaan havaita, alkuaineet ovat kuitenkin työn kannalta oleellisia ja siitä syystä ne on nimetty esimerkkispektriin.



### 4.4.3 Tarkkuusspektrit

Yleisspektrin perusteella voidaan todeta mitä alkuaineita pinnalla on; kyseisistä alkuaineista valitaan tarkkuusspektrimittaukseen vahvimman intensiteetin antava transitio, joka voidaan kirjallisuudesta tarkistaa. Jotta XPS-menetelmällä saadaan luotettava kuva pinnan alkuaineiden sitoutumisesta ja suhteellisista konsentraatioista, pitää yleisspektristä arvioidut mielenkiintoiset kohdat mitata erikseen FAT-moodilla eli vakioläpäisyenergialla. Tällöin piikkien intensiteetit ovat vertailukelpoisia ja absoluuttinen resoluutio mittausten kesken sama. Jotta tarkkuusspektrin signaali-kohina-suhde saadaan hyväksi, mitataan valittua energiaväli useita kertoja. Yksittäisen tarkkuusspektrin analysointi alkaa usein epäelastisen sirontataustan vähennyksellä. Tausta voidaan vähentää käyttäen esimerkiksi Shirley-algoritmin vähennystä. Taustan vähennyksen jälkeen luodaan sovitettavat komponentit, jotka kuvaavat eri kemiallisia tiloja ja/tai muita spektrissä esiintyviä perusteltuja piirteitä. Näiden sovitteiden muoto on pääasiassa yhdistelmä Gaussista ja Lorentzista muotoa. [6, 42]

Kvantitatiivisessa analyysissä määritetään pinnan kemiallinen koostumus eli määritetään alkuaineiden ja yhdisteiden ainemäärät mitatuista spektreistä. Piikin pinta-ala on verrannollinen kyseisen tilan tai alkuaineen ainemäärään mitatussa alassa. Sen lisäksi pinta-alaan vaikuttavat myös muut tekijät, jotka otetaan huomioon kyseisen alkuaineen kyseisen transition sensitiivisyyskerroimessa. Sensitiivisyyskerroin kuvaa kuinka suuri kyseisen orbitaalin piikin intensiteetti on suhteessa ainemäärään. Sensitiivisyyskerroimeen vaikuttaa alkuaineen orbitaalin lisäksi myös mittauslaitteisto. Sensitiivisyyskerroin onkin monen muuttujan funktio ja laitekohtainen, joten se pitää määrittää laitteistolle kokeellisesti. [38]

Sensitiivisyyskerroimien ja piikin intensiteetin avulla saadaan verrattua kahden alkuaineen pitoisuuksia:

$$\frac{n_1}{n_2} = \frac{I_1/S_1}{I_2/S_2}, \quad (4.7)$$

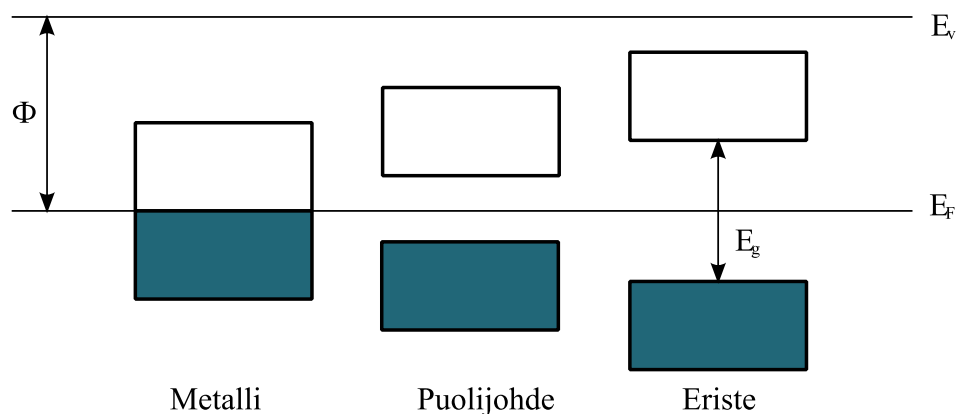
kun  $n$  on alkuaineen ainemäärä,  $I$  on kyseisen piikin intensiteetti (käytännössä pinta-ala) ja  $S$  on kyseisen alkuaineen sensitiivisyyskerroin. Alaindeksit kuvaavat alkuainetta 1 ja 2. On huomioitava myös, että syvyys, jolta signaali tulee, vaikuttaa piikin intensiteettiin. Kaava 4.7 olettaakin siis näyttemateriaalin homogeeniseksi. Kun halutaan verrata alkuaineen suhteellista konsentraatiota  $C_X$  muihin alkuaineisiin saadaan kaava muotoon:

$$C_X = \frac{n_x}{\sum n_i} = \frac{I_x/S_x}{\sum I_i/S_i}. \quad (4.8)$$

Summaamalla komponenttien määrät yhteen saadaan yksinkertaisesti nettomäärä, johon yksittäistä komponenttia voi verrata. Tällä tavalla voidaan tunnistaa jopa 0,1 atomiprosentin tarkkuudella alkuainekonsentraatio. Tällöin sensitiivisyyden tulee kuitenkin olla suuri ja epätarkkuutta aiheuttavien tekijöiden minimoinnin on onnistuttava. Epätarkkuutta aiheuttavat signaali-kohina-suhde ja energian resoluutio. Signaali-kohina-suhdetta voidaan laskea mittaamalla valittu energia-alue useita kertoja ja laskemalla tietyllä energialla mitatuista pisteistä keskiarvo. Lisäksi on huomioitava, että sovitettaessa piikkiä hyvin pieneen alkuainekonsentraatioon sovituksen suhteellinen virhe voi olla alkuaineen konsentraation luokkaa [6 s. 73]. [6, 38]

#### 4.5 Eristävän näytteen mittaus

Metallin, puolijohteen ja eristeen ominaisuudet eroavat toisistaan niiden erilaisten elektronirakenteiden takia. Kuvassa 4.8 on esitetty metallin, puolijohteen ja eristeen valenssi- ja johtavuusvyöt. Kuten kuvasta 4.8 nähdään metallilla kyseiset elektronivyöt ovat päällekkäin ja miehitytyiltä valenssituloilta voi siirtyä elektroneja johtavuusvyölle. Eristeen ja puolijohteen tapauksissa valenssi- ja johtavuusvyön välissä on energia-aukko  $E_g$ , jonka takia johtavuusvyön ja valenssivyön välillä ei juurikaan liiku elektroneja ilman ulkoista tekijää, joka aiheuttaisi virittymisen. XPS-menetelmässä tämä elektronirakenteiden ero tulee esiin, koska menetelmä perustuu näytteen pinnalta poistuviin fotoelektroneihin. Metalleilla, jotka ovat hyviä johteita, poistuneet fotoelektronit korvautuvat muualta näytteestä, näytteenpitimestä ja manipulaattorista peräisin olevilla elektroneilla. Eristeiden tapauksessa fotoelektronien jättämiä aukkoja ei voida täyttää näytteestä käsin, koska energia-aukko valenssi- ja johtavuusvyön välillä vaikeuttaa elektronien siirtymistä vöiden välillä. [6, 18, 48]



**Kuva 4.8:** Eri materiaalien erot elektronirakenteessa. Mukailtu lähteestä [18 s. 36].

Tässä työssä tutkitut näytteet ovat materiaaliominaisuuksiltaan eristeitä ja siten ne vaativat laitteistolta erityispiirteitä. Eristävät näytteet varautuvat mittausten aikana positiivisesti, koska pinnalta poistuu fotoelektroneja. Mikäli näyte olisi johtava, poistuneet elektronit korvautuisivat maadoitetusta näytteenpitimestä ja manipulaatto-

rista. Potentiaaliero ei kuitenkaan kasva mittausten aikana vaan varautumisessa saavutetaan tasapaino. Tasapainon ansiosta mitattu spektri voidaan kalibroida ja täten eliminoida varautumisen aiheuttama virhe. Kahden hiiliatomin välisen sidoksen sidosenergian tiedetään olevan yhdisteestä riippumaton, lisäksi hiili on alkuaine, jota useimilla näytteillä havaitaan. Tässä työssä spektrit on kalibroitu siten että hiili–hiili-sidos on 285 eV. [6, 7, 18, 38, 48]

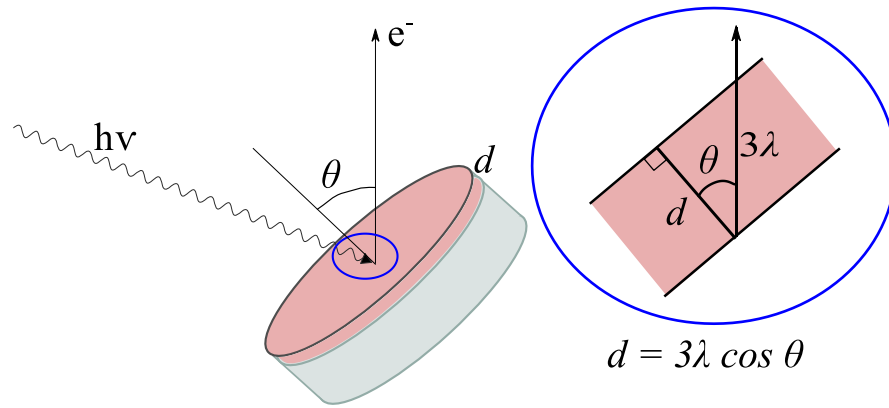
Tasapainon varautumisessa mahdollistaa monokromatisoimattoman röntgenlähteen rakenne. Monokromatisoimaton röntgenlähde on tuotava lähelle näytettä, mutta silti eristettävä analyysikammioista. Tämän erottelun hoitaa alumiini-ikkuna, jonka läpi röntgensäteily kulkee. Alumiini-ikkuna sijaitsee lähellä näytteen mittauspintaa, koska monokromatisoimattoman röntgensäteily on pitänyt kohdistaa tutkittavaan alaan tuomalla röntgenlähde lähelle näytettä. Kulkiessaan alumiini-ikkunan lävitse röntgensäteily irrottaa alumiinista matalaenergisiä elektroneja. Näiden elektronien on mahdollista päätyä positiivisesti varautuneen näytteen pintaan samalla neutraloiden varautumista. [6, 7, 18, 38, 48]

## 4.6 Huokoisen näytteen mittaus

XPS-menetelmän perustana olevien fotoelektronien määrään ja epäelastisesti sironneiden elektronien määrään vaikuttaa merkittävästi näyttemateriaalin pinnan topografia ja topografiassa olevat epäideaalisuudet [49]. Kun pinta on huokoinen, muodostuu pinnalle varjoalueita analysaattorilta katsottaessa. Näiden varjoalueiden takia signaalin intensiteetti heikkenee. Gunter *et al.* [50] ovat tutkineet emissiokulman vaikutusta päällyskerroksen paksuuden määrittämisessä huokoisen substraatin pinnalla ja tutkimuksissaan todenneet, että pinnan huokoisuuden topografialla on vaikutusta. Mitä enemmän pinnalla on varjostusta, sitä suurempi virhe tulee päällyskerroksen paksuutta määritettäessä. Tutkimuksen varsinaisena kohteena on ollut emissiokulman vaikutus virheeseen, joka päällyskerroksen paksuuden määrittämisessä tehdään. Gunter *et al.* raportoi artikkelissaan [50], että kolmiulotteisen huokoisen pinnan tutkimuksessa minimivirhe päällyskerroksen paksuudessa saavutetaan, kun emissiokulma on 40-45 astetta. Päällyskerroksen paksuuden virhe on tällöin alle 10%. [49-51]

Kaikki tässä työssä tutkitut näytteet ovat huokoisia verrattuna esimerkiksi XPS-menetelmällä paljon tutkittuihin metallinäytteisiin. Työn näytteiden huokosten koko vaihtelee kuitenkin suuresti eri näytetyyppien välillä. Kuvassa 5.1 on esitetty kaikkien työssä tutkittujen näytetyyppien hydrolysoimattomat näytteet sekä huokoistetut että huokoistamattomat. Emissiokulman valinnalla pyrittiin mahdollisimman hyvään intensiteettiin kaikilta näytteiltä ja toisaalta näytteiden välisen vertailukelpoisuuden säilyttämiseen. Tästä syystä kaikkien näytteiden mittauksessa on käytetty emissiokulmana kirjallisuuteen perustuen 45 asteen kulmaa. [49-51]

Kuvassa 4.9 on havainnollistettu emissiokulman vaikutusta tutkittavaan pintaan ja saavutettuun informaatioisyvyyteen.



**Kuva 4.9:** Emissiokulman vaikutus informaatioisyvyyteen. Mukailtu lähteestä [4 s. 91]

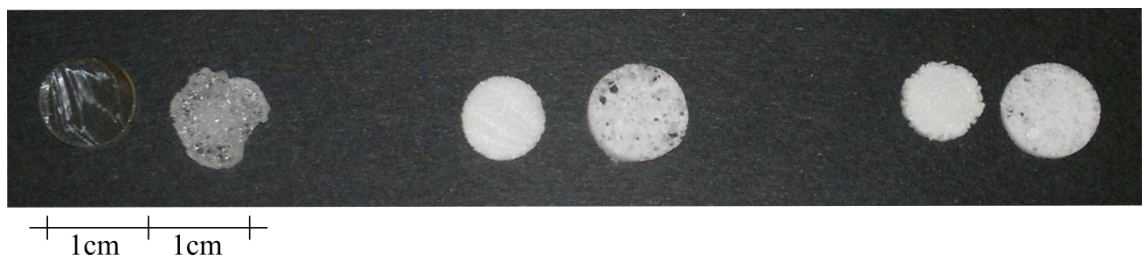
Emissiokulman muuttaminen tarkoittaa, että näytettä käännetään suhteessa detektorille kulkeutuvien elektronien suuntaan. Kuten kaavasta 4.6 voidaan havaita, emissiokulman muuttaminen vaikuttaa intensiteettiin tietyltä syvyydeltä ja sitä kautta myös informaatioisyvyyteen, jolta 95% saadusta signaalista on peräisin. Emissiokulman kasvattaminen aiheuttaa sen, että detektorille päätyvät elektronit ovat kulkeneet näyttemateriaalissa enintään aiemmin luvussa 4.3.1 mainitun  $3\lambda$  matkan, mutta tässä tapauksessa eivät kohtisuoraan pintaa kohti. Trigonometrian perusteella voidaan laskea kyseisen emissiokulman tuottama informaatioisyvyys, joka on kohtisuora etäisyys pinnasta. Tässä työssä käytetyn 45 asteen emissiokulman informaatioisyvyys on likimain  $2,1\lambda$  ( $\frac{3\sqrt{2}}{2}\lambda$ ). Koska informaatioisyvyys pienenee pintakerrosten signaalin suhteellinen osuus kasvaa. Emissiokulman 40–45 astetta käyttäminen huokoisen näytteen mittauksessa on suoraviivainen ja tehokas metodi, kuten Peter J. Compson asian ilmaisee [51 s. 658]. [19, 44, 51]

## 5 TUTKIMUSTEN SUORITUS

Työn elektronispektroskooppisen tutkimuksen kohteena oli huokoisen komposiitin biohajoavuuden alkuvaiheet. Samoja näytemateriaaleja oli lähetetty myös soluviljelykokeisiin ja pinnat haluttiin pitää soluviljelykokeita vastaavina, joten näytteille ei tehty mitään käsittelyä ajatellen elektronispektroskooppista tutkimusta. Elektronispektroskooppisena tutkimusmenetelmänä työssä oli XPS-menetelmä ja laitteisto, jota käytettiin, sijaitsee Tampereen teknillisessä yliopistossa Optoelektroniikan tutkimuskeskuksen Pintatieteen laboratoriossa.

### 5.1 Tutkittavat materiaalit

Pinta-analyttisessä tutkimuksessa tämän työn puitteissa on tutkittu kolme erilaista materiaalia, joista kaikista on tutkittu sekä huokoinen että huokoistamaton näyte. Komposiitin matriisimateriaalina on poly(L-laktidi-ko-kaprolaktoni), jonka lyhenteenä käytetään yleisesti kirjainyhdistelmää PLCL. Tässä kopolymeerissa on valmistajan ilmoituksen mukaan 69 mol-% poly(L-laktidi):a ja 31 mol-% polykaprolaktonia. Kyseistä kopolymeeriä on jokaisessa työssä mitatussa näytteessä, mutta osassa näytteitä kopolymeeriin on seostettu keraamia, jotta on voitu optimoida mekaanisia ominaisuuksia ja funktionaalisuutta biologisessa ympäristössä. Matriisipolymeeriin lisättyä keraamina tämän työn näytteissä on käytetty  $\beta$ -trikalsiumfosfaattia, jonka yleinen lyhenne on  $\beta$ -TCP. Kuvassa 5.1 on esitetty työssä tutkitut näytteet.



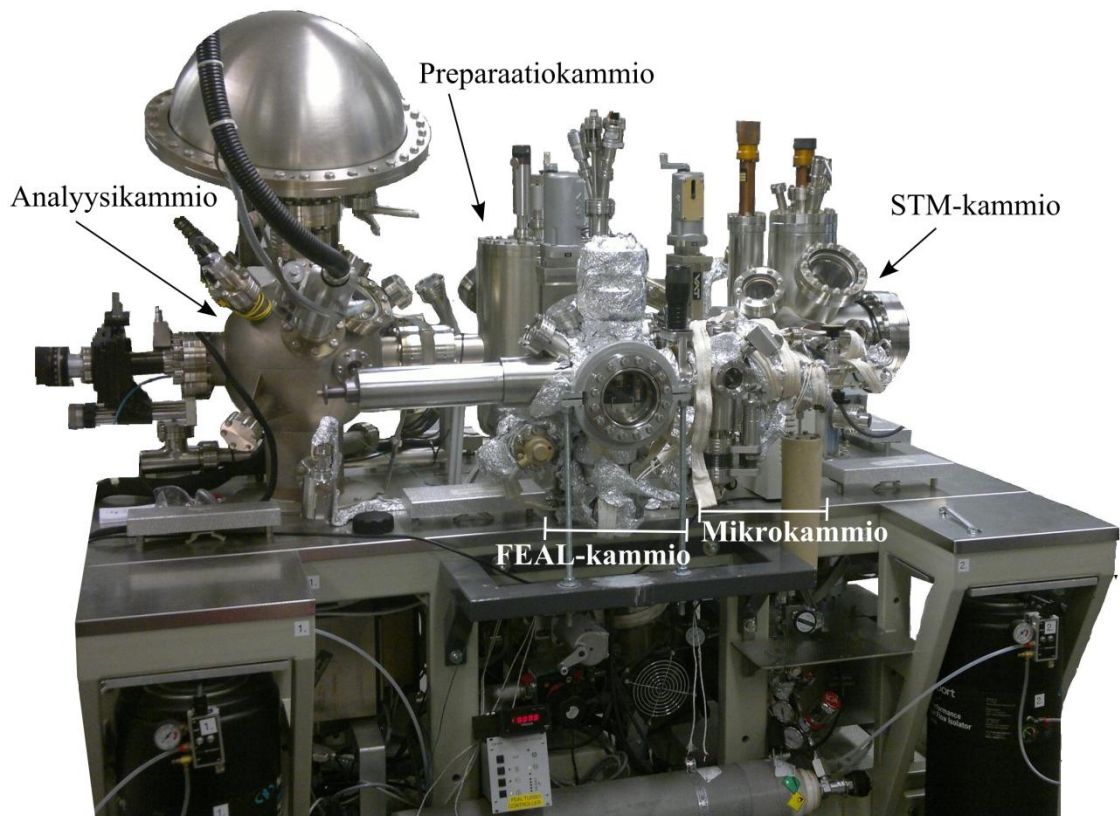
**Kuva 5.1:** Kaikki tässä työssä tutkitut näytemateriaalit. Pareittain huokoistamaton vasemmalla ja huokoistettu oikealla. Pareista vasemman puoleisimpana ovat 100 % kopolymeerinäytteet, keskellä komposiittinäytteet, joiden valmistuksessa on käytetty 40 m-%  $\beta$ -TCP:a ja 60 m-% kopolymeeriä ja oikealla komposiittinäytteet, joiden valmistuksessa käytetty 60 m-%  $\beta$ -TCP:a ja 40 m-% kopolymeeriä.

Yksi materiaaleista koostuu vain kopolymeerista eli on 100% PLCL. Toisessa materiaalissa matriisipolymeeriin on seostettu trikalsiumfosfaattia siten, että kopolymeeriä on valmistusvaiheessa käytetty 60 m-% lopullisesta komposiitista ja trikalsiumfosfaattia 40 m-%. Kolmas materiaali on koostuu 40 m-% matriisikopolymeeriä ja

60 m-% trikalsiumfosfaattia. Työn näytteiden yksikäsitteisen nimeämisen perusta on nähtävissä liitteessä A. Työssä tutkittavia näytteitä saatiin pinta-analyyttistä tutkimusta varten kaksi rinnakkaista näytettä, jotka haettiin Biolääketieteen tekniikan laitokselta. Biolääketieteen tekniikan laitoksella näytteet oli säilytetty lasipurkeissa tyhjiökaapissa. Näytteet säilytettiin elektronispektroskooppisia mittauksia odottamassa lasipurkeissa, jotka sijoitettiin eksikaattorikaappiin. Eksikaattorikaappi oli lisäksi valolta suojatun kangashupun alla.

## 5.2 Multilab-laitteisto

Työ keskittyi edellä ja tarkemmin luvussa 2 ja 3 esitellyn materiaalin biohajoavuuden alkuvaiheiden elektronispektroskooppiseen tutkimukseen. Työn mittaukset on suoritettu Multilab-laitteistolla, joka sijaitsee Tampereen teknillisen yliopiston Optoelektroniikan tutkimuskeskuksessa Pintatieteen laboratoriossa. Laitteisto on esitetty kuvassa 5.2.



**Kuva 5.2:** Multilab-laitteisto. Kuvassa etualalla näkyvät FEAL- ja mikrokammiot, vasemmalla analyysikammio, oikealla STM-kammio ja keskellä takana preparaatiokammio.

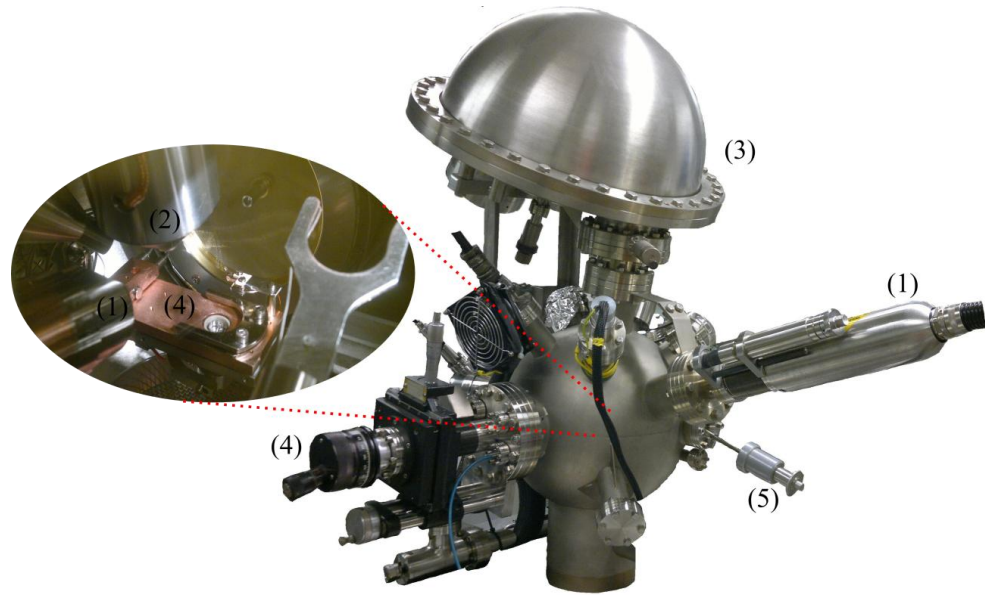
Laitteistolla on mahdollista tehdä näytteelle käsittelyjä tyhjiöolosuhteissa ja lisäksi sekä XPS- että STM-mittauksia ilman altistusta ilmakehälle operaatioiden välillä. Laitteistossa on viisi toisistaan erotettavissa olevaa tyhjiökammiota. Kammioiden ja niiden välillä näytettä voidaan siirtää kuvassa 5.7 esitetyn näytteenpitimen avulla.

Näytteenpidin liikkuu laitteiston sisällä sitä kuljettavassa kärryssä, jota on mahdollista liikuttaa laitteiston ulkopuolelta. Lisäksi kärryn kulkureittiä voi muuttaa preparaatiokammiossa sijaitsevan karusellin avulla. Käsittelyjen ja mittausten aikana on tarpeellista siirtää näytteenpidin pois kärrystä esimerkiksi mittaustaikalle. Tämä siirto tapahtuu siirtovarren avulla. Lahtonen *et al.* ovat artikkelissaan [40] esitelleet laitteiston yksityiskohtaisesti. [40]

Laitteiston viisi tyhjiökammioita ovat lataus- eli FEAL-kammio (Fast Entry Air Lock), mikrokammio, preparaatiokammio, analyysikammio ja STM-kammio. Näytteen lataus laitteistoon tapahtuu FEAL-kammion kautta. Uuden näytteen lataus aloitetaan eristämällä FEAL-kammio muusta laitteistosta sulkemalla porttiventtiilit. Tällöin ilmakehän paineeseen altistuu mahdollisimman pieni tilavuus laitteistoa. Ilmaus tehdään typpikaasun avulla päästään tyyppiä rauhallisesti FEAL-kammioon. Kun typen paine FEAL-kammiossa on ilmanpaineen tasolla, voidaan sulkea typen tulo ja avata kammion seinässä oleva ikkunalaippa. Avatun ikkunalaipan kautta on mahdollista laittaa mitattavat näytteet laitteistoon. Näytteet on kiinnitetty kuvassa 5.7 esitettyihin näytteenpitimiin.

Kun halutut näytteet ovat FEAL-kammiossa, voidaan ikkunalaippa sulkea ja aloittaa kammion pumppaus. FEAL-kammion pumppaus toteutetaan turbomolekyylipumpulla. Laitteiston mittauskammioissa (analyysi- ja STM-kammioissa) peruspaine on  $10^{-10}$  mbar, joka on ultratyhjiön painealueella. Preparaatio- ja FEAL-kammioiden paineet ovat hieman edellistä korkeammat. Analyysi- ja STM-kammioita pumpataan titaanisublimaatiopumpun ja ionipumpun yhdistelmällä ja FEAL- ja preparaatiokammioita turbomolekyylipumpuilla. Takalinjan jäännöskaasun pumppauksen FEAL-kammion osalta hoitaa kiertosiipipumppu ja preparaatiokammion osalta scroll-pumppu. [40, 43]

Näytteen tai useiden näytteiden latauksen jälkeen FEAL-kammio pumppautuu tyhjiöön parin tunnin ajan. Kun haluttu tyhjiö on saavutettu, voidaan porttiventtiili kammioiden välillä avata ja siirtää näytteet kärryn avulla FEAL-kammioista preparaatiokammioon ja sieltä analyysikammioon, jossa varsinaiset mittaukset suoritetaan. Kuvassa 5.3 on esitetty analyysikammio sekä sisältä että ulkoa. Analyysikammiossa mittausten aikana on vain sillä hetkellä mittauksessa oleva näyte. Muita näytteenpitimiä, joihin näytteet on kiinnitetty, on mahdollista säilyttää niille varatuilla paikoilla preparaatio-, STM- tai FEAL-kammiossa tai näytteitä kuljettavassa kärryssä. Kuvassa 5.3, jossa analyysikammio on kuvattu ulkoapäin, oikealla näkyy röntgentykki (1), jonka alapuolella siirtovarsi (5), jolla näytteenpidintä voidaan liikuttaa laitteiston ulkopuolelta. Kuvan yläosassa on puolipalloanalysaattori (3) ja vasemmalla manipulaattorin (4) säätöön liittyvät osat. Puolipalloanalysaattori on VG Microtechin CLAM4 MCD LNo5-mallinen ja sen toiminta, kuten muunkin mittaukseen liittyvän laitteiston toiminta, on kuvattu luvussa 4.



**Kuva 5.3:** *Analyytikammio, vasemmalla kuva analyysikammion sisäosista. (1) röntgentykki, (2) kokoava linssisysteemi (3) puolipalloanalyysaattori, (4) manipulaattori ja (5) siirtovarsi. Manipulaattorissa (4) laitteiston sisällä näkyy paikka näytteenpitimelle, joka on esitetty kuvassa 5.7.*

Kuvassa 5.3, jossa analyysikammion sisäosat näkyvät, näkyy röntgentykin pää, joka lasketaan mittausten ajaksi lähemmäs mitattavaa pinta-alaa. Sisäosien kuvassa näkyy lisäksi manipulaattori, johon näytteenpidin asetetaan sille kuuluvaan paikkaan. Manipulaattoria on mahdollista liikuttaa kolmessa ulottuvuudessa, jolloin voidaan säätää mittaustaikaa tai vaihtaa näytteenpaikka mahdollisten käsittelyjen aikana niiden vaatimaan asemaan. Manipulaattoria on kolmen ulottuvuuden siirtelyn lisäksi mahdollista kääntää, jolloin emissioikulma muuttuu. Kuvassa manipulaattori on nollakulmassa eli näyte on sijoittunut kohtisuoraan linssisysteemin alle. Työn mittauksissa on käytetty 45 asteen kulmaa. Manipulaattorin yläpuolella analyysikammiossa on kokoava linssisysteemi.

### 5.3 Mittausten vaikutus ja emissioikulman valinta

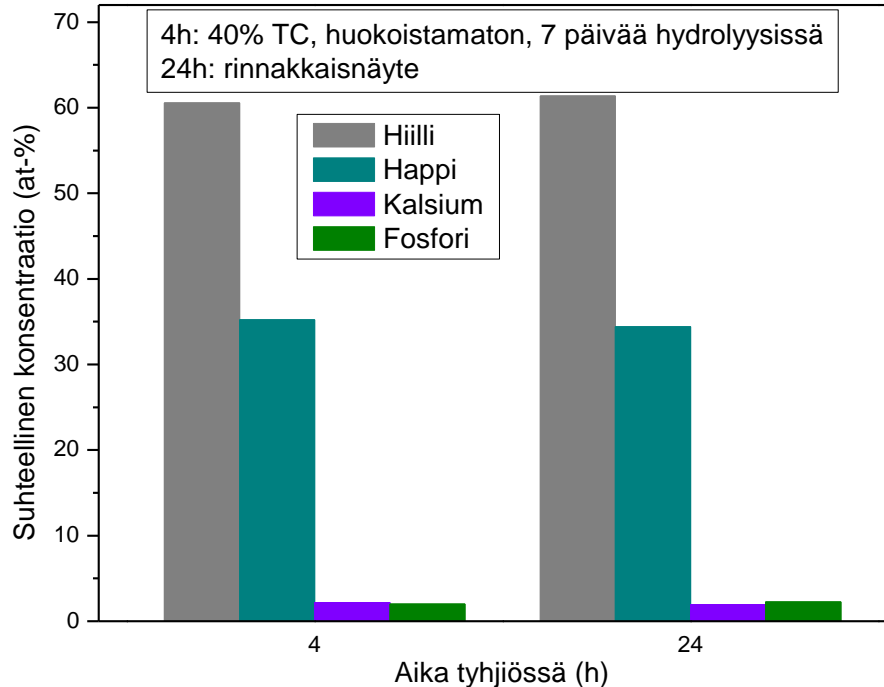
Työssä tutkittavien näytteiden huokoisuus ja eristävyys vaativat mittauslaitteistolta ja mittausten toteutukselta tiettyjä erityispiirteitä. Lisäksi haluttiin varmistaa, että työssä tutkittavat komposiitti- ja kopolymeerimateriaalit eivät muutu merkittävästi tyhjiön vaikutuksesta.

#### 5.3.1 Tyhjiön vaikutus näytteen pintaan

Tyhjiönkestävyyden tutkimista varten laitteistoon ladattiin kaksi näytettä. Näytteet olivat 40 m-%  $\beta$ -TCP:tä sisältäviä, huokoistamattomia ja 7 päivää hydrolyysissä olleita. Näytteistä toinen mitattiin heti FEAL-kammion pumppauduttua riittävän matalaan paineeseen, jossa näyte voitiin siirtää analyysikammioon mittausta varten. Toinen



näytteistä jäi odottamaan mittausta FEAL-kammioon ja se tuotiin analyysikammioon mittaukseen vasta, kun latauksesta oli kulunut noin 24 tuntia. Kuvassa 5.4 on esitetty suhteellinen pintakonsentraatio eri alkuaineiden osalta molempien näytteiden tapauksessa.

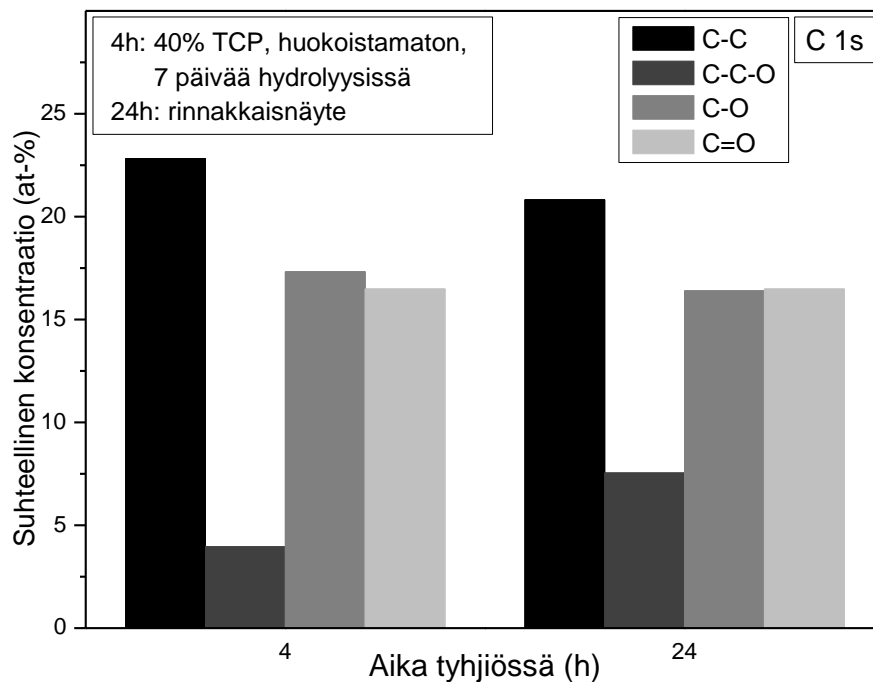


**Kuva 5.4:** Alkuaineiden suhteelliset pintakonsentraatiot 4 ja 24 tunnin tyhjiössä olon jälkeen.

Kuvasta 5.4 voidaan havaita, että 20 lisätuntia tyhjiössä eivät muuta näytettä merkittävästi. Hapen suhteellinen konsentraatio pienenee vähän ja kalsiumin ja fosforin suhteelliset konsentraatiot muuttuvat hieman. Muutos hapen suhteellisessa konsentraatiossa johtuu esimerkiksi epäpuhtauksien, jotka sisältävät happea, desorboitumisella pinnalta tyhjiössäolon aikana. XPS-menetelmällä voidaan määrittää pinnan suhteellinen konsentraatio, jopa 0,1 % tarkkuudella, kuten luvussa 4 on mainittu. Kyseinen tarkkuus vaatii kuitenkin alkuaineen, jota näytteellä on paljon, ja kyseiseltä alkuaineelta tilan, joka erottu vahvasti. Tällöin signaali-kohina-suhde muodostuu kyseisen tilan kohdalla hyväksi. Kalsiumin ja fosforin suhteelliset pintakonsentraatiot tyhjiönkeston mitauksessa käytetyillä näytteillä ovat pienet. Kun suhteellinen konsentraatio lähestyy tilan tunnistamisen rajaa, suhteellinen keskijointa kasvaa merkittävästi. Näin ollen kalsiumin pudotus 2,19 prosentista 1,95 prosenttiin ja fosforin kasvu 2,02 prosentista 2,27 prosenttiin, eli alle 0,3 % muutokset molemmissa, ovat kyseisten alkuaineiden määriin nähden virhemarginaalissa. [6]

Kun samoista mittauksista piirretään hiilen kemiallisten tilojen suhteelliset pintakonsentraatiot, jotka on esitetty kuvassa 5.5, havaitaan, että niissä tapahtuu muutoksia tyhjiössäolon aikana. Muutokset voivat selittyä esimerkiksi sillä, että pinnalta poistuu hiilen ja hapen yhdisteitä, kun näyte on tyhjiössä. Lisäksi on huo-

mioitava, että tyhjiönkestoa ei voitu mitata samalta näytteeltä. Mittaukset tehtiin rinnakkaisilta näytteiltä, joten on muistettava, että hienovaraisia muutoksia kahden rinnakkaisen näytteen välilläkin voi olla. Tämä tarkoittaa, että edellä kuvatut muutokset tyhjiössäolon aikana voivat johtua myös näytteiden eroista jo ennen laitteistoon lataamista. Oletetaan kuitenkin, että näytteiden valmistusprosessi on onnistunut ja tuottaa tasalaatuisia näytteitä, jolloin erot rinnakkaisnäytteiden välillä voidaan jättää huomiotta. Lisäksi muutokset tyhjiön vaikutuksesta ovat kaiken kaikkiaan pieniä, jolloin voidaan olettaa, että rinnakkaiset näytteet ovat hyvinkin toisiaan vastaavia. Hiilen kemiallisten tilojen sovituksesta on kerrottu tarkemmin luvussa 5.5.



**Kuva 5.5:** Hiilen kemiallisten tilojen suhteelliset osuudet 4 ja 24 tunnin tyhjiössä olon jälkeen.

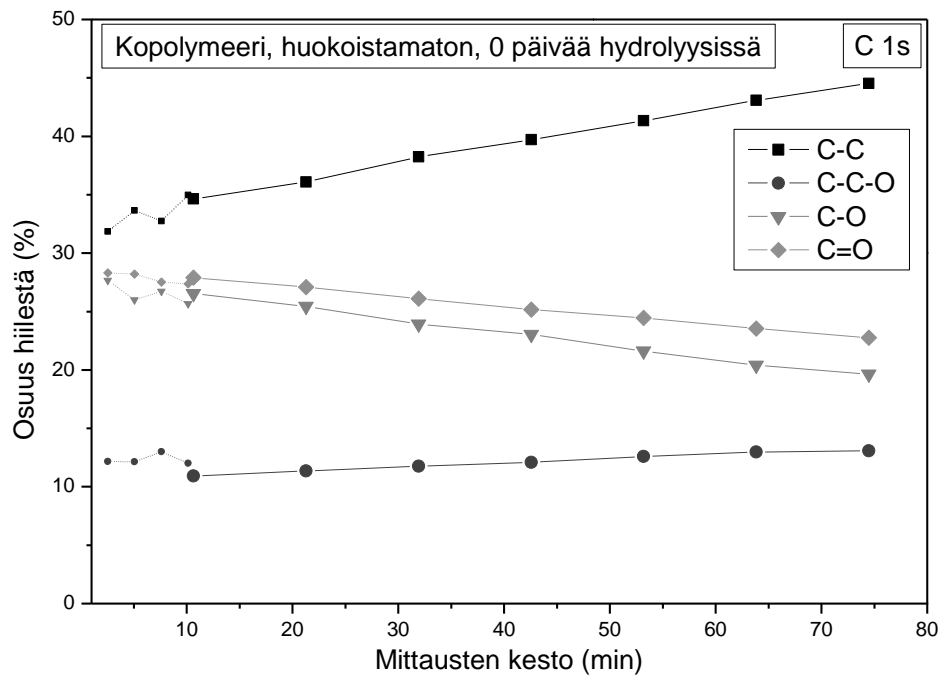
Ilmakehästä pinnalle adsorboituneita epäpuhtauksia ovat esimerkiksi hiilivedyt, sekä orgaaniset että epäorgaaniset rikin ja typen yhdisteet. [20] Rikkiä ja typpeä mittauksissa ei havaittu, mutta epäpuhtaushiilivetyjä pinnalla voi olla. Epäpuhtaushiilen ja -hapen määriä on vaikea arvioida johtuen näytemateriaalin omasta koostumuksesta, jossa on myös hiiltä ja happea. Huomioidaan lisäksi, että käsiteltäessä suhteellisten pintakonsentraatioiden muutoksia jonkin alkuaineen tai tilan suhteellisen konsentraation laskiessa toisen tilan suhteellisen konsentraation pitää kasvaa. Tästä syystä kuvassa 5.5 näyttää, että C-C-O-sidosten suhteellinen osuus kasvaa. Todellisuudessa varsinaisten sidosten määrä ei kasva, niistä tuleva signaali vahvistuu epäpuhtauksien määrän pienentyessä.

Voidaan siis todeta, että tyhjiössä pumppauksessa olemisen ei vuorokaudessa vaikuta merkittävästi mitattavan näytteen koostumukseen. Näytteitä ei ladattu tyhjiöön esimerkiksi viikonlopun ajaksi vaan ladatut näytteet pyrittiin mittaamaan seuraavan

vuorokauden aikana. Näin ollen tulokset on saatu samalla tavalla ilman merkittäviä muutoksia tyhjiössäoloajassa.

### 5.3.2 Mittausten vaikutus näytteen pintaan

Mittausten aikana näytteen pintaan kohdistuu fotonivuo röntgensäteilystä, lisäksi pinnan rakenteesta emittoituu fotoelektroneja. Näiden takia orgaaninen pinta on altis muuttumaan kemiallisesti tai rakenteellisesti XPS-mittausten aikana. [52] Seuraavassa kuvassa 5.6 on esitetty mittausten keston funktiona hiilen kemiallisten tilojen suhteelliset pintakonsentraatiot.



**Kuva 5.6:** Hiilen kemiallisten tilojen muutos mittausten aikana. Alun ohut viiva ja pienemmät pisteet kuvaavat viiden yksittäisen hiilen energiavälin mittauksen summaa ja isommat pisteet sekä viiva kuvaavat 21 yksittäisen hiilen energiavälin mittauksen summaa.

Mittauksessa hiilen spektriä mitattiin yksittäinen valittu energia-alue kerrallaan ja tallennettiin jokainen energiavälin mittaus erikseen. Näin ei siis pyritty laskemaan signaali-kohina-suhdetta mittaamalla samaa energia-aluetta useita kertoja ja laskemalla mittauspisteiden keskiarvoa. Tallentamalla jokainen energiavälin mittaus erikseen saatiin mitattuja spektrejä tallennettua lyhyin aikaväleihin. Yksittäisen energiavälin mittaus tallennuksineen (automaattisesti) kesti 30,4 sekuntia. Tulosten analysointivaiheessa yksittäisiä spektrejä kuitenkin laskettiin yhteen, koska todettiin, että muutos 21 yksittäisen mittauksen välillä on pieni. Näin saatiin luotettavimmat lopulliset tulokset signaali-kohina-suhteen parantuessa.

Lopullisissa mittauksissa, kuten luvussa 5.4 kerrotaan, hiili mitataan kuitenkin ensimmäisenä alkuaineena yleisspektrin mittauksen jälkeen. Näin ollen hiilen mittaus

varsinaisissa biohajoavuuden alkuvaiheen tutkimuksissa alkaa, kun mittauksissa on kulunut noin viisi minuuttia. Hiilen mittaus normaalissa mittausjärjestelyssä kestää noin viisi minuuttia. Tästä syystä ensimmäiset kymmenen minuuttia hiilen kemiallisten tilojen muutoksessa ovat oleelliset. Summattaessa 21 yksittäistä energiavälin mittausta yhteen ensimmäinen piste saadaan kohdalle, jossa näyte on ollut altistuneena röntgensäteilylle noin kymmenen minuutin ajan. Tästä syystä alkuosan mittauksille on tehty summausta kahdella tavalla. Normaalisti summattiin 21 yksittäistä mittausta, jolloin signaali-kohina-suhde muodostui hyväksi ja sovitteet olivat luotettavimmat. Lisäksi on summattu vain viisi yksittäistä hiilen energiavälin mittausta ja kyseiset pisteet on piirretty kuvaan pienempinä ja ohuemmin viivoin yhdistettynä. Näin saatiin tutkittua muutoksia lyhemmällä aikavälillä mittausten alussa.

Kuten kuvasta 5.6 voidaan huomioida, viiden yksittäisen hiilen energiavälin mittauksen summauksen tuloksena saadut pisteet ovat epätarkempia. Ensimmäinen iso piste on kuitenkin summa 21 ensimmäisestä mittauksesta eli toistettuna alun yksittäisten pisteiden summa. Kuvasta 5.6 voidaan havaita, että pinnan rakenne muuttuu röntgensäteilyn vaikutuksesta. Röntgensäteily siis muokkaa pintaa. Tämän seurauksena samaa näytettä ei voida tutkia pitkiä aikoja, vaan kunkin näytteen kohdalla on pyrittävä toistamaan mittaus samalla tavalla. Tällöin mahdolliset muutokset ovat kaikissa näytteissä samanlaiset ja vertailukelpoisuus näytteiden välillä säilyy. Samalla tämä tarkoittaa, että näytteitä ei voida tutkia paikan funktiona tai samaa näytettä ja sen tyhjiökäyttäytymistä ei voida tutkia useana päivänä tai useasta paikasta.

Vastaavat mittaukset röntgensäteilyn vaikutuksesta tehtiin myös hapen ja kalsiumin tarkkuusspektreillä, mutta niissä ei havaittu merkittäviä muutoksia. Kyseiset tarkkuusspektrit ja myös hiilen tarkkuusspektrit ovat nähtävissä liitteessä B. Lopputuloksena tästä mittauksista määrittävästä tutkimuksesta työhön jäi mittausproseduurin tarkka suunnittelu ja toisto jokaisen näytteen kohdalla. Kun tietyn näytteen mittaus aloitetaan on kyseisen näytteen informaatio kerättävä kerralla, eikä myöhempiin tarkentaviin mittauksiin ole mahdollisuutta.

### 5.3.3 Emissiokulman määrittäminen

Sen lisäksi, että tutkittiin näytteessä tapahtuvia mahdollisia muutoksia mittausten ja tyhjiössäolon aikana, oli määrittävä myös mittauksissa käytettävä emissiokulma. Varsinainen kulmaerotteinen XPS-mittaus ei ollut mahdollinen, koska näyte muuttuu röntgensäteilyn aikana. Kulmaerotteisessa XPS-mittauksessa samaa mittausalaa mitataan eri emissiokulmilla, jolloin saavutettu informaationsyvyys vaihtuu ja voidaan tutkia näytteen pinnan syvyysprofiilia. Emissiokulman vaikutusta on esitelty luvussa 4.6. Näytteen huokoisuudesta johtuen optimaalisen emissiokulman pohtiminen on erityisen tärkeää, jotta saavutetaan mahdollisimman hyvä intensiteettitaso. Lisäksi se, että röntgensäteily muokkaa näytteen pintaa, tekee emissiokulman, kuten muidenkin mittausteknisten asioiden, pohtimisen erityisen tärkeäksi heti tutkimuksen alkuvaiheessa.

Parhaan emissiokulman määrittämiseksi tutkittiin eri emissiokulmalla mitattujen spektrien intensiteettiä. Emissiokulman vaikutuksen tutkimiseen emissiokulmiksi valikoituivat nollakulman lisäksi usein kirjallisuudessa raportoidut 60 asteen kulma ja 45 asteen kulma sekä kirjallisuudessa esiin noussut 35 asteen kulma. Lisäksi tutkittiin kirjallisuutta mainitusta ”magic angle” -kulmasta sekä aiheeseen liittyviä tutkimuksia, joita on esitelty myös luvussa 4.6. Kaiken kaikkiaan optimaalisimmaksi emissiokulmaksi valikoitui 45 asteen emissiokulma, koska intensiteetti kyseisellä kulmalla oli paras, ja sitä käytettiin kaikissa työn mittauksissa. Kulman valinnasta ja sen taustalla olevasta teoriasta on kerrottu tarkemmin luvussa 4.6.

#### 5.4 Suoritetut mittaukset

Näytteet säilytettiin ennen mittauksia lasipurkeissa valolta suojatussa eksikaattorikaapissa. Jotta mittaukset toistuisivat mahdollisimman hyvin ja olisivat vertailukelpoisia pyrittiin näytteen kulku mittaukseen sekä mittausten suoritus toistamaan jokaisen näytteen kohdalla samalla tavalla. Seuraavassa kuvataan yksittäisen näytteen kulku mittaukseen ja mittausten suoritus.

Näyte ladattiin tyhjiöön mittauksia edeltävänä päivänä. Tuolloin hetki ennen latausta kyseinen näyte otettiin pois eksikaattorikaapista ja lasipurkista ja se kiinnitettiin kuvan 5.7 mukaisesti Multilab-laitteistoon soveltuvaan näytteenpitimeen. Pinta-analyytisessä tutkimuksessa on tärkeää, että mitattava pinta ei kosketa muita materiaaleja, joilta pinnalle voisi siirtyä epäpuhtautta. Tästä syystä näytteitä käsiteltiin pinseteillä varoen. Yksittäisen näytteen mittaussala sijaitsi keskellä näytteenpidintä, jolloin se oli myös näytteenpitimeen asetetun näytteen keskivaiheilla. Kun näyte oli kiinnitetty näytteenpitimeen, näytteenpidin ladattiin laitteistoon FEAL-kammion kautta, kuten luvussa 5.2 on kuvattu.



*Kuva 5.7: Näyte ja näytteenpidin valmiina ladattavaksi Multilab-laitteistoon. Kuvassa oleva näyte on 40 m-% TCP:a sisältävä huokoistettu näyte.*

FEAL-kammion pumppautuminen kesti parista tunnista muutamaan tuntiin ja riippui myös ladattujen näytteiden määrästä ja laadusta. Työssä tutkitut ja puskuri-

liuoksessa olleet näytteet olivat keränneet mm. ilmankosteutta (vaikka ne säilytettiin eksikaattorikaapissa), ilmankosteuden ja muiden näytteessä olevien irrallisten epäpuhauksien takia tyhjiön pumppautuminen kesti kauemmin kuin esimerkiksi usein mittauksessa olevilla erilaisilla metallinäytteillä. Mitä huokoisempi näyte oli ja mitä useampia huokoisia näytteitä kerralla ladattiin, sitä pidempään pumppautuminen kesti. Pitkän pumppausajan takia mittauspäivät jaksottuivat siten, että iltapäivällä päivän mittauksen päätteeksi mitatut näytteet tuotiin pois laitteistosta ja tilalle ladattiin uudet seuraavana päivänä mitattavat näytteet. Näin ollen seuraavana aamuna tyhjiö oli pumppautunut hyvin ja laitteistossa oli ladattuna kolme näytettä mitattavaksi päivän aikana. Tämä näytteiden kulku laitteistoon pumppaukseen ja mittauksen suoritus oli tärkeää hoitaa vuorokaudessa, koska ennen tässä työssä varsinaisesti tutkittua biohajoamisen alkuvaiheiden tutkimusta, oli varmistettu, että vuorokauden aikana näytteet eivät muutu tyhjiössä merkittävästi.

Kun näyte tai useat näytteet oli ladattu ja FEAL-kammio pumppautunut laitteiston vaatimaan tyhjiöön, mitattava näyte voitiin siirtää preparaatiokammion kautta analyysikammioon ja mittauspaikalle. Mittauksen käynnistyksen yhteydessä tehtävät toimenpiteet tehtiin aina samassa järjestyksessä, jotta näyte altistuisi röntgensäteilylle ennen jokaista mittausta mahdollisimman vähän aikaa ja toisaalta saman ajan eri näytteiden välillä. Näytteenpidin siirrettiin ensin manipulaattoriin näytteenpitimelle varattuun paikkaan. Sitten käynnistettiin röntgentykki ja mittauksen edellyttämät muut laitteet. Vasta kun kaikki oli valmista, näytteenpidin ja näyte tuotiin röntgentykin alle, tykki laskettiin alas lähelle näytettä ja mittaukset käynnistettiin.

Mitattavat spektrit mitattiin aina samassa järjestyksessä; mittaukset aloitettiin FRR-moodilla mitatulla yleisspektrin mittauksella, sen jälkeen mitattiin materiaalin sisältämien alkuaineiden tarkkuusspektrit FAT-moodilla seuraavassa järjestyksessä: hiili, happi, kalsium ja fosfori. Näiden työn kannalta oleellisimpien mittauksen jälkeen mitattiin näytteen pinnalla mahdollisesti havaittujen muiden alkuaineiden tarkkuusspektrit ja Auger-piikkien tarkkuusspektrit. Lopuksi mitattiin vielä yleisspektri FAT-moodilla. Yksittäisen näytteen mittaus kesti 1 – 1,5 tuntia. Ajan vaihtelun aiheutti se, että 100% PLCL-näytteillä ei luonnollisesti ollut trikalsiumfosfaatin alkuaineita eli kalsiumia ja fosforia, joten niiden mittaukset jäivät kyseisten näytteiden kohdalla pois.

Tämän työn varsinaisen tutkimuksen, huokoisen komposiitin biohajoavuuden alkuvaiheiden tutkimuksen mitatut näytteet on esitetty taulukossa 5.1. Taulukosta 5.1 puuttuvat aiemmin luvussa 5 kerrottujen mittausteknisiin asioihin keskittyvien näytteiden mittaukset. Taulukosta puuttuvat myös referenssinäytteiden mittaukset. Referenssinäytteinä mitattiin homogeeninen poly(L-laktidi) ja homogeeninen polykaprolaktoni. Molemmat referenssinäytteet olivat huokoistamattomia. Ennen tämän työn aloitusta Pintatieteen laboratoriossa oli lisäksi mitattu tässä työssä referenssinä käytetty trikalsiumfosfaatin referenssinäyte. Joidenkin näytteiden mittaus piti myös toistaa, koska tuloksena saadut spektrit poikkesivat muiden mitattujen spektrien trendistä huomattavasti. Toistettavien näytteiden mittauksista tuloksi on merkitty

virhepalkit. Koska näytteen pinta muuttuu röntgensäteilyn vaikutuksesta, toistomittaukset suoritettiin rinnakkaisella näytteellä.

**Taulukko 5.1:** Suoritettu mittaussarja ja näytteiden systemaattinen nimi. Systemaattinen nimeäminen on esitelty liitteessä A.

Hydro- lyysi aika (d)	Näytetyyppi					
	Kopolymeeri		Komposiitti, 40% TCP		Komposiitti, 60% TCP	
	Huokois- tamaton	Huokoi- nen	Huokoista- maton	Huokoi- nen	Huokoista- maton	Huokoi- nen
0	10001	11001	20001	21001	30001	31001
1	10011	11011	20011	21011	30011	31011
3	10031	11031	20031	21031	30031	31031
7	10071	11071	20071	21071	30071	31071
14	10141	11141	20141	21141	30141	31141
85	10851	11851	20851	21851	30851	31851

Spektrit on mitattu käyttäen ohjelman VGX-900 versiota 8.4-A-A. Tarkkuusspektrien mittauksessa FAT-moodilla läpäisyenergiana käytettiin 20 eV ja mittauspisteiden väli oli 0,1 eV. Mittausten aikana näytteen pinta muuttui ja pinnalta desorboitui hiukkasia. Desorptio näkyy analyysikammion paineen nousuna. Ennen mittauksia analyysikammion paine oli  $10^{-10}$  torr. Kun näytteenpidin ja näyte oli tuotu kammioon ja asetettu manipulaattoriin ja röntgentykki oli viritetty, mutta sitä ei oltu vielä kohdistettu näytteelle, kammion paine nousi  $10^{-9}$  torr:iin. Näytteen vieminen mittaustaikalle röntgentykin alle ja röntgentykin laskeminen lähelle näytettä nostivat paineen  $1 \cdot 10^{-8}$  torr:iin. Näytteen mittauksen edetessä paine analyysikammiossa nousi edelleen näytteestä ja sen huokoisuudesta riippuen aina  $5 \cdot 10^{-8}$  torr:iin asti. Paineen käyttäytymistä seurattiin mittausten aikana ja painelukemia kirjattiin ylös. Mikäli selviä poikkeamia muista mittauksista tai paineen nousua korkeammalle olisi havaittu, mittaus olisi keskeytetty ja asiaan olisi puututtu.

## 5.5 Sovitusparametrien haku

Tämän työn spektrit on analysoitu käyttäen ohjelmaa Casa XPS ja sen versiota 2.3.16. Yleisspektrin alkuaineiden tunnistuksessa käytettiin Casa XPS -ohjelman alkuainekirjastoa ja lisäksi lähteiden [38, 53] tietokantoja. Mittauksissa saatuihin spektreihin tehtiin ensimmäisenä taustanvähennys käyttäen Shirley-algoritmia. Taustan vähennyksen jälkeen mitatussa spektrissä näkyviin piikkeihin luotiin sovitepiikit, joiden summakäyrän oli tarkoitus kuvata mitattua spektriä mahdollisimman hyvin. Soviteparametreja vaihdeltiin ja pyrittiin löytämään parametrit, joilla mitattu ja sovitettu piikki yhtyisivät mahdollisimman hyvin toisiinsa. Työssä tutkittujen näytteiden luonteen takia hyvien soviteparametrien löytäminen oli työlästä. Materiaalit koostuvat, kuten aiemmin on esitelty, kopolymeerin ja keraamin muodostamasta komposiitista. Näiden materiaalien perusteella pinnalla esiintyviä alkuaineita olivat hiili, happi, kalsium ja fosfori. Lisäksi

puskuriliuos, jossa näytteen biohajoavuus tapahtui, sisälsi fosforia. Puskuriliuoksen muut alkuaineet olivat natrium, kalium ja happi. Kopolymeerin kahdesta eri monomeerista tulevien signaalien erottaminen oli haastavaa, koska monomeerit ovat sidoksiltaan hyvin toistensa kaltaiset. Myös hapen tarkkuusspektrin sovitukset olivat energiasiirtymien päällekkäisyyksien takia haastavia.

Työn hiilen ja hapen sovitteiden apuna on käytetty Polymer Database -tietokannan [54] määrittämiä sovitteiden parametreja homogeenisille polymeereille, poly(L-laktidi):lle ja polykaprolaktonille. Vastaavat referenssinäytteet on mitattu tässä työssä käytetyllä Multilab-laitteistolla ja Polymer Database -tietokannan sekä mitattujen referenssien vertailulla on vakuutettu mitattujen referenssien ja niiden sovitteiden pätevyydestä. Polymer Database -tietokannan spektrit on mitattu käyttäen 45 asteen emissio- $\text{C}$ -kulmaa ja kyseiset mittaukset on kalibroitu C-C-sidoksen energian mukaan siten, että energia on 285.00 eV. [54] Näiden mittaus- ja sovitusteknisten asioiden suhteen tietokannan ja tämän työn mittausten spektrit ovat vertailukelpoisia.

Taulukossa 5.2 on esitetty Polymer Database -tietokannan [54] määrittämät mitattujen piikkien sovitteiden parametrit ja vastaavat tässä työssä Multilab-laitteistolla mitattuihin referenssispektreihin tehtyjen sovitteiden tiedot. Multilab-laitteistolla mitattuihin referenssispektreihin sovitteet tehtiin ilman mitään sidontoja Casa XPS -ohjelmalla. Ainoastaan taulukossa punaisella kirjoitettu sovitteipiikki oli sidottava polymeeritietokannan parametreilla, koska kyseisen piikin energiasiirtymä ja suhteellinen korkeus olivat pieniä verrattuna C-C-sidoksen piikkiin. Näistä syistä ko. piikin erottaminen muista piikeistä ja sovittaminen Multilab-laitteistolla mitattuun spektriin ilman sidontaa oli mahdotonta.

Taulukko 5.2 on jakautunut kahteen osaan, ylempänä on Polymer Database -tietokannasta [54] kopioidut sovitteiden tiedot ja alempana Multilab-laitteistolla mitattuihin referenssispektreihin tehdyistä sovitteista otetut tiedot. Taulukossa on erikseen sarakkeet hiilen 1s-orbitaalin ja hapen 1s-orbitaalin signaalille. Lisäksi taulukon rivit on ryhmitelty siten, että eri monomeerien parametrit erottuvat toisistaan. Molempien alkuaineiden signaaleista taulukkoon on määritetty sidosenegian arvo  $E_B$ , tietyn piikin sidosenegian arvon erotus ko. monomeerin ja alkuaineen pienimmällä sidosenegialla olevan piikin sidosenegiaa, piikin puoliarvonleveys, puoliarvonleveyden suhde ko. monomeerin ja alkuaineen pienimmällä sidosenegialla olevan piikin puoliarvonleveyteen ja suhteellinen pinta-ala. Taulukosta 5.2 voidaan havaita, että Casa XPS -ohjelman vapaat sovitukset mitattuihin spektreihin yhtyvät todella hyvin polymeeritietokannan [54] sovitteisiin.

Poly(L-laktidi):ssa (PLLA) hiili on sitoutunut kolmella erilaisella tavalla: polymeeriketjussa on C-C-sidoksia, C-O-sidoksia ja O=C-O-sidoksia. Poly(L-laktidi):n monomeerin on esitetty kuvassa 3.2. Vastaavia hiilen eri sidoksia kuvaavat kolme sovitteipiikkiä, joiden tiedot taulukossa on esitetty. Polykaprolaktonissa (PCL) hiilen erilaisia sidoksia voidaan havaita neljä: C-C-sidos, C-O-sidos, O=C-O-sidos sekä  $\underline{\text{C}}$ -COO-sidos. Myös näitä eri sidoksia vastaavat piikkien sovitusten tiedot löytyvät taulukosta ja polykaprolaktonimonomeeri on esitetty kuvassa 3.3.



**Taulukko 5.2:** Polymer Database referenssien ja Multilab-laitteistolla mitattujen referenssien vertailu. Taulukossa  $E_B$  on piikin sidosenergia ja FWHM on piikin puoliarvonleveys.

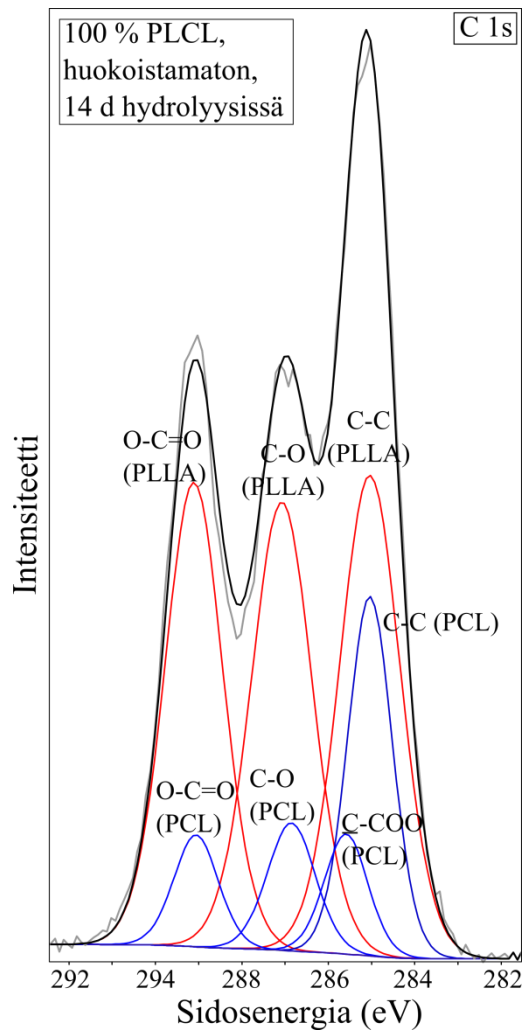
	Polymer Database -tietokannan referenssit									
	C 1s					O 1s				
	$E_B$	erotus	FWHM	suhde	Pinta-ala (%)	$E_B$	erotus	FWHM	suhde	Pinta-ala (%)
PLLA										
C-C	285.00	0.00	1.19	1.00	36.00					
C-O	286.98	1.98	1.07	0.90	33.00	533.66	1.41	1.31	1.07	50.00
C=O	289.06	4.06	0.97	0.82	31.00	532.25	0.00	1.23	1.00	50.00
PCL										
C-C	285.00	0.00	0.94	1.00	52.00					
<u>C</u> -COO	285.55	0.55	0.92	0.98	17.00					
C-O	286.54	1.54	1.07	1.14	17.00	533.54	1.30	1.31	1.15	50.00
C=O	289.08	4.08	0.88	0.94	14.00	532.24	0.00	1.14	1.00	50.00
	Multilab-laitteistolla mitatut referenssit									
	C 1s					O 1s				
	$E_B$	erotus	FWHM	suhde	Pinta-ala (%)	$E_B$	erotus	FWHM	suhde	Pinta-ala (%)
PLLA										
C-C	285.00	0.00	1.78	1.00	35.00					
C-O	286.94	1.94	1.79	1.00	32.72	533.26	1.42	2.02	1.11	56.52
C=O	289.02	4.02	1.70	0.95	32.28	531.84	0.00	1.82	1.00	43.48
PCL										
C-C	285.00	0.00	1.31	1.00	49.53					
<u>C</u> -COO	285.55	0.55	1.29	0.98	16.19					
C-O	286.62	1.62	1.41	1.07	18.97	533.08	1.36	1.74	1.14	56.10
C=O	289.02	4.02	1.30	0.99	15.31	531.72	0.00	1.52	1.00	43.90

Taulukosta 5.2 pitää huomioida myös, että poly(L-laktidi):ssa ja polykaprolaktonissa C-O-sidoksen hiilen siirtymät poikkeavat toisistaan. Poly(L-laktidi):n monomeerin lyhyen hiiliketjun takia, C-O-sitoutuneen hiilen sisäkuorten elektroneihin vaikuttaa myös esteriryhmän läheisyys, kuten polykaprolaktonissa C-COO-sitoutuneessa hiilessä.

Ero mitattujen referenssien ja polymeeritietokannan referenssien välillä on hyvin pieni ja työssä onkin käytetty Multilab-laitteiston referenssimittauksiin perustuvia sovitteparametreja. Havaittuja eroja mitattujen ja kirjallisuuden referenssien välillä on lähinnä suhteellisissa pinta-aloissa. Erot voivat johtua esimerkiksi epäpuhtauksista pinnalla. Työn biohajoavuuden alkuvaiheiden mittausten näytteille ei tehty puhdistuksia tyhjiössä vaan ne mitattiin toimitustilaisina. Tämän takia tässä työssä mitatuille referenssinäytteillekään ei tehty toimituksen jälkeen mitään. Koska sekä varsinaisten tutkimusnäytteiden että referenssinäytteiden käsittely ja mittaukset ovat samanlaisia, voidaan

olettaa, että epäpuhtaus on samaa suuruusluokkaa sekä referenssinäytteissä että työn varsinaisissa mittauksissa. Tällöin referenssimittauksiin perustuvien sovitteiden voidaan olettaa sopivan myös biohajoavuuden mittausten näytteiden spektreihin. Oletus osoittautui oikeaksi ja sovitteet sopivat koko mittaussarjaan.

Hyvin kirjallisuuteen yhtyvien referenssimittausten avulla luotiin uusi sovitustapa työssä tutkittujen näytteiden hiilen tarkkuusspektreihin. Kuvassa 5.8 on esitetty esimerkkispektri, jossa sovitetut piikit näkyvät.



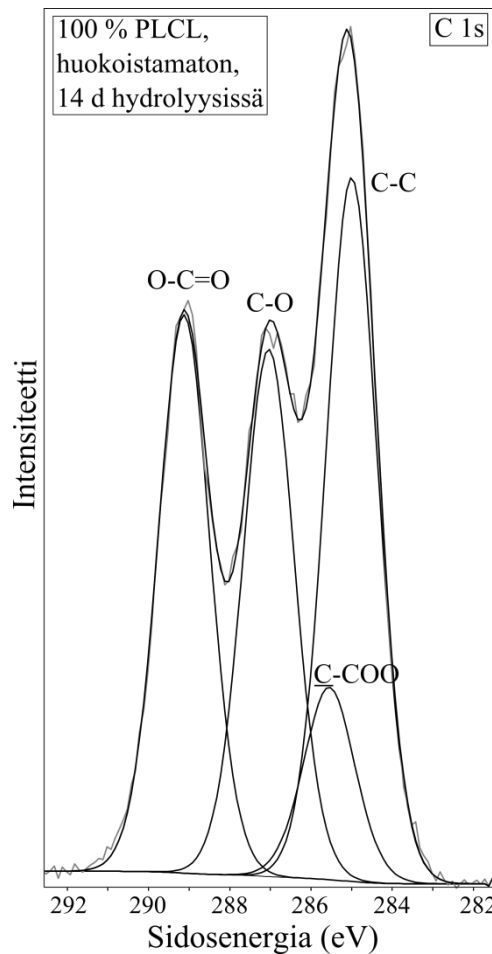
**Kuva 5.8:** Hiilen tarkkuusspektri, johon on tehty sovitus seitsemällä keskenään tiukasti sidotulla piikillä. Kuvassa PLLA:n sidoksia kuvaavat piikit ovat punaisella ja PCL:n piikit sinisellä.

Yleisesti XPS-spektreihin tehdään sovitepiikki vastaamaan jokaista mitattua piikkiä ja toisaalta jokaista pinnalla oletettua tilaa. Näin pyritään löytämään sovitus, jolla sovitteiden summakäyrä yhtyy hyvin mitattuun spektriin. Tässä työssä normaalista poikkeava sovitustapa luotiin, jotta voitiin erottaa kopolyesterin eri monomeereista tuleva signaali. Työssä luotu sovitustapa hyödynsi kahden eri monomeerin hiilen piikkien eroavaisuuksia. Kuten taulukosta 5.2 voidaan havaita PLLA-monomeerin ja PCL-monomeerin hii-

len tiettyjen tilojen sidosenergioiden siirtymät ovat monomeerille tyypillisiä. Molemmista referensseistä varsinaisen tutkittavan materiaalin hiilen spektrin sovitukseseen tuotiin oma ryhmä sovitepiikkejä.

Sovituksissa on käytetty tiukkoja sidontoja piikkien välillä. Sidonnat perustuvat täysin Multilab-laitteistolla mitattujen referenssien sovituksiin ja ovat nähtävillä liitteessä A. Edellisen kuvan 5.8 sovituksessa PLLA-monomeerista tulevien piikkien paikat, puoliarvonleveydet ja suhteelliset pinta-alat on sidottu toisiinsa. Vastaavat sidonnat ovat PCL-monomeerista tulevien piikkien välillä. Ensisijaisesti piikit on sidottu vain saman monomeerin signaalin muihin piikkeihin, mutta sen lisäksi polykaprolaktonin piikkien puoliarvonleveydet on sidottu poly(L-laktidi):n piikkien puoliarvonleveyksiin. Kyseisillä sovituspärametreilla sovitettavat piikit sopivat kaikkiin työssä mitattuihin hiilen spektreihin. Tämä kuvassa 5.8 esitetty sovitus hiilen spektrissä kertoo kahden eri monomeerin suhteellisten osuuksien muutoksesta mittausten välillä. Erikseen hiileen on tehty sovituksia, joissa sovitepiikit vastaavat vain kemiallisia tiloja ja eri monomeerien signaaleja ei eroteta. Tällöin piikkien välillä ei vaadita tiukkoja sidontoja, jolloin eri kemiallisten tilojen hiilten suhteellisten osuuksien muutoksia voidaan tarkastella.

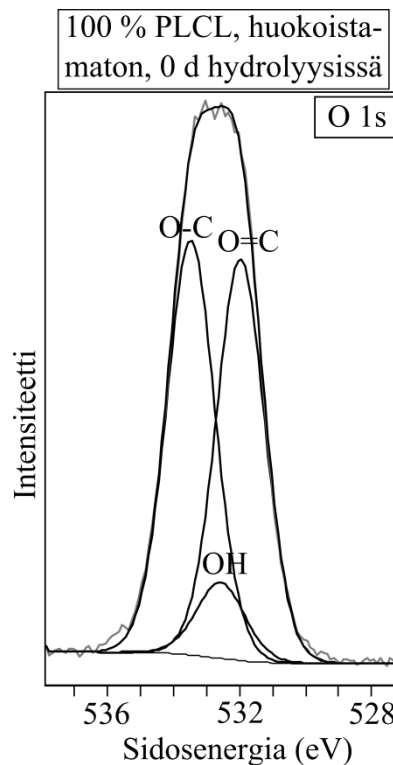
Kuvassa 5.9 on esitetty hiilen spektri, jossa on sovitus neljälle eri kemiallisen tilan piikillä.



**Kuva 5.9:** Hiilen tarkkuusspektri, johon on tehty sovitus neljällä eri kemiallisen tilan piikillä.

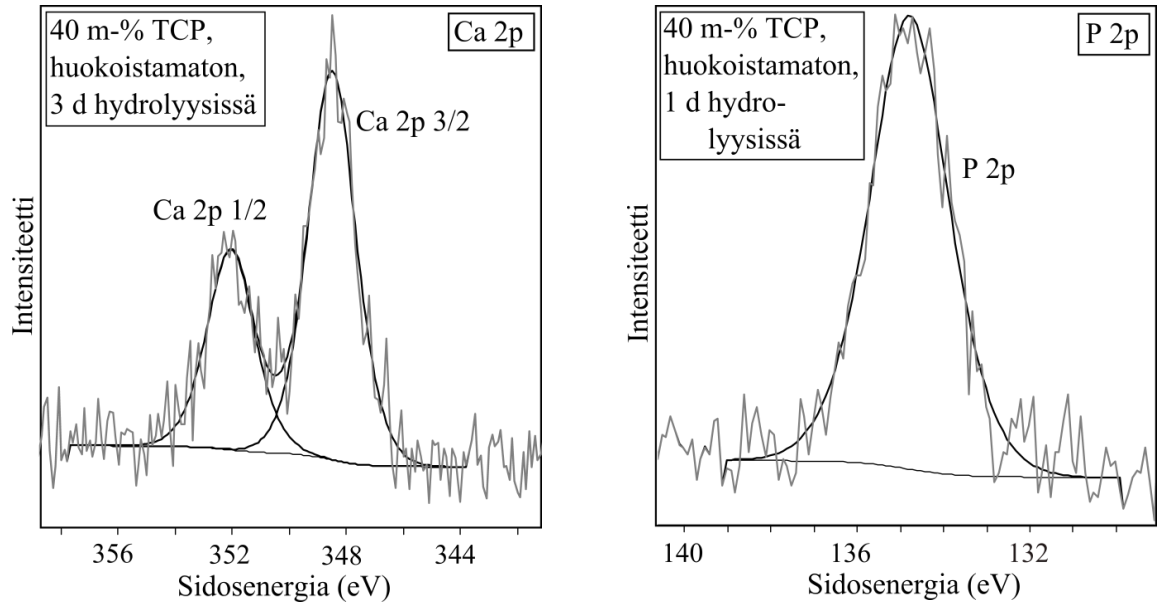
Kyseisessä sovituksessa ei voitu erotella eri monomeereista tulevaa signaalia, erotettavissa ovat vain eri hiilen kemiallisista tiloista tulevat signaalit. Sovituksissa hyödynnettiin myös edellä esiteltyjä referenssejä, sekä mitattuja että Polymer Database -tietokantaan [54] perustuvia. Hiilen spektristä voidaan erottaa neljä erilaista tilaa, joista kolme erottuvat selkeinä huippuina. Neljäs tila eli  $\underline{\text{C}}\text{-COO}$ -sitoutuvan hiilen piikki piti sitoa tietokannan antamalle energiaerolle 0,55 eV C-C-tilan piikistä. Kyseistä pientä piikkiä lukuun ottamatta ohjelma (Casa XPS) sovitti piikit hyvin optimoiden sovituksen sopivuuden mitattuun dataan.

Myös hapen tarkkuusspektriin tehtiin sovitteet eri kemiallisille tiloille. Sekä poly(L-laktidi):ssa että polykaprolaktonissa havaitaan esteriryhmän kaksi eri tavalla sitoutunutta happiatomia, sekä kaksois- että yksöissidoksella hiileen sitoutunut. Kyseiset signaalit saatiin erotettua mitatusta spektristä kahtena toisistaan eroavan sovitepiikkienä. Lisäksi polymeerin pääteryhmissä esiintyy hydroksyyli-ryhmä (-OH), jota voi esiintyä myös pinnan epäpuhtautena. Kyseisen hydroksyyli-ryhmän energiasiirtymä on keskellä esteriryhmien kahden eri happiatomin energiasiirtymiä. [6, s. 56] Hydroksyyli-ryhmä sovitui kuitenkin energiasidonnoilla hyvin toistuvasti kaikkiin mittauksiin. Hydroksyyli-ryhmän tutkiminen on tärkeää biohajoavuuden tutkimisessa, koska polymeeriketjun pilkkoutumien lisää hydroksyyli-ryhmien määrää. Kuvassa 5.10 on esitetty esimerkkinä hapen spektri, jossa ovat työssä käytetyt sovitteet.



**Kuva 5.10:** Hapen tarkkuusspektri, johon on tehty sovitus kolmella eri kemiallisen tilan piikillä.

Edellä esiteltyjen kopolymeerin eri tavalla sitoutuneiden happiatomien lisäksi materiaalissa seosaineena olevassa trikalsiumfosfaatissa on happea. Trikalsiumfosfaatin happi on fosfaattiryhmässä ( $\text{PO}_4$ ), mutta sen energiiasiirtymä on eri lähteistä katsottuna aina kopolymeerista tulevien vahvojen hapen signaalien kanssa päällekkäin. [55-57, 53] Näin ollen fosfaatin hapen kemiallisen tilan sovitepiikkiä ei saatu sovitettua hapen spektriin. Trikalsiumfosfaatissa esiintyviä muita alkuaineita ovat kalsium ja fosfori. Molemmilta alkuaineilta mitattiin FAT-moodilla tarkkuusspektri ja niihin tehtiin tiloja vastaavat sovitukset. Kuvassa 5.11 on esitetty kalsiumin ja fosforin tarkkuusspektrit.



**Kuva 5.11:** Vasemmalla kalsiumin ja oikealla fosforin tarkkuusspektri ja niihin tehdyt sovitteet.

Kummankaan alkuaineen sitoutumisessa ei havaittu muutoksia työn näytteiden välillä. Näin ollen alkuaineiden signaaleista analysoitiin vain kyseisen alkuaineen määrä pinnalla. Huomionarvoista on myös, että puskuriliuos, jossa näytteitä ikäytettiin, sisälsi fosfaatteja, kuten aiemminkin on mainittu. Fosforin esiintyminen kahdessa eri yhteydessä teki fosforin suhteellisen pintakonsentraation biohajoavuuden seurauksena tapahtuvien muutosten analysoinnin mahdottomaksi. Kalsium oli kuitenkin alkuaine, jota esiintyi vain trikalsiumfosfaatissa ja sen perusteella trikalsiumfosfaatin määrä pinnalla voitiin analysoida.

Kalsiumin tarkkuusspektriin on sovitettu erikseen  $2p_{3/2}$ - ja  $2p_{1/2}$ -tilat, joiden energiaerotus perustuu kirjallisuuden arvoihin [53]. Fosforin  $2p$ -tilojen energiaero on kirjallisuudessa raportoitu niin pieneksi, että kyseisiä tiloja ei voitu sovittaa mitattuun fosforin spektriin erikseen. Kuten kuvasta 5.11 voidaan havaita signaali-kohina-suhde on kalsiumin ja fosforin tarkkuusspektreissä huomattavasti heikompi kuin hiilen ja hapen tarkkuusspektrien tapauksissa. Tämä johtuu siitä, että sekä kalsiumia että fosforia havaitaan hiileen ja happeen nähden vähän pinnalla. Kuvasta 5.11 on lisäksi huomioitava, että intensiteetit eivät ole vertailukelpoisia.

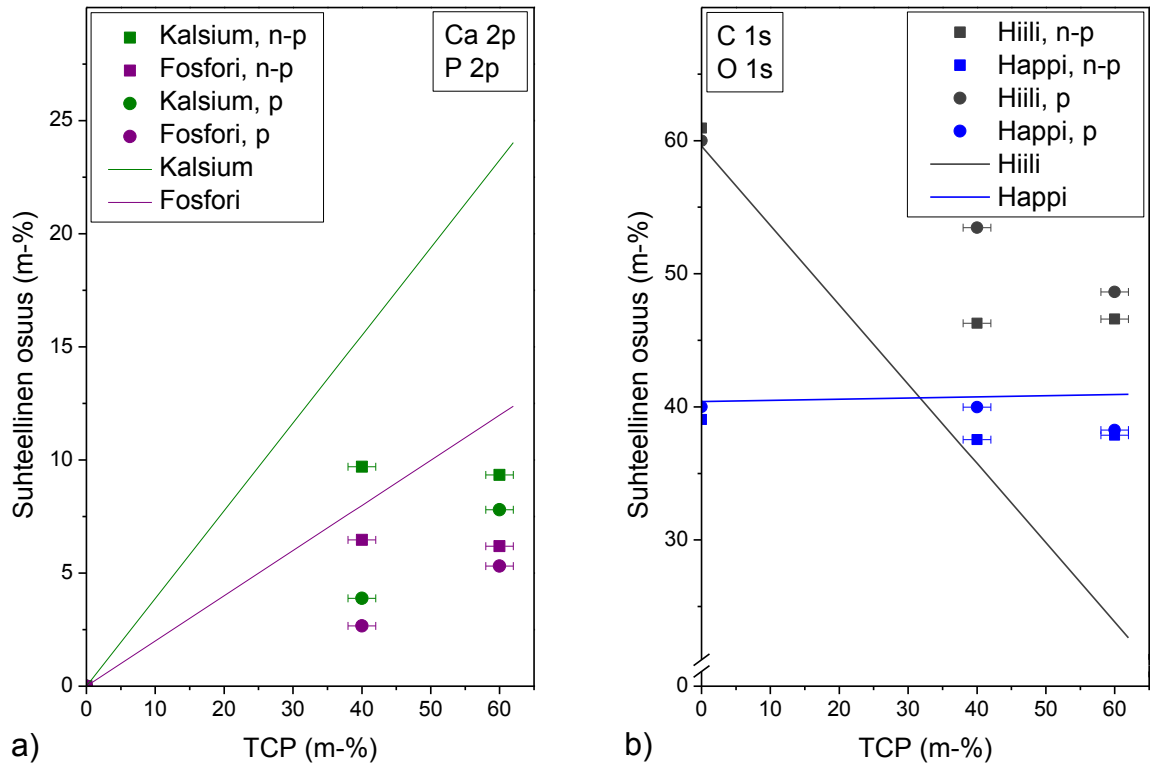
## 6 TUTKIMUSTULOKSET

Työssä tutkittiin huokoisen komposiittimateriaalin biohajoavuuden alkuvaiheita XPS-menetelmällä. Tutkitut näytteet voidaan jakaa kahteen luokkaan: näytteisiin, joita ei ole upotettu puskuriliuokseen, jossa biohajoaminen tapahtuu, ja näytteisiin, jotka ovat olleet puskuriliuoksessa ja siten mahdollinen biohajoaminen on voinut alkaa. Näytteitä, joita ei ole upotettu hydrolyysiliuokseen, kutsutaan lähtötilanteen näytteiksi ja niiltä määritettiin niiden pinnan alkuainekoostumus, jotta tiedetään tilanne, josta biohajoaminen käynnistyy. Hydrolyysiliuoksessa olleilta näytteiltä seurataan niiden muutoksia hydrolyysi-ajan funktiona. Käydään seuraavaksi läpi tutkimuksessa saavutettuja tuloksia.

### 6.1 Biohajoavan komposiitin pinta lähtötilanteessa

Työssä on tutkittu kolme erilaista näyttemateriaalia, kuten luvussa 5 on kerrottu. Näytteitä, jotka ovat 100 % kopolymeeria ja näytteitä, joiden valmistuksessa on käytetty joko 40 m-% tai 60 m-%  $\beta$ -trikalsiumfosfaattia, jolloin kopolymeeria on käytetty vastaavasti 60 m-% ja 40 m-% lopullisesta komposiitista. Eri näyttemateriaalien välillä vaihtelee siis valmistuksessa käytetyn  $\beta$ -trikalsiumfosfaatin määrä. Kuvissa 6.1a ja 6.1b lähtötilanteen näytteiden alkuaineiden mitatut massaprocentit on piirretty valmistuksessa käytetyn trikalsiumfosfaatin massaprocentin funktiona. Kuvissa 6.1a ja 6.1b kolme näytetyyppiä sijoittuvat vaaka-akselin kohtiin 0 m-%, 40 m-% ja 60 m-% trikalsiumfosfaattia. Mittauksissa ovat olleet materiaaleista sekä huokoiset (lyhenne p, porous) että huokoistamattomat (lyhenne n-p, non-porous) näytteet. Lisäksi valmistuksessa käytetyistä  $\beta$ -trikalsiumfosfaatin ja kopolymeerin massaprocenttiosuuksista on laskettu kunkin alkuaineen suhteellinen osuus massaprocenteissa. Alkuainekohtaiset lasketut arvot muodostavat kuviin 6.1a ja 6.1b suorat, joihin mitattuja arvoja voidaan verrata.

Kuvasta 6.1a, jossa on esitetty kalsiumin ja fosforin massaprocenttiosuudet, voidaan huomata, että sekä kalsiumia että fosforia on molempien trikalsiumfosfaattia sisältävien näytteiden pinnalla vähemmän, kuin sisäfaasissa. Vastaavasti kuvassa 6.1b on esitetty hiilen ja hapen massaprocentit ja kyseisestä kuvasta voidaan huomata, että hiiltä havaitaan selkeä ylimäärä niiden näytteiden pinnalla, joissa on trikalsiumfosfaattia pitäisi olla. Hapen määrä massaprocentteina on kaikilla näytteillä lähimpänä valmistuksessa käytetyistä määristä laskettua hapen massaprocenttia. Sekä trikalsiumfosfaatti että kopolymeeri sisältävät happea, jolloin happea voidaan havaita pinnalla riippumatta kumpi komposiitin osapuoli on vallitsevampi pintakoostumuksessa. Kuvasta 6.1b voidaan lisäksi huomata, että pelkästä kopolymeerista koostuvien näytteiden mitatut ja valmistuksessa käytetyistä arvoista lasketut massaprocenttiosuudet ovat lähellä toisiaan.



**Kuva 6.1:** a) Kalsiumin ja fosforin b) hiilen ja hapen massaprosentit sekä huokoiselta (lyhenne p) että huokoistamattomalta (lyhenne n-p) näytteeltä TCP:n massaprosentin funktiona. Lisäksi komposiitin valmistuksessa käytetyistä trikalسيومfosfaatin ja kopolymeerin massaprosenttiosuuksista lasketut komposiitin alkuaineiden sisäfaasin massaprosenttiosuudet viivoina molemmissa kuvissa.

Kalsiumin ja fosforin alimäärä sekä hiilen ylimäärä viittaavat siihen, että trikalسيومfosfaattia ei havaita pinnalla sisäfaasin koostumuksen mukaista määrää lähtötilanteessa ennen biohajoamisen käynnistymistä. Trikalسيومfosfaatin alimäärä voi selittyä useallakin erilaisella pintajärjestäytymisellä. Trikalسيومfosfaatti voi olla esimerkiksi materiaalissa syvemmillä, jolloin siitä tuleva signaali on heikompi. Tällöin pinta on kopolymeeririkkaampi. Tämän työn pinta-analyttisessä tutkimuksessa trikalسيومfosfaatin kalsium voidaan havaita noin kuuden nanometrin syvyydeltä. [58] Trikalسيومfosfaattia voidaan siis havaita pieni osuus, vaikka se ei olisi aivan päällimmäisessä kerroksessa. Trikalسيومfosfaatin kaksi tehtävää materiaalissa ovat kopolymeerin hydrofobisuuden muokkaaminen hydrofiiliseen suuntaan ja kopolymeerin mekaanisten ominaisuuksien (liian joustava) muokkaaminen jäykempään ja kantavampaan suuntaan. Molemmat näistä tehtävistä voivat täytyä, vaikka trikalسيومfosfaattia ei olisikaan aivan päällimmäisissä kerroksissa. Trikalسيومfosfaatti on kuitenkin solujen tarttumisen kannalta merkittävä materiaali ja sen tulisi olla solujen ulottuvissa.

Trikalسيومfosfaatin pieni suhteellinen pintakonsentraatio voi johtua myös trikalسيومfosfaatin klusteroitumisesta materiaalissa, jolloin sen kokonaismäärän kasvattaminen ei kasvattaisi enää havaittujen trikalسيومfosfaattiesiintymien määrää vaan se kas-

vattaisi vain trikalsiumfosfaatin klustereiden kokoa. Tällöin pinta-analyyttisen tutkimuksen tilavuuteen osuisi satunnaisesti trikalsiumfosfaattiklustereita. Sanni Toropaisen diplomityön [28] mukaan trikalsiumfosfaattiesiintymät ovat jakautuneet tasaisesti, jolloin isojen trikalsiumfosfaattiklustereiden mahdollisuus voidaan sulkea pois. Tällöin elektronispektroskooppisen tutkimuksen pinta-alassa trikalsiumfosfaattiesiintymiä on lukuisia, jolloin myös trikalsiumfosfaatin määrän kasvaessa esiintymien määrän voisi olettaa kasvavan.

Mahdollinen osasy trikalsiumfosfaatin pieneen pintakonsentraatioon on myös trikalsiumfosfaatin poistuminen materiaalista ennen pinta-analyyttistä tutkimusta. Komposiitin valmistusprosessissa saadaan sylinterin mallista komposiittitankoa, joka leikataan kirurgin veitsellä ohuiksi näytenapeiksi. Näytetangoista leikattujen näytenappien leikkauspinoillakaan ei havaita trikalsiumfosfaattia odotettua pintakonsentraatiota. Pinta-analyyttisen tutkimuksen ja myös tämän diplomityön kanssa samassa projektissa tehtävien soluviljelytutkimuksien tulokset viittaavat siihen, että trikalsiumfosfaatti olisi materiaalissa kopolyesterin peittämänä. Tällöin leikkauspinnalle pitäisi kuitenkin avautua trikalsiumfosfaattiesiintymiä. Trikalsiumfosfaatti on rakenteeltaan jauhemaista, jolloin on mahdollista, että näytteiden leikkauksen yhteydessä leikkauspinnalle kopolymerikalvon alta avautuneet trikalsiumfosfaattiesiintymät hilseilevät pois.

Kuvista 6.1a ja 6.1b voidaan huomioida myös, että huokoisten näytteiden (kuvissa ympyrän muotoisina pisteinä) kalsiumin, fosforin ja hiilen pinnan massaprosenttiosuudet käyttäytyvät trikalsiumfosfaatin määrän funktiona samoin kuin valmistuksessa käytetyistä määristä lasketut suorat. Huokoisten näytteiden mitatut alkuaineiden massaprosenttiosuudet ovat kuitenkin selvästi pienemmät sekä kalsiumin että fosforin osalta ja toisaalta hiilen huokoisten näytteiden mitatut massaprosenttiosuudet ovat selvästi suuremmat kuin valmistuksessa käytetyistä massaprosenteista lasketut alkuaineiden massaprosenttiosuudet. Huokoistamattomilla näytteillä trikalsiumfosfaatin määrän funktiona ei havaita muutoksia, vaikka valmistuksessa käytetty trikalsiumfosfaatin määrä on kasvanut 40 m-%:sta 60 m-%:iin. Tämä ero huokoisten ja huokoistamattomien näytteiden käyttäytymisessä viittaa siihen, että trikalsiumfosfaattia voisi poistua tutkittavalta pinnalta ennen pinta-analyyttistä tutkimusta.

Huokoistamattomalla näytteellä leikkauspinnalla ei ole yhtä paljon ja yhtä isoja huokosia kuin huokoistetun näytteen pinnalla, jolloin leikkauspinnalle avautuu enemmän trikalsiumfosfaattiesiintymiä, joista trikalsiumfosfaattia voi myös päästä poistumaan. Huokoisen näytteen tapauksessa osa leikkauspinnasta on huokosia, joiden seinämien trikalsiumfosfaattiesiintymät eivät aukea leikkauksen yhteydessä. Tällöin kopolymerin peittämiä esiintymiä on edelleen ja vain osa trikalsiumfosfaattiesiintymistä aukeaa ja niiltä pääsee poistumaan trikalsiumfosfaattia. Trikalsiumfosfaatin määrän 20 m-%:n lisäys on voinut joko kasvattaa trikalsiumfosfaattiesiintymien kokoa tai esiintymistiheyttä. Kummassakin tapauksessa näytteen leikkauksessa 60 m-% TCP-näytteen leikkauspinnalle avautuu enemmän tai suurempia TCP-esiintymiä kuin 40 m-% TCP:tä sisältävän näytteen leikkauspinnalle. Tällöin molempien huokoistamattomien näytemateriaalien tapauksessa pinnalle avautuneista trikalsiumfosfaattiesiintymistä voi poistua



trikalsiumfosfaattia. Siten kummankin näytemateriaalin huokoistamattoman näytteen havaitun trikalsiumfosfaatin lopullinen määrä on lähes sama ja muutoksia trikalsiumfosfaatin määrässä ei havaita valmistuksessa käytetyn trikalsiumfosfaatin määrän funktiona.

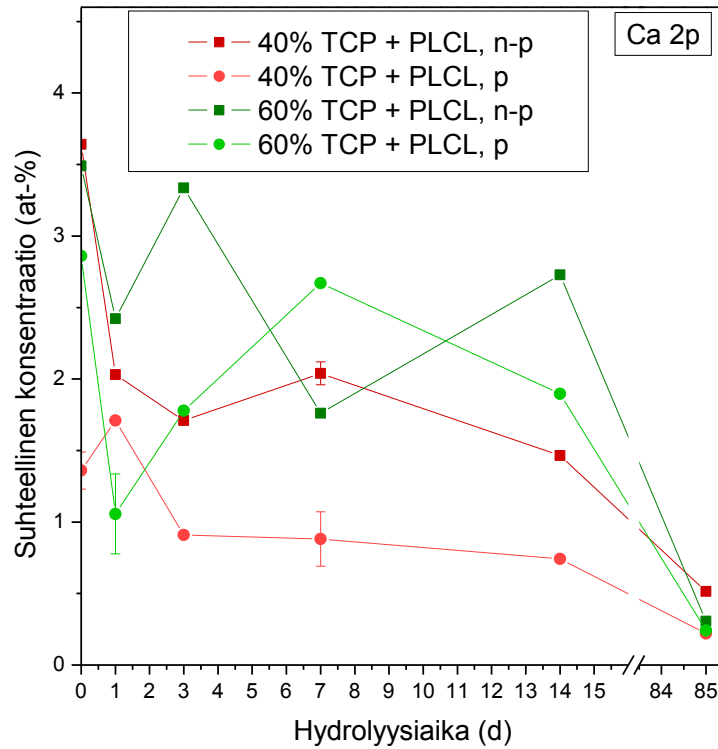
## 6.2 Hydrolyysiajan vaikutus

Tämän työn näytteiden varsinainen biohajoaminen tapahtui hydrolyysiliuoksessa, joka oli kehon nestettä jäljittelevä neste (lämpötila 37, pH 7,4). Näytteitä pidettiin hydrolyysiliuoksessa biohajoamisen alkuvaiheiden tutkimukseen suunnitellut ajat, joiden jälkeen jokainen näyte nostettiin pois hydrolyysiliuoksesta, huuhdeltiin, kuivattiin ja mitattiin. Työn tarkoitus oli tutkia biohajoavuuden alkuvaiheita, joten tutkittaviksi aikapisteiksi valittiin lähtötilanteen näytteiden, eli hydrolyysiliuokseen kastamattomien näytteiden, lisäksi 1, 3, 7, 14 ja 85 vuorokautta hydrolyysissä olleet näytteet. Aikapisteissä 3, 7 ja 14 on tutkittu tämän diplomityön kanssa samassa projektissa tehtävissä soluviljelytutkimuksissa solujen käytöstä. Samojen aikapisteiden valinnalla säilytetään mahdollisuus tutkimusten tulosten vertailuun.

### 6.2.1 Kalsiumin suhteellinen pintakonsentraatio

Kalsium on työn näytteissä alkuaine, jota on materiaalissa vain  $\beta$ -trikalsiumfosfaatissa. Kalsiumin määrän tutkiminen on siis oleellista, kun arvioidaan trikalsiumfosfaatin määrää pinnalla. Kuvassa 6.2 on esitetty kalsiumin suhteellinen pintakonsentraatio hydrolyysiajan funktiona ja kuvasta 6.2 on havaittavissa, että kalsiumia on vain joitain atomiprosentteja pinnalla. Lähtötilanteen näytteiden tapauksessa valmistuksessa käytetyistä trikalsiumfosfaatin massaprosenteista (40 m-% ja 60 m-%) lasketut kalsiumin atomiprosentit ovat 6,3 at-% ja 10,5 at-%. Kuvasta 6.2 voidaan havaita, että kalsiumia on huomattava alimäärä pinnalla koko biohajoamisen ajan.

Kalsiumin alimäärää pinnalla on käsitelty jo lähtötilanteen näytteiden tulosten kohdalla ja samat pintarakenteet ovat mahdollisia syitä kalsiumin pieneen suhteelliseen pintakonsentraatioon myös hydrolyysiajan funktiona. Kuvassa 6.2 on kuitenkin huomionarvoista, että kalsiumin määrä laskee hydrolyysiajan funktiona 14 ja 85 vuorokauden välillä. Tämä viittaa siihen, että kalsiumia poistuu pinnalta. Hydrolyysiajan funktiona kalsiumin poistuminen ei selity pelkästään leikkauksen yhteydessä auenneilla trikalsiumfosfaattiesiintymillä ja niiden mahdollisella irtoamisella näytteen leikkauspinnalta. Sen sijaan hydrolyysiajan funktiona trikalsiumfosfaattiesiintymiä voi tulla esille kopolymerin hajotessa niiden ympäriltä. Nämä kopolymerin alta esiin tulleet trikalsiumfosfaattiesiintymät voivat liueta hydrolyysiliuokseen tai poistua tutkittavalta pinnalta huuhteluiden yhteydessä. On myös mahdollista, että pinnalle tulee hydrolyysiliuoksesta epäpuhtautta, joka peittää pinnan rakennetta ja heikentää siten trikalsiumfosfaatista tulevaa kalsiumin signaalia.



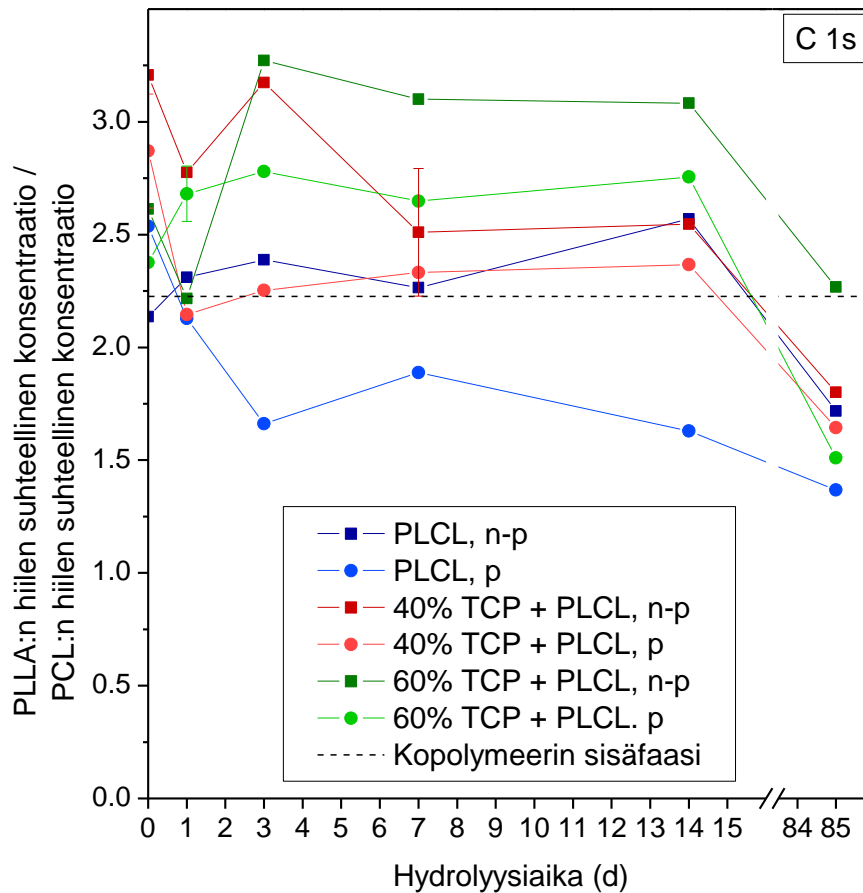
**Kuva 6.2:** Kalsiumin suhteellinen konsentraatio hydrolyysiajan funktiona, kun huomioidaan vain komposiittinäytteen sisältämät alkuaineet hiili, happi, kalsium ja fosfori.

Ahola *et al.* ovat tutkineet biohajoamista sisäfaasissa vastaavilla materiaaleilla, joita tässä työssä on tutkittu. Artikkelissaan [37] Ahola *et al.* ovat raportoineet trikalsiumfosfaatin kumulatiivisia liukoisuuksia hydrolyysiliuokseen. Artikkelissa todetaan, että trikalsiumfosfaatin liukoisuus on hyvin hidasta. Vuoden hydrolyysiajan jälkeen enintään 10 m-% näytteen trikalsiumfosfaatin kokonaismäärästä on liuennut hydrolyysiliuokseen. Artikkelin mukaan voidaan kuitenkin havaita, että 12 viikon hydrolyysiajassa liukenemista on jo tapahtunut. [37] Pinta-analyttiset tulokset viittaisivat siihen, että 12 viikossa liuennut trikalsiumfosfaatti olisi liuennut materiaalin pinnalta, jolloin kalsiumin suhteellinen pintakonsentraatio pienenee entisestään. Liukenemisen alkaminen pinnalta on mahdollista, koska pinta on ensimmäisenä yhteydessä hydrolyysiliuoksen kanssa ja toisaalta pinnalla hydrolyysiliuoksen vuorovaikutus on voimakkainta, koska liuos liikkuu herkimmin ja kulkeutumista materiaaliin tai materiaalista pois ei tarvita.

### 6.2.2 Komonomeerien suhteelliset osuudet

Työssä tutkittavan komposiittimateriaalin matriisimateriaalina oli kopolymeeri. Koska matriisimateriaali koostui polyesteriketjuista, joissa oli kahdenlaisia monomeereja, ja molemmilla monomeereilla on oma kontribuutionsa materiaalin ominaisuuksiin, pyrittiin eri monomeereista tulevan signaalin erottamiseen pinta-analyttisissä tuloksissa. Tätä varten työssä luotiin sovitussparametrit, jotka on esitelty luvussa 5.5. Sovituspara-

metrien avulla hiilen signaali saatiin jaettu kahteen toisistaan erottuvaan osaan, joista toinen oli poly(L-laktidi)-monomeerista ja toinen polykaprolaktonimonomeerista. Näin saatiin määritettyä pinnan eri monomeerien suhteelliset osuudet. Kuvassa 6.3 on esitetty komonomeerien suhdeluku hydrolyysiajan funktiona.



**Kuva 6.3:** Poly(L-laktidi):n hiilen suhteellisen osuuden suhde polykaprolaktonin hiilen suhteelliseen osuuteen eri näytteillä hydrolyysiajan funktiona.

Kuvassa 6.3 mustalla katkoviivalla on merkitty kopolymerin valmistajan antamista sisäfaasin monomeerien suhteista 69/31 laskettu suhdeluku. Kyseinen sisäfaasin koostumus on ennen hydrolyysiliuokseen upottamista. Lisäksi kuvassa on laskettu kaikista mittauspisteistä poly(L-laktidi):sta tulevan signaalin osuuden suhde polykaprolaktonista tulevaan signaalin osuuteen. Kuvasta voidaan havaita, että suhdeluku on suurimmalla osalla näytteistä suurempi kuin materiaalin valmistajan antamista pelkän kopolymerin sisäfaasin arvoista lasketun katkoviivan arvo. Kun suhdeluku on suurempi kuin katkoviivan arvo, poly(L-laktidi):a on kyseisen aikapisteen mittauksessa pinnalla enemmän kuin valmistajan ilmoittama poly(L-laktidi):n sisäfaasin osuus. Kuvaa voidaan siis tulkita siten, että kopolymeeri on laskostunut pinnalle biohajoamisen alkuvaiheissa niin, että poly(L-laktidi):a on pieni ylimäärä ja polykaprolaktonia pieni alimäärä pinnalla verrattuna sisäfaasin koostumukseen. Taulukossa 6.1 on esitetty

kuvan 6.3 suhdelukuja vastaavat suhteet numeroin. Taulukossa osuudet on pyöristetty, mutta kuvassa 6.3 lasketut pisteet on laskettu kolmen desimaalin tarkkuudella.

**Taulukko 6.1:** *Komonomeerien suhteellisten pintakonsentraatioiden suhteet.*

PLLA / PCL Hydrolyysiaika (d)	Kopolymeeri		Komposiitti, 40% TCP		Komposiitti, 60% TCP	
	n-p	p	n-p	p	n-p	p
0	68 / 32	72 / 28	76 / 24	74 / 26	72 / 28	70 / 30
1	70 / 30	68 / 32	74 / 26	68 / 32	69 / 31	73 / 27
3	70 / 30	62 / 38	76 / 34	69 / 31	77 / 23	74 / 26
7	69 / 31	65 / 35	69 / 31	73 / 27	76 / 24	73 / 27
14	72 / 28	62 / 38	72 / 28	70 / 30	76 / 24	73 / 27
85	63 / 37	58 / 42	64 / 36	62 / 38	69 / 31	60 / 40

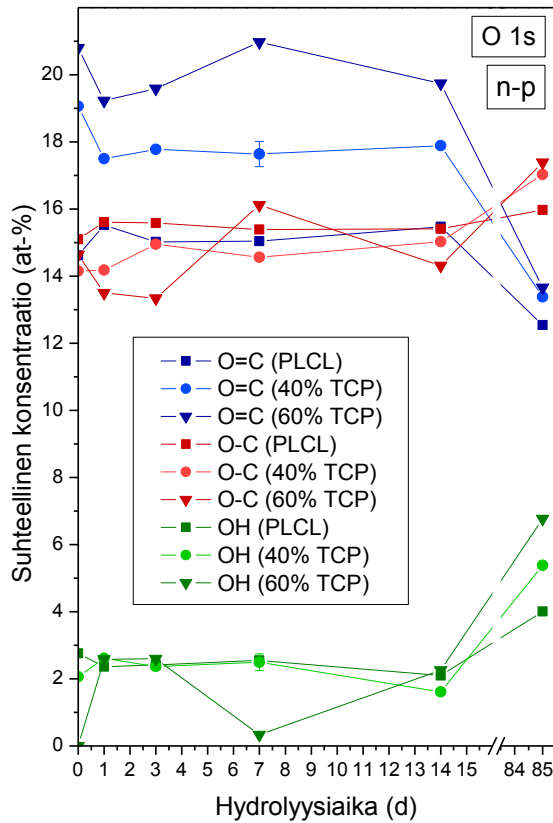
Yhtenäisiä muutoksia polymeerisuhteissa ei havaita hydrolyysiajan funktiona ensimmäisten kahden viikon aikana, mutta kahden viikon ja 12 viikon välillä muutoksia tapahtuu kaikilla näytteillä. Kyseisessä 10 viikon ajassa poly(L-laktidi):n määrä suhteessa polykaprolaktoniin pienenee ja suhdeluku laskee pienemmäksi kuin valmistajan ilmoittamista osuuksista laskettu sisäfaasin koostumuksen suhdeluku. Voidaan siis päätellä, että pinnalla biohajoaminen käynnistyy kopolymeeriketjun poly(L-laktidi)-osista. Ahola *et al.* ovat tutkineet komonomeerien suhteellisiä osuuksia sisäfaasissa lähtötilanteessa sekä 26 ja 52 viikon hydrolyysiajan jälkeen. Kyseisten tulosten perusteella poly(L-laktidi):n osuus kasvaa ja polykaprolaktonin osuus pienenee hydrolyysiajan funktiona. Lisäksi on todettu, että trikalsiumfosfaatin määrä materiaalissa hidastaa muutosta. Tutkimuksen aikapisteet ovat kuitenkin huomattavasti tämän työn pinta-analyttisen tutkimuksen aikapisteitä pidemmällä välillä. [37] Tässä työssä elektronispektroskooppisella menetelmällä tehdyn pinta-analyttisen tutkimuksen perusteella päädytään sisäfaasin tulosten kanssa päinvastaiseen tulokseen.

Erot sisäfaasin ja pinnan käyttäytymisessä eivät ole ristiriidassa, koska pinnan käyttäytymisen voidaan olettaakin olevan erilaista kuin sisäfaasin käyttäytymisen. Ahola *et al.* ovat raportoineet, että amorfisempi osa kopolymeerista hajoaa ensin [37]. Amorfiseen osaan vesi pääsee vaikuttamaan kiteistä tai puolikiteistä materiaalin osaa nopeammin. Tällöin myös reaktio veden kanssa eli biohajoaminen voi tapahtua nopeammin. Pinnalla amorfisuudella ja kiteisyydellä ei kuitenkaan oletettavasti ole vastaavaa merkitystä, koska jokainen osa pintaa vuorovaikuttaa ympäröivän nesteiden kanssa.

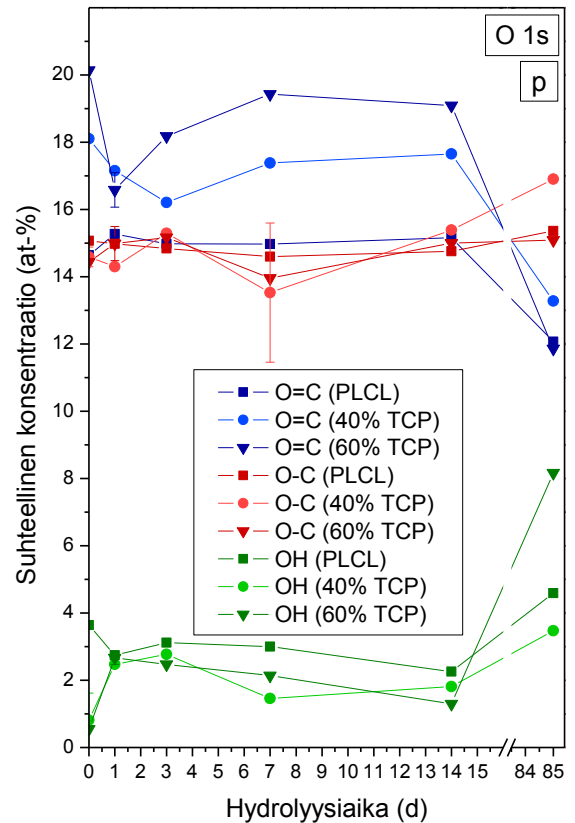
### 6.2.3 Hydroksyyliyhmiä suhteellinen pintakonsentraatio

Biohajoamisesta kertoo myös hydroksyyliyhmiä määrän kasvu. Hydroksyyliyhmiä muodostuu polymeeriketjujen pääteryhmiksi, kun polymeeriketju pilkkoutuu. Kuvissa 6.4 ja 6.5 on esitetty hapen kemiallisten tilojen muutokset hydrolyysiajan funktiona. Kuvassa 6.4 on hapen kemiallisten tilojen muutokset huokoistamattomilla näytteillä ja kuvassa 6.5 vastaavat muutokset huokoisilla näytteillä. Kuten kuvista nähdään, hapen kemiallisissa tiloissa ei tapahdu yhtenäisiä ja merkittäviä muutoksia ensimmäisten 14

vuorokauden kuluessa. Vasta 14 ja 85 vuorokauden välillä hapen kemiallisten tilojen suhteellisissa pintakonsentraatioissa on havaittavissa selviä muutoksia, kun hydroksyyliyhmiä määrä pinnalla kasvaa merkittävästi, myös C-O-sidosten suhteellinen pintakonsentraatio kasvaa ja vastaavasti C=O-sidosten suhteellinen konsentraatio pinnalla laskee.



**Kuva 6.4:** Hapen kemiallisten tilojen atomiprosenttien muutokset hydrolyysiajan funktiona huokoistamattomilta näytteiltä.



**Kuva 6.5:** Hapen kemiallisten tilojen atomiprosenttien muutokset hydrolyysiajan funktiona huokoisilta näytteiltä.

Hydroksyyliyhmiä suhteellisen pintakonsentraation kasvusta voidaan päätellä, että biohajoaminen on käynnistynyt pinnalla 14 ja 85 vuorokauden välillä. Kopolymeeriketju on alkanut pilkkoutua ja pääteryhmien suhteellinen pintakonsentraatio on kasvanut. Lisäksi pääteryhmät ovat mahdollisesti järjestäytyneet kohti pintaa, jolloin niiden määrän kasvu on korostunut. Toisaalta käytettäessä suhteellisia pintakonsentraatioita yhden osuuden kasvaessa jonkin toisen osuuden on pienennettävä. Polyestereiden hajotessa C=O-sidokset eivät katkea, kuten estereiden hajoamista selventävästä kuvasta 2.3 voidaan huomata. Suhteellinen pintakonsentraatio C=O-sidosten osalta pienenee esimerkiksi pääteryhmien segregaatiosuhteen seurauksena.

Lähtötilanteessa ja koko tutkimuksen ajan lähes kaikilla näytteillä havaitaan hydroksyyliyhmiä, vaikka komonomeerit eivät kyseisiä funktionaalisiryhmiä sisällä. Havaitut hydroksyyliyhmiä ovat peräisin kopolymeerin pääteryhmistä ja on mahdollis-

ta, että pääteryhmät segregoituvat kohti pintaa kuten luvussa 2 on kerrottu. Tällöin pääteryhmien konsentraatio pinnalla voi olla korkeampi kuin sisäfaasissa. Toisaalta ilmakehälle altistuneeseen polymeerinäytteeseen, jota ei ole käsitelty tyhjiössä, on voinut tarttua epäpuhtauksia, jotka voivat myös sisältää hydroksyyliiryhmiä. Pinta-analyytissä tutkimuksessa materiaalin pinnalla havaitaan sekä pääteryhmistä että mahdollisista epäpuhtauksista peräisin olevia hydroksyyliiryhmiä, jolloin hydroksyyliiryhmien havaitseminen kaikissa tutkimuksen vaiheissa on luonnollista.

#### 6.2.4 Alkuaineiden suhteelliset osuudet

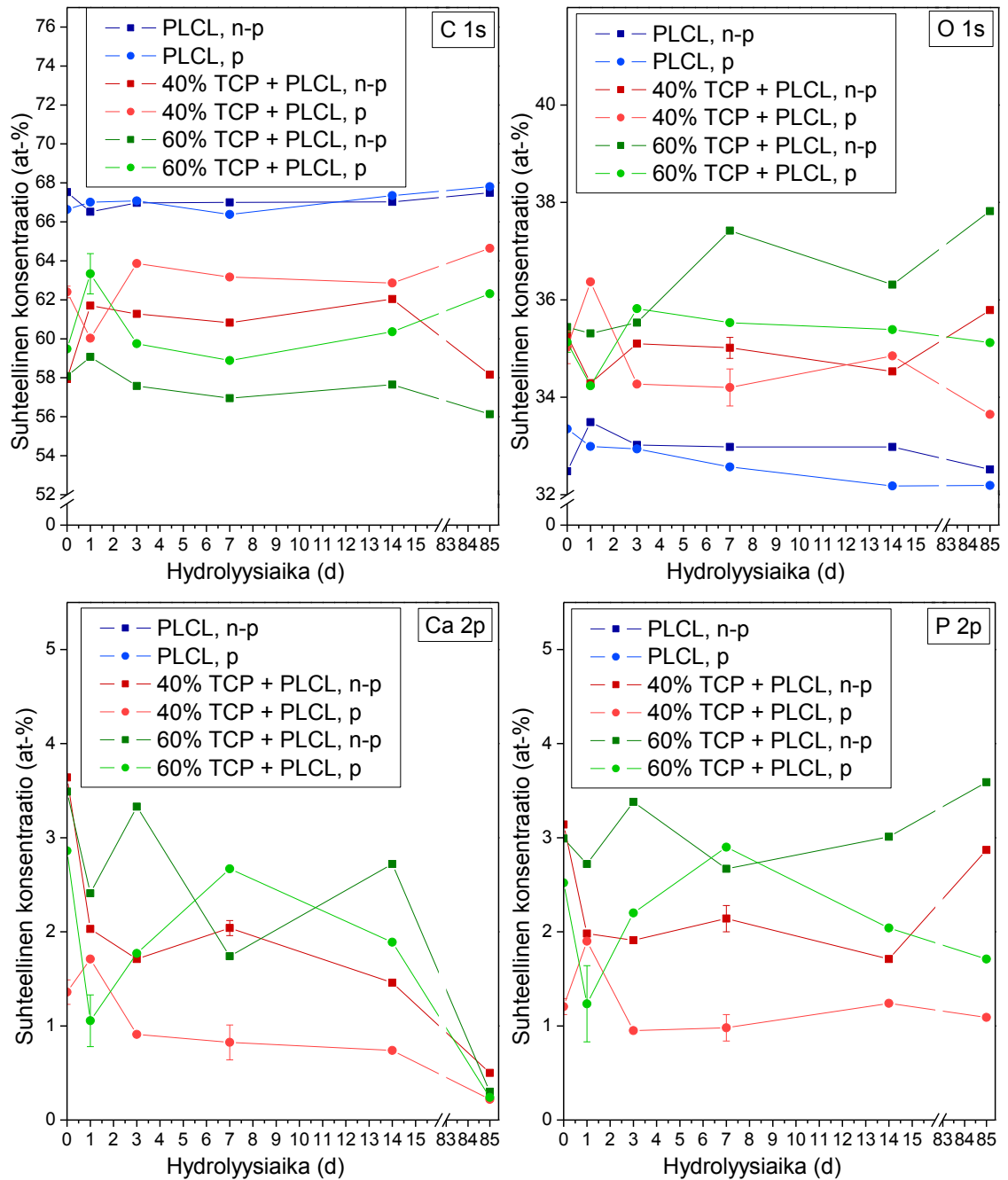
Alkuaineiden suhteellisten osuuksien välisten muutosten havaitsemiseksi esitetään komposiittimateriaalin kaikkien alkuaineiden suhteelliset pintakonsentraatiot hydrolyysiajan funktiona kuvassa 6.6. Kuvasta 6.6 voidaan huomata, että lähtötilanteen hydrolyysiliuokseen kastamattomien ja yhden päivän hydrolyysissä olleiden näytteiden välillä havaitaan muutoksia. Muutokset eivät kuitenkaan ole yhdenmukaisia ja niiden taustalla uskotaan olevan näytteiden hydrolyysiliuokseen kastamisen aiheuttamat erot. Taulukossa 6.2 on esitetty hydrolyysiliuoksen sisältämän natriumin havaitut suhteelliset pintakonsentraatiot. Kuvasta 6.6 ja taulukosta 6.2 voidaan tehdä päätelmiä alkuainesuhteiden muutoksista.

**Taulukko 6.2:** Natriumin määrä eri näytteillä atomiprosenteissa.

Hydrolyysiaika (d)	Natriumin määrä eri näytteillä (at-%)					
	Kopolymeeri		Komposiitti, 40% TCP		Komposiitti, 60% TCP	
	n-p	p	n-p	p	n-p	p
0						
1					0,49	0,15
3					0,18	0,47
7				0,06	1,21	
14			0,27	0,31	0,31	0,33
85		0,51	2,68	0,38	2,17	0,64

Taulukosta 6.2 voidaan huomata, että natriumia havaitaan pinnalla enemmän hydrolyysiajan funktiona ja toisaalta näytteillä, jotka sisältävät trikalsiumfosfaattia ja ovat huokoistamattomia. Hydrolyysiliuos sisältää natriumia, joten natriumin kasvu hydrolyysiajan funktiona johtuu hydrolyysiliuoksen jäämistä pinnalla.

Kuvasta 6.6 voidaan tehdä huomioita myös alkuaineiden suhteellisten osuuksien muutosten lisäksi huokoisten ja huokoistamattomien näytteiden välisten muutosten eroista. Kalsiumin suhteellisen pintakonsentraation laskua lukuun ottamatta kaikilla alkuaineilla 14 ja 85 vuorokauden välillä huokoisten ja huokoistamattomien näytteiden muutosten suunnat eroavat toisistaan.



**Kuva 6.6:** Vasemmalla ylhäällä hiilen, oikealla ylhäällä hapen, vasemmalla alhaalla kalsiumin ja oikealla alhaalla fosforin suhteelliset pintakonsentraatiot hydrolyysiajan funktiona.

Huokoistamattomilla näytteillä fosforin määrä kasvaa 14 ja 85 vuorokauden välisenä aikana. Myös hapen määrä pinnalla kasvaa huokoistamattomilla trikalsiumfosfaattia sisältävillä näytteillä 14 ja 85 vuorokauden hydrolyysiaikojen välillä. Vastaavasti natriumia havaitaan kyseisillä näytteillä reilusti. Hydrolyysiliuoksessa on fosfaatteja, jotka sisältävät happea ja fosforia. Lisäksi natrium on yksi hydrolyysiliuoksen alkuaine, joten fosforin, hapen ja natriumin muutosten ollessa kaikilla trikalsiumfosfaattia sisältävillä huokoistamattomilla näytteillä saman suuntaiset ja muutosten erotessa muiden näyt-

teiden muutoksista voidaan päätellä, että huokoistamattomille trikalsiumfosfaattia sisältäville näytteille hydrolyysiliuoksesta jää eniten jäämiä. Tämä voi johtua esimerkiksi mekaanisen huuhtelun heikosta tehosta huokoistamattomilla näytteillä.

Erot huokoisten ja huokoistamattomien trikalsiumfosfaattia sisältävien näytteiden 14 ja 85 vuorokauden hydrolyysiaikojen välillä tapahtuvissa muutoksissa ovat havaittavissa myös hiilen suhteellisissa pintakonsentraatioissa. Huokoistamattomien näytteiden hiilen suhteellinen pintakonsentraatio laskee. Lasku voi johtua esimerkiksi pinnalle muodostuneesta epäpuhtauskerroksesta, joka on päätelty edellä natriumin, fosforin ja hapen suhteellisten pintakonsentraatioiden kasvusta huokoistamattomilla näytteillä. Huokoisten trikalsiumfosfaattia sisältävien näytteiden hiilen pintakonsentraatiot kasvavat 14 ja 85 vuorokauden hydrolyysiaikojen välillä. Samalla kalsiumin, fosforin ja hapen suhteelliset pintakonsentraatiot laskevat huokoisilla näytteillä. Huokoisilla näytteillä pinnasta tulee siis entistä kopolymeeririkkaampi hydrolyysiajan funktiona ja tämä näkyy hiilen suhteellisen pintakonsentraation kasvuna sekä kalsiumin ja fosforin suhteellisen pintakonsentraation laskuna.

Vastaavia eroja huokoisten ja huokoistamattomien pelkästä kopolymeerista koostuvien näytteiden tapauksessa ei havaita. Näytteet, jotka ovat 100 % kopolymeria, käyttäytyvät huokoisena ja huokoistamattomana lähes samoin. Näytteillä ei havaita fosforia eikä juurikaan natriumia. Tällöin voidaan todeta, että hydrolyysiliuoksesta ei jää jäämiä 100 % kopolyesterin pinnalle. Tämä voi johtua esimerkiksi pinnan hydrofobisuudesta. Trikalsiumfosfaattia sisältävien näytteiden käyttäytyminen on erilaista ja toisaalta trikalsiumfosfaatti muokkaa pintaa hydrofiilisemmäksi.

### 6.3 Työn tulosten vertailu muihin tutkimuksiin

Tämä diplomityö on osa projektia, jossa kehitetään biohajoavia kudostukirakenteita. Projektin tutkimuksiin liittyvät myös soluviljelytutkimukset, joihin samoja materiaaleja on toimitettu. Kaikista luvun 6.2 kuvista voidaan havaita, että yhtenäisiä muutoksia biohajoamisen seurauksena ei havaita 14 ensimmäisen vuorokauden aikana. Pinta-analyytinen tulos biohajoamisen käynnistymisestä vasta kahden ja 12 viikon välillä on solujen tarttumisen kannalta hyvä. Synteettisen biohajoavan kudostukirakenteen on tarkoitus hajota biologisesti luonnollisen kudoksen tieltä samassa tahdissa luonnollisen kudoksen kasvun kanssa. Kun biohajoamista ei havaita 14 ensimmäisen vuorokauden aikana, solut voivat ensin kiinnittyä muuttumattomaan materiaaliin ja vasta, kun kudoksen kasvu on käynnistynyt, synteettinen materiaali alkaa hajota.

Pinta-analyttisessä tutkimuksessa havaittiin, että  $\beta$ -trikalsiumfosfaattia ei esiinny pinnalla materiaalin valmistuksessa käytettyä määrää vastaavaa pintakonsentraatiota. Pinta-analyttisten tutkimusten pohjalta arvioitiin, että  $\beta$ -trikalsiumfosfaatti on kopolymerikalvon peittämänä. Samoilla materiaaleilla on tehty soluviljelytutkimuksia ja myös soluviljelytutkimuksissa on havaittu, että valmistuksessa käytetty trikalsiumfosfaatti ei ole solujen ulottuvissa pinnalla. Trikalsiumfosfaatin heikko esiintyminen havaitaan soluviljelytutkimuksissa sekä näyttemateriaalin leikkauspinnalla että huokos-



ten pinnoilla. Yhdessä pinta-analyttiset ja soluviljelytutkimuksen tulokset vahvistavat arviota trikalsiumfosfaatin peittymisestä kopolymeerin alle solujen ulottumattomiin.

Ahola *et al.* [37] ovat tutkineet samojen materiaalien, joita tässä työssä tutkittiin, sisäfaasin biohajoamista pitkällä aikavälillä. Artikkelissaan *Hydrolytic degradation of composites of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) 70/30 and β-tricalcium phosphate* he esittelevät eri sisäfaasin tutkimusmenetelmin saatuja tuloksia. Kaiken kaikkiaan trikalsiumfosfaatin ei havaita vaikuttavan merkittävästi kopolymeerin biohajoamiseen, mutta trikalsiumfosfaatilla on suuri merkitys bioyhteensopivuudessa ja biofunktionaalisuudessa. Yhdistettynä tämän työn pinta-analyttiset tulokset sisäfaasista saatuihin tuloksiin voidaan materiaalin biohajoaminen ja biofunktionaalisuus ymmärtää kokonaisvaltaisesti kehittämällä materiaalin ominaisuuksia edelleen biofunktionaalisempaan suuntaan. Esimerkiksi trikalsiumfosfaatin heikon pintaesiintymisen parantaminen voisi lisätä materiaalin biofunktionalisuutta entisestään.

Sekä poly(L-laktidi) että polykaprolaktoni ovat lääketieteellisten sovellusten ja niiden kehityksen kiinnostuksen ja tutkimuksen kohteena. Kirjallisuudesta löytyy useita julkaisuja [59-65], joissa kyseisten polymeerien bioyhteensopivuutta ja biofunktionaalisuutta on tutkittu ja kehitetty. Eri tutkimusten artikkeleista on huomattavissa, että samoilla materiaaleilla on suuri määrä erilaisia muuntumismahdollisuuksia. Polymeerejä on seostettu ja niistä on tehty kopolymeereja, lisäksi tutkimuksissa solujen kiinnittymistä on lisätty erilaisilla pinnan käsittelyillä. Usein materiaaleille on kuitenkin tehty pinta-analyttistä tarkastelua, jotta solun kanssa vuorovaikuttavaa pintaa voidaan tutkia.

## 7 YHTEENVETO

Tämän työn tutkimuksen kohteena oli huokoisen komposiitin biohajoavuuden alkuvaiheet materiaalin pinnalla. Tutkittavasta materiaalista kehitetään biohajoavia kudostukirakenteita biologiseen ympäristöön, esimerkiksi korvaamaan ihmiskehon luu, jolloin materiaalin tulee olla bioyhteensopiva. Lisäksi hyvä biofunktionaalisuus parantaa materiaalin toimivuutta biologisessa ympäristössä. Tämän työn tutkimuksissa käytetty materiaali oli poly(L-laktidi-co-kaprolaktoni):n  $\beta$ -trikalsiumfosfaattikomposiitti. Poly(L-laktidi-co-kaprolaktoni) on kopolymeeri, eli koostuu kahden esterimonomeerin muodostamasta polyesteriketjusta. Kopolymeeri on ollut työn näytteissä matriisimateriaalina, johon trikalsiumfosfaattia on seostettu. Komposiittimateriaali on lisäksi huokoistettu, jotta se muistuttaa luonnollista luuta ja solut voivat kulkeutua materiaalin sisään ja tarttua kauttaaltaan materiaaliin.

Materiaalin biohajoavuus on tärkeä ominaisuus, jotta ihmiskehoon istutettua kudostukirakennetta ei tarvitse poistaa. Lisäksi synteettinen biohajoava kudostukirakenne mahdollistaa luonnollisen kudoksen kasvun synteettisen materiaalin hajotessa pois samassa tahdissa. Jotta kasvu ja biohajoaminen etenevät samassa tahdissa, biohajoamisen nopeus on ratkaiseva kudostukirakennemateriaalin ominaisuus. Tämän työn näytteiden biohajoaminen on toteutettu *in vitro* –menetelmällä. Tutkittavat näytteet upotettiin kehon nestettä jäljittelevään nesteeseen, jossa niiden biohajoaminen käynnistyi ja eteni. Pinta-analyyttistä tutkimusta tehtiin sekä hydrolyysiliuokseen kastamattomille, että hydrolyysissä eri ajan olleille näytteille. Hydrolyysiliuoksessa komposiitin matriisimateriaali reagoi veden kanssa hajoten oligo- ja monomeereiksi, jotka liukenevat nesteeseen.

Synteettisen materiaalin ja biologisen ympäristön välinen vuorovaikutus tapahtuu materiaalin pinnalla. Tällöin on tärkeää tuntea materiaalin pinnan ominaisuudet ja koostumus, jotta pinnan rakennetta muuttamalla voidaan muuttaa vuorovaikutusta biologisen ympäristön kanssa. Tässä työssä huokoisen biohajoavan komposiitin pintaa on tutkittu käyttäen röntgenviritteistä fotoelektronispektroskopiaa (XPS). Työssä on osoitettu, että XPS-menetelmä soveltuu hyvin huokoisen komposiittimateriaalin pinta-analyyttiseen tutkimukseen. XPS-menetelmällä on määritetty komposiitin pinnan koostumus ja muutokset pinnan kemiallisessa rakenteessa hydrolyysiajan funktiona. Luomalla uusi sovitustapa hiilen signaaliin voitiin erottaa alkuaineiden kemiallisten tilojen suhteellisten pintakonsentraatioiden lisäksi myös kahden kopolymeerin monomeerien hiilten signaalit. Näin voitiin arvioida myös komonomeerien suhteita biohajoamisen funktiona.

Tämän työn tutkimuksissa havaittiin, että materiaalin pinnan kemiallinen koostumus muuttuu, kun materiaali on kastettu hydrolyysiliuokseen. Varsinaista biohajoamista ei kuitenkaan havaita ensimmäisten kahden viikon aikana, mutta 12 viikon hydrolyysiajan jälkeen biohajoamisen aiheuttamia muutoksia materiaalin pinnan rakenteessa havaitaan. Tämä tulos biohajoamisen käynnistymisestä vasta kahden ja 12 viikon

välillä, on solujen kiinnittymisen kannalta hyvä. Synteettisen kudostukirakenteen on tarkoitus hajota elimistöstä samassa tahdissa, kun elimistö muodostaa luonnollista kudosta synteettisen kudostukirakenteen tilalle. Tällöin on hyvä, että solut voivat tarttua ja jakaantua pinnalla, joka ei muutu. Vasta kun solujen kasvu on hyvässä vauhdissa, synteettinen kudostukirakenne alkaa hajota.

Tämän työn pinta-analyttisessä tutkimuksessa havaittiin myös  $\beta$ -trikalsiumfosfaatin peittyminen kopolymeerikalvon alle sekä trikalsiumfosfaatin poistuminen pinnalta. Trikalsiumfosfaatista tutkittu kalsiumin suhteellinen pintakonsentraatio oli kaikilla näytteillä koko biohajoamista tutkitun ajan selvästi pienempi, kuin valmistuksessa käytetyistä  $\beta$ -trikalsiumfosfaatin määristä laskettu kalsiumin sisäfaasin suhteellinen konsentraatio. Projektin, jonka osana tämä diplomityö on tehty, soluviljelykokeissa on havaittu, että pinnalla ei ole solujen ulottuvissa riittävästi  $\beta$ -trikalsiumfosfaattia ja  $\beta$ -trikalsiumfosfaatin lisääminen materiaalin valmistusvaiheessa ei paranna tilannetta. Pinta-analyttiset ja soluviljelytulokset yhtyvät toisiinsa  $\beta$ -trikalsiumfosfaatin heikon esiintymisen suhteen ja voidaan todeta, että kopolymeeri on peittänyt  $\beta$ -trikalsiumfosfaattiesiintymät materiaalissa.

Työn tutkimuksia voitaisiin jatkaa tutkimalla esimerkiksi biohajoamista tämän työn osoittamien biohajoamisen kannalta oleellisten hydrolyysiaikojen kohdalla kahden ja 12 viikon välillä. Lisäksi työssä todettua hydrolyysiliuoksen kastelun vaikutusta olisi mielenkiintoista tutkia. Kasteltujen lähtötilanteen näytteiden tutkimuksella saavutettaisiin lähtötilanne, joka biohajoamisella on biomateriaalin luonnollisessa ympäristössä. Myös erilaisten näytteiden valmistus- ja tutkimusteknisten asioiden merkitys on selvinnyt tämän työn pinta-analyttisissä tutkimuksissa ja niihin voidaan jatkossa kiinnittää huomiota. Tämän työn tutkimusten tarkoitus oli tutkia biohajoamisen alkuvaiheita huokoisen komposiittimateriaalin pinnalla. Työn mittauksissa onnistuttiin tekemään hyvin toistuva mittaussarja, josta saatiin hyvin tehdyillä analyysillä selvitettyä biohajoamisen kannalta tärkeitä muutokset materiaalin pinnalla. Työssä saatuja tuloksia biohajoamisen alkuvaiheista voidaan hyödyntää materiaalin kehityksessä yhä biofunktionaalisempaan suuntaan. Lisäksi kehitettyjä analysointimekanismeja voidaan hyödyntää jatkotutkimuksissa. Tämän työn tavoitteiden katsotaan siis täyttyneen.

## LÄHTEET

- [1] Sabir, Muhammad I., Xu, Xiaoxue, Li, Li. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science* (2009)44, s. 5713-5724.
- [2] Ramakrishna, S., Mayer, J., Wintermantel, E., Leong, K.W. Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. *Composites Science and Technology* 61( 2001)9, s. 1189-1224.
- [3] Luckachan, G.E., Pillai, C.K.S. Biodegradable Polymers- A Review on Recent Trends and Emerging Perspectives. *Journal of Polymers and The Environment* 19(2011)3, s. 637-676.
- [4] Castner, D.G., Ratner, B.D. Biomedical surface science: Foundations to frontiers. *Surface Science* 500(2002)1-3, s. 28-60.
- [5] Somorjai, G.A., Li, Y. Introduction to surface chemistry and catalysis. New Jersey, USA 1994, John Wiley & Sons. 667 sivua.
- [6] Ratner, B.D., Castner, D.G. *Electron Spectroscopy for Chemical Analysis*. Kirjassa Vickerman, J.C. ja Gilmore, I., toim., *Surface Analysis – The Principal Techniques*, luku 3, s. 48-112. John Wiley & Sons, Ltd., toinen painos, 2009.
- [7] Briggs, D. *XPS: Basic Principles, Spectral Features and Qualitative Analysis*. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., *Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*, luku 2, s. 31-56. IM Publications, 2003.
- [8] Watts, J.F. X-ray photoelectron spectroscopy. *Vacuum*, 45(1994)6-7, s. 653–671.
- [9] McArthur, S.L. Applications of XPS in bioengineering. *Surface and Interface Analysis* 38(2006)11, s. 1380-1385.
- [10] Vickerman JC. Introduction. Kirjassa Vickerman, J.C. ja Gilmore, I., toim., *Surface Analysis – The Principal Techniques*, luku 1, s. 1-8. John Wiley & Sons, Ltd., toinen painos, 2009.
- [11] Kasemo B. Biological surface science. *Surface Science* 500(2002)1-3, s. 656-677.
- [12] Gardella, Jr. J.A., Hernandez de Gatica, N.L. The determination of structure and reactivity at the surfaces of materials used in biology: Needs and requirements for electron and ion spectroscopy for surface analysis. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 81(1996)3, s. 227-236.
- [13] Vogler, E.A. On the biomedical relevance of surface spectroscopy. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 81(1996)3, s. 237-247.

- [14] Scholz, Carmen. *The Molecular Structure of Degradable Polymer*. Kirjassa Wuisman, Paul I. J. M., Smit T. H., toim., *Degradable Polymers for Skeletal Implants*. New York 2009, Nova Science Publishers, Inc. s. 3-20.
- [15] Somorjai, Gabor A., Li, Yimin. *Polymer Surface and Biointerfaces*. Kirjassa Somorjai, Gabor A., Li, Yimin, toim., *Intrduktion to Surface Chemistry and Catalysis*. Toinen pianos. 2010 John Wiley Sons, Inc. s. 525-557.
- [16] Nielsen, L.F. *Composite Materials Properties as Influenced by Phase Geometry*. Berlin 2005, Springer Berlin Heidelberg. Saatavissa: <http://www.springerlink.com/content/ln1g346253102054/> (viitattu 28.10.2012)
- [17] Tanner, K.E. *Composites Based on Degradable Polymers*. Kirjassa Wuisman, Paul I. J. M., Smit T. H., toim., *Degradable Polymers for Skeletal Implants*. New York 2009, Nova Science Publishers, Inc. s. 71-92.
- [18] Kolasinski K. editor. *Surface Science: Foundations of Catalysis and Nanoscience*. John Wiley & Sons, Ltd., toinen pianos, 2008. 486 sivua.
- [19] Ratner, B.D. Surface characterization of biomaterials by electron spectroscopy for chemical analysis. *Annals of Biomedical Engineering*, 11(1983)3-4, s. 313-336.
- [20] Kasemo, B., Gold, J. *Implant Surfaces and Interface Processes*. *Advances in Dental Research* 13(1999)1, s. 8-20.
- [21] Zumdahl, Steven S. *Chemical Principles*. 5th ed. Boston, New York 2005, Houghton Mifflin Company. 1070 sivua
- [22] Sodhi, R.N.S. Application of surface analytical and modification techniques to biomaterial research. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 81(1996)3, s. 269-284.
- [23] Paakinaho, K., Tirkkonen, L., Ahola, N., Haimi, S., Aydogan, B., Toropainen, S., Dong, J., Hyttinen, J., Kellomäki, M. *New Advanced Osteopromotive Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications; Supercritical Fluid Processing and Cellular Response with Human Adipose Stem Cells*. 9th World Biomaterials Congress, Chengdu, China 2012.
- [24] Odian, G. *Principles of Polymerization*. Neljäs painos. Kanada 2004, John Wiley & Sons. 812 sivua. Saatavissa: <http://books.google.fi/books?id=6cjpgZbFHI4kC&pg=PA464&hl=fi#v=onepage&q&f=false> (viitattu 28.10.2012)
- [25] Wendy, A. A review of biodegradable polymers. *Polymer International* 47(1998)2, s. 89-144.
- [26] Woodruff, M.A., Hutmacher, D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science* 35(2010)10, s. 1217-1256.

- [27] Gunatillake, P.A., Adhikari, R., Gadegaard, N. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *European Cells & Materials Journal* 5(2003), s. 1-16.
- [28] Toropainen, Sanni. Poly(lactide-co-caprolactone)/tricalcium phosphate – composite scaffolds foamed using supercritical carbon dioxide. Diplomityö. Tampere 2012. Tampereen teknillinen yliopisto, Biotekniikan koulutusohjelma. 106 sivua.
- [29] Männistö, Noora. B-trikalsiumfosfaattia (B-TCP) sisältävän, antibiootteja vapauttavan ja biohajoavan luun täytemateriaalin ominaisuuksien tutkimus. Diplomityö. Tampere 2011. Tampereen yliopisto, Biolääketieteellisen teknologian yksikkö. 129 sivua.
- [30] Jeong, S.I., Kim, B., Kang, S.W., Kwon, J.H., Lee, Y.M., Kim, S.H., *et al.* In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(l-lactide-co-ε-caprolactone) scaffolds. *Biomaterials* 25(2004)28, s. 5939-5946.
- [31] Garkhal, K., Verma, S., Tikoo, K., Kumar, N. Surface modified poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) microspheres as scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 82(2007)3, s. 747-756.
- [32] Tsuji, H. Poly(lactide)s and their Copolymers: Physical Properties and Hydrolytic Degradation. Kirjassa Wuisman, Paul I. J. M., Smit T. H., toim., *Degradable Polymers for Skeletal Implants*. New York 2009, Nova Science Publishers, Inc. s. 41-70.
- [33] Middleton, J.C., Tipton, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials* 21(2000)23, s. 2335-2346.
- [34] Yang, S., Leong, K., Du, Z., Chua, C. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering* 7(2001)6, s. 679-689.
- [35] Little, U., Buchanan, F., Harkin-Jones, E., Graham, B., Fox, B., Boyd, A., *et al.* Surface modification of poly(ε-caprolactone) using a dielectric barrier discharge in atmospheric pressure glow discharge mode. *Acta Biomaterialia* 5(2009)6, s. 2025-2032.
- [36] Lam, K.H., Nieuwenhuis, P., Molenaar, I., Esselbrugge, H., Feijen, J., Dijkstra, P.J., *et al.* Biodegradation of porous versus non-porous poly(L-lactic acid) films. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 5(1994)4, s. 181-189.
- [37] Ahola, N., Veiranto, M., Rich, J., Efimov, A., Hannula, M., Seppälä, J., Kellomäki, M. Hydrolytic degradation of composites of poly(L-lactide-co-ε-caprolactone) 70/30 and b-tricalcium phosphate. *Journal of Biomaterials Applications*, online 2012. DOI: 10.1177/0885328212462258. Saatavissa: <http://jba.sagepub.com/content/early/2012/10/09/0885328212462258> (viitattu 2.11.)

- [38] Moulder, J.F., Chastain, J., Stickle, W.F., Sobol, P.E., Bomben, K.D. Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy. Perkin-Elmer Corporation, Physical Electronics Division, 1992. 261 sivua.
- [39] Briggs, D. ja Grant, J.T. Perspectives on XPS and AES. Kirjassa Briggs, D. ja Grant, J.T., toim., Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, luku 1, s. 1-30. IM Publications, 2003.
- [40] Lahtonen K., Lampimäki M., Jussila P., Hirsimäki M., Valden M. Instrumentation and analytical methods of an x-ray photoelectron spectroscopy–scanning tunneling microscopy surface analysis system for studying nanostructured materials. Review of Scientific Instruments, 77(8):083901-1–083901-9, 2006.
- [41] Drummond, I.W. XPS: Instrumentation and Performance. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, luku 5, s. 117-144. IM Publications, 2003.
- [42] Watts, J.F. ja Wolstenholme, J. An introduction to surface analysis by XPS and AES. John Wiley & Sons, Ltd., 2003. 212 sivua.
- [43] Fontell, A., Maula, J., Nieminen, R., Söderlund, C., Valli, K., Vehanen, A., Vulli, M., ja Ylilampi, M. Tyhjiötekniikka. Suomen tyhjiöseura ry, Helsinki, 1986. 295 sivua.
- [44] Tougaard, S. Quantification of Nano-structures by Electron Spectroscopy. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, luku 12, s. 295-343. IM Publications, 2003.
- [45] Shigeo, T. Electron Attenuation Lengths. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, luku 11, s. 259-294. IM Publications, 2003.
- [46] Seah, M.P. ja Dench, W.A. Quantitative electron spectroscopy of surfaces: A standard data base for electron inelastic mean free paths in solids. Surface and Interface Analysis, 1(1979)1, s. 2–11.
- [47] Wolfgang, S.M.W. Electron Transport in Solid. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, luku 10, s. 235-258. IM Publications, 2003.
- [48] Kelly, M.A. Analysing Insulators with XPS and AES. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, luku 8, s. 191-210. IM Publications, 2003.
- [49] Artemenko, A., Choukourov, D., Slavinska, H., Biederman, H. Influence of Surface Roughness on results of XPS Measurements. WDS'09 Proceedings of Contributed Papers, Part III, s. 175-181. 2009.

- [50] Gunter, P.L.J, Gijzeman, O.L.J, Niemantsverdriet, J.W. Surface roughness effects in quantitative XPS: Magic angle for determining overlayer thickness. *Applied Surface Science*, 115(1997)4, s. 342-346.
- [51] Cumpson, P.J. Angle-Resolved X-ray Photoelectron Spectroscopy. Kirjassa Briggs, D., Grant, J.T., toim., *Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy*, luku 23, s. 651-675. IM Publications, 2003.
- [52] Duwez, A-S. Exploiting electron spectroscopies to probe the structure and organization of self-assembled monolayers: A review. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 134(2004)2-3, s. 97-138.
- [53] National Institute of Standards and Technology (NIST). X-ray photoelectron spectroscopy database, version 4.1. Saatavissa: <http://srdata.nist.gov/xps> (viitattu 29.10.2012).
- [54] Beamson, G., Briggs, D. The XPS of Polymer Database. *Surface Spectra*.
- [55] Chusuei, C., Goodman, D., Van Stipdonk, M., Justes, D., Schweikert, E.. Calcium phosphate phase identification using XPS and time-of-flight cluster SIMS. *Analytical Chemistry* 71(1999)1, s. 149-153.
- [56] Shih, P.Y., Yung, S.W., Chin, T.S. Thermal and corrosion behavior of P2O5-Na2O-CuO glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 224(1998)2, s. 143-152.
- [57] Ide-Ektessabi, A., Yamaguchi, T., Tanaka, Y. RBS and XPS analyses of the composite calcium phosphate coatings for biomedical applications. *Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B* 241(2005)1-4, s. 685-688.
- [58] Tanuma, C. J. Powell, D. R. Penn, Calculations of electron inelastic mean free paths. V. Data for 14 organic compounds over the 50-2000 eV range. *Surface and Interface Analysis*, 21(1994)165.
- [59] Sun, M. In vitro and in vivo testing of novel ultrathin PCL and PCL/PLA blend films as peripheral nerve conduit. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 93A(2010)1, s. 1470- 1481.
- [60] Maquet, V. Preparation of macroporous biodegradable poly(L-lactide-co- $\epsilon$ -caprolactone) foams and characterization by mercury intrusion porosimetry, image analysis, and impedance spectroscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 66A(2003)2, s. 199-213.
- [61] Kiss, É., Bertóti, I., Vargha-Butler, EI. XPS and Wettability Characterization of Modified Poly(lactic acid) and Poly(lactic/glycolic acid) Films. *The Journal of Colloid and Interface Science* 245(2002)1, s. 91-98.
- [62] Li, G., Cai, Q., Bei, J., Wang, S. Relationship between morphology structure and composition of polycaprolactone/poly(ethylene oxide)/polylactide copolymeric microspheres. *Advances in Polymer Technology* 13(2002)9, s. 636-643.



- [63] Lucke, A., Teßmar, J., Schnell, E., Schmeer, G., Göpferich, A. Biodegradable poly(d,l-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. *Biomaterials* 21(2000)23, s. 2361-2370.
- [64] Ivirico, J.L.E., Salmerón-Sánchez, M., Gómez Ribelles, J.L., Pradas, M.M. Biodegradable poly(L-lactide) and polycaprolactone block copolymer networks. *Polymer International* 60(2011)2, s. 264-270.
- [65] Castilla-Cortázar, I., Más-Estellés, J., Meseguer-Dueñas, J.M., Escobar Ivirico J.L., Marí, B., Vidaurre, A. Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly( $\epsilon$ -caprolactone) network. *Polymer Degradation and Stability* 97(2012)8, s. 1241-1248.

## LIITE A: TARKENTAVIA TAULUKOITA

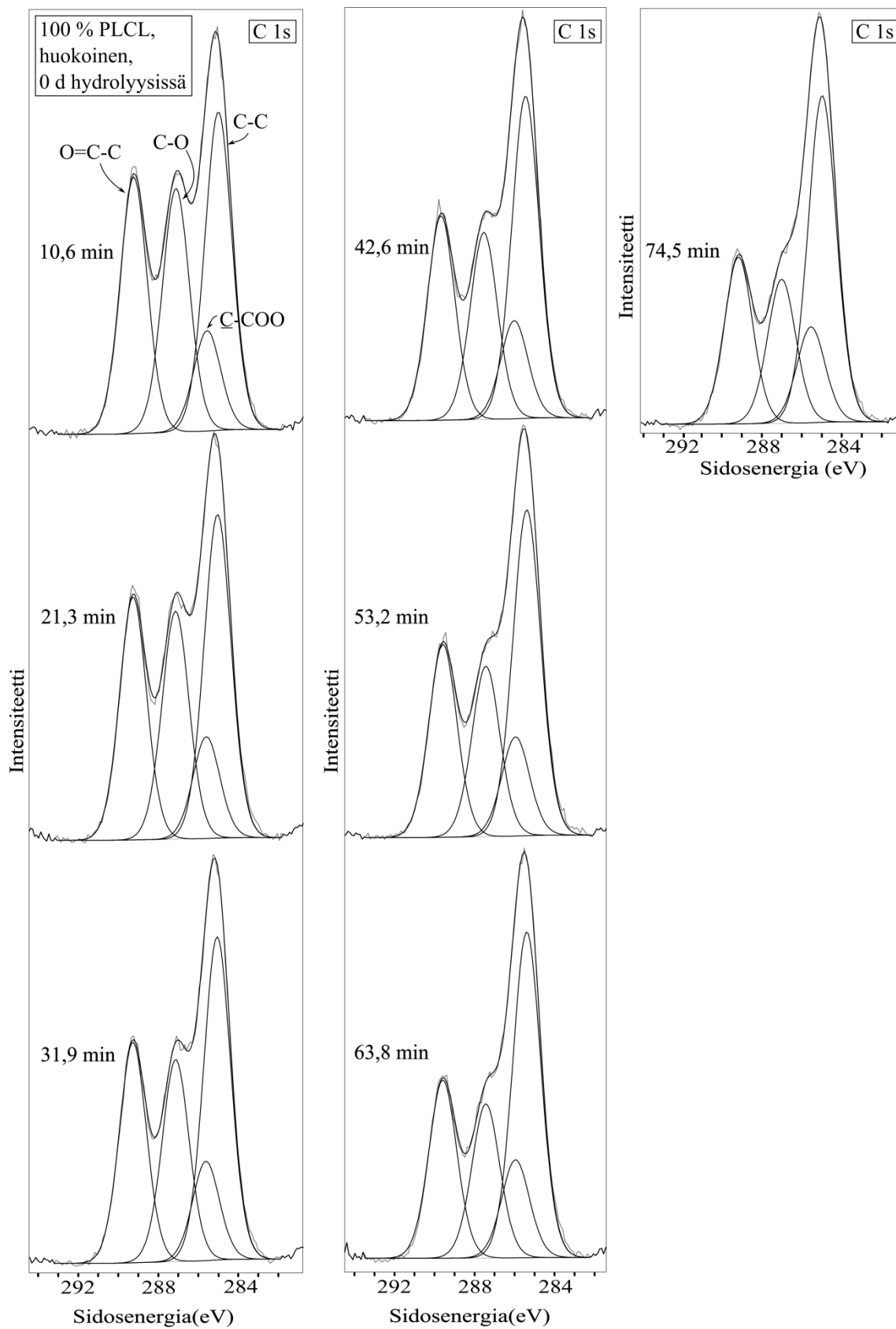
**Taulukko A.1:** Työssä tutkittujen näytemateriaalien yksikäsitteinen nimeäminen.

<b>1:</b> 100% PLCL <b>2:</b> 60% PLCL, 40% TCP <b>3:</b> 40% PLCL, 60% TCP	<b>0:</b> huokoistamaton <b>1:</b> huokoinen	Hydrolyysi- ajan kymmenet	Hydrolyysi- ajan ykköset	näytteen toistoon viittaava numero
Esimerkki: 60% PLCL ja 40% TCP, huokoinen, 14 päivää hydrolyysissä ollut ja 1. mitattu kyseisestä materiaalista				
2	1	1	4	1

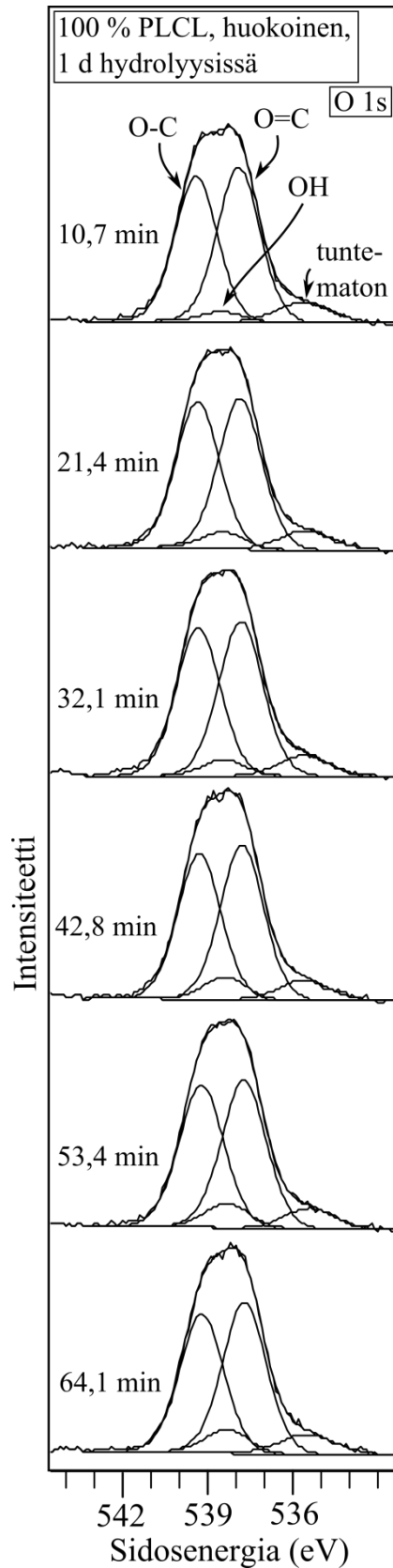
**Taulukko A.2:** Hiilen seitsemän eri tilan sovituksien väliset sidonnat Casa XPS -ohjelmassa. Lisäksi paikan sidonnoissa on joustettu 0,1 eV verran, joka on XPS-mittausten virheen rajoissa, jotta summakäyrä mukailisi mitattua spektriä mahdollisimman hyvin.

	C-C (PL) <b>A</b>	C-O (PL) <b>B</b>	C=O (PL) <b>C</b>	C-C (PCL) <b>D</b>	C-C-O (PCL) <b>E</b>	C-O (PCL) <b>F</b>	C=O (PCL) <b>H</b>
Paikka	285	A + 1.9986	A + 4.0734	A - 0	A + 0.55	A + 1.8179	A + 4.0225
Puoliarvon- leveys	1 , 3.0000	A * 1.0020	A * 0.9545	A * 0.7365	A * 0.7208	A * 0.7912	A * 0.7312
Pinta-ala	0.0 , 1000000	A * 0.93487	A * 0.92210	0.0 , 10000000	D * 0.32692	D * 0.38289	D * 0.309094

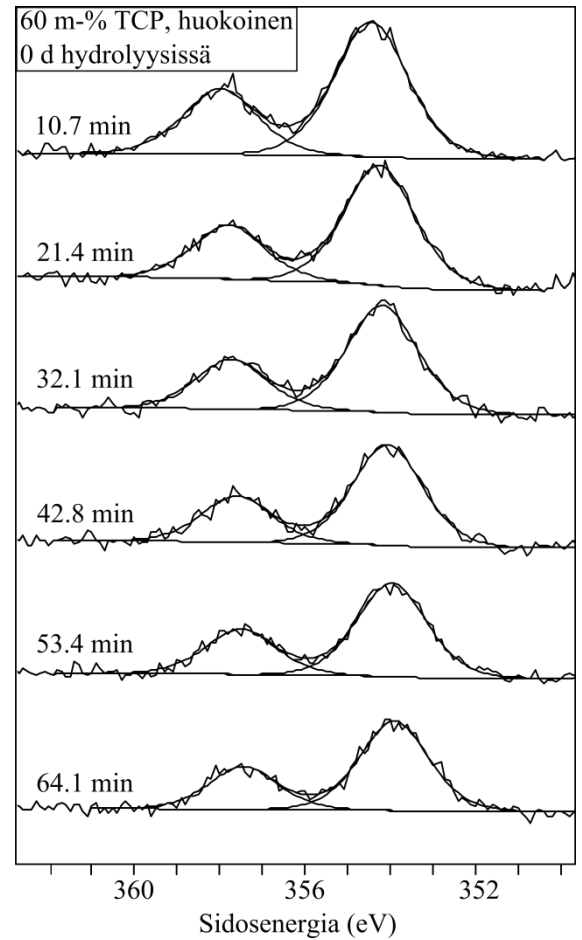
## LIITE B: PINNAN MUUTOS RÖNTGENSÄTEILYN VAIKUTUKSESTA



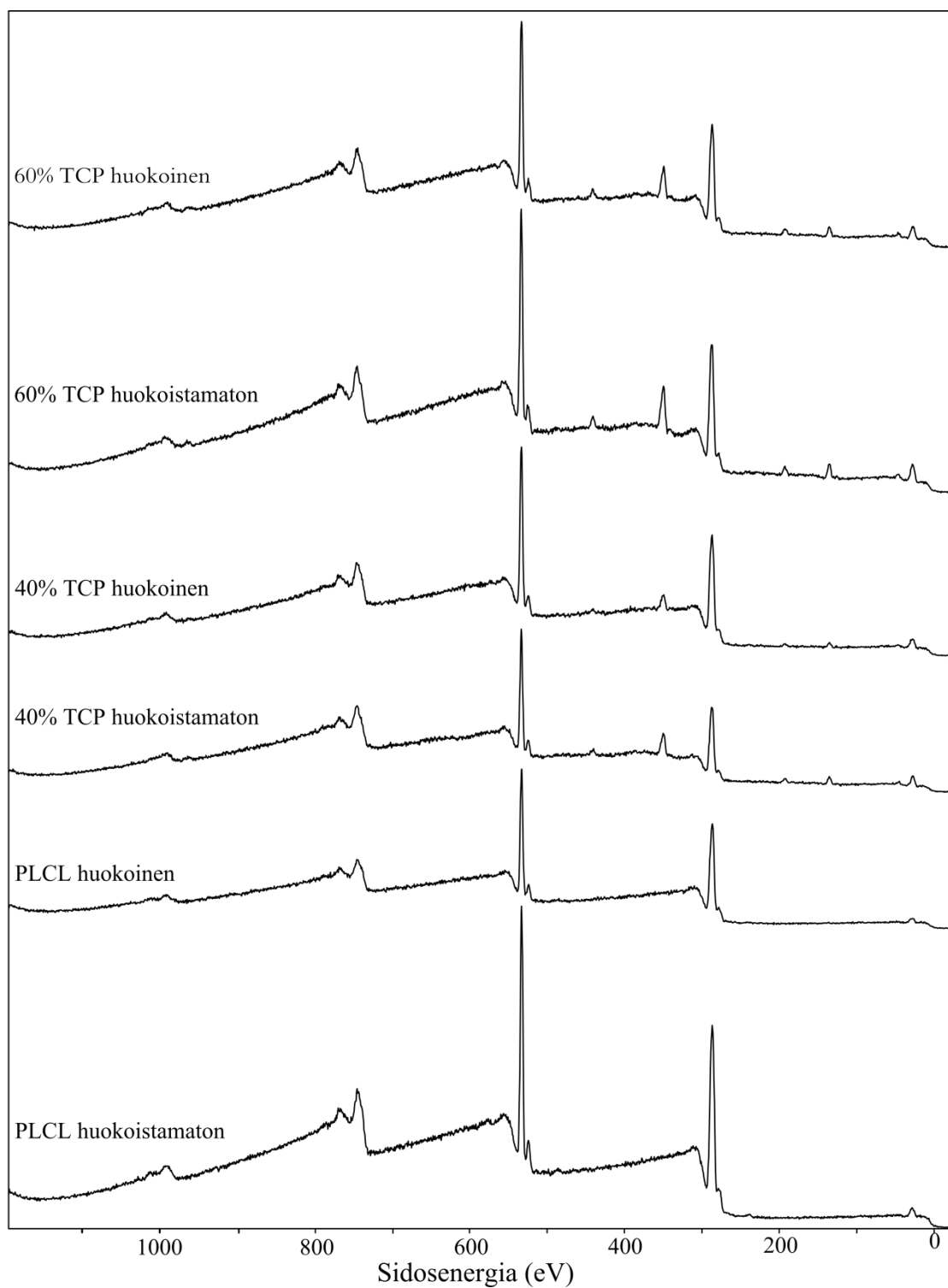
*Kuva B.1: Hiilen kemiallisten tilojen muutos mittausten aikana.*



**Kuva B.2:** Hapen kemiallisten tilojen muutos mittausten aikana. Kuvasta on huomioitava, että mittauksia ei voitu kalibroida hiilen piikin avulla, koska hiiltä ei mitattu.

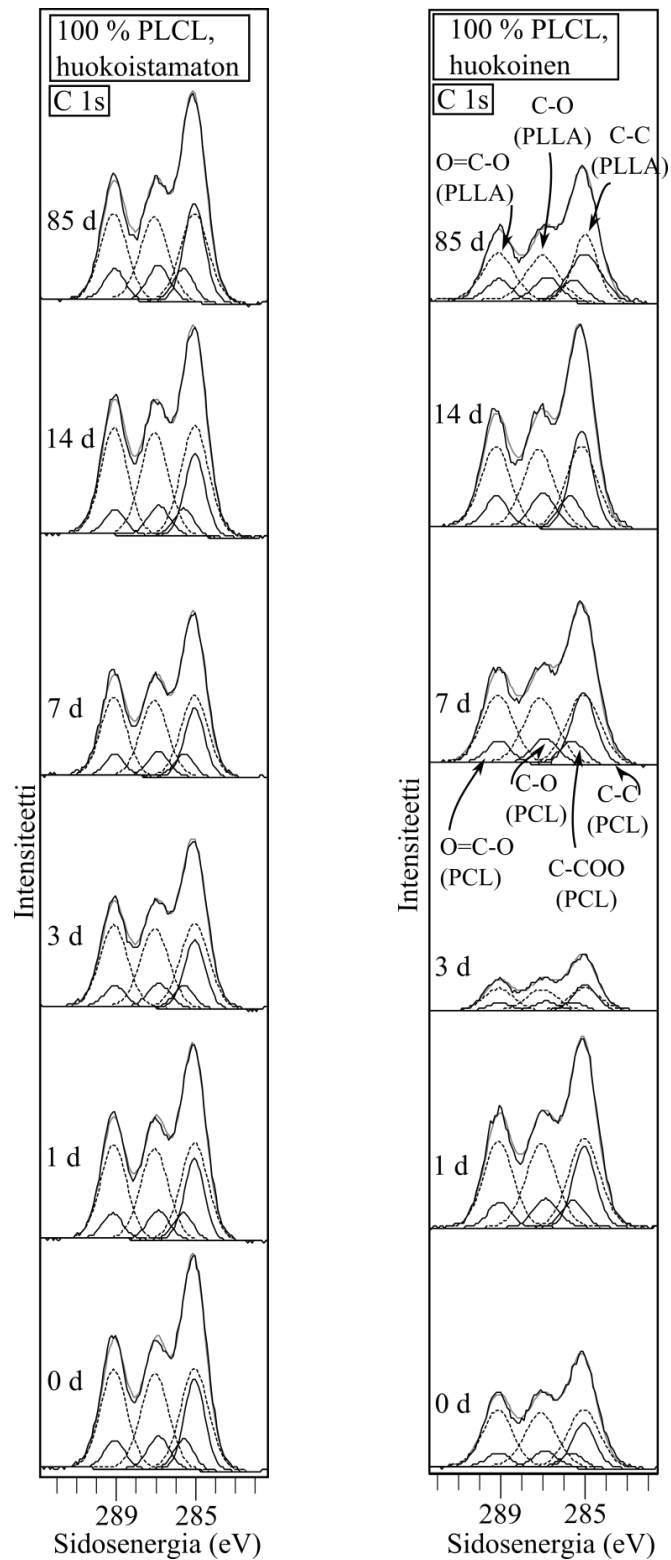


**Kuva B.3:** Kalsiumin kemiallisten tilojen muutos mittausten aikana. Kuvasta on huomioitava, että mittauksia ei voitu kalibroida hiilen piikin avulla, koska hiiltä ei mitattu.

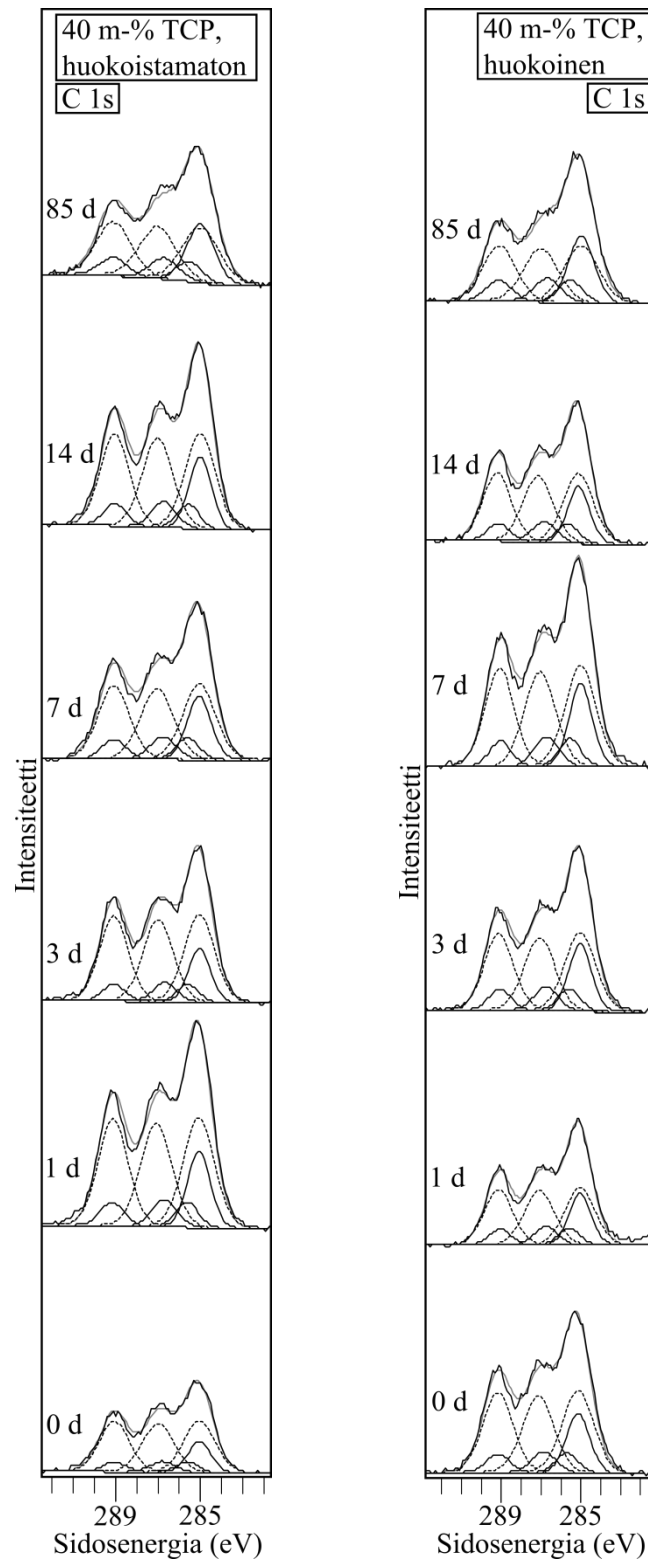
**LIITE C: YLEISSPEKTREJÄ**

**Kuva C.1:** *Kaikilta työssä tutkituilta näytteiltä lähtötilanteiden eli hydrolyysiliuokseen kastamattomien näytteiden yleisspektrit.*

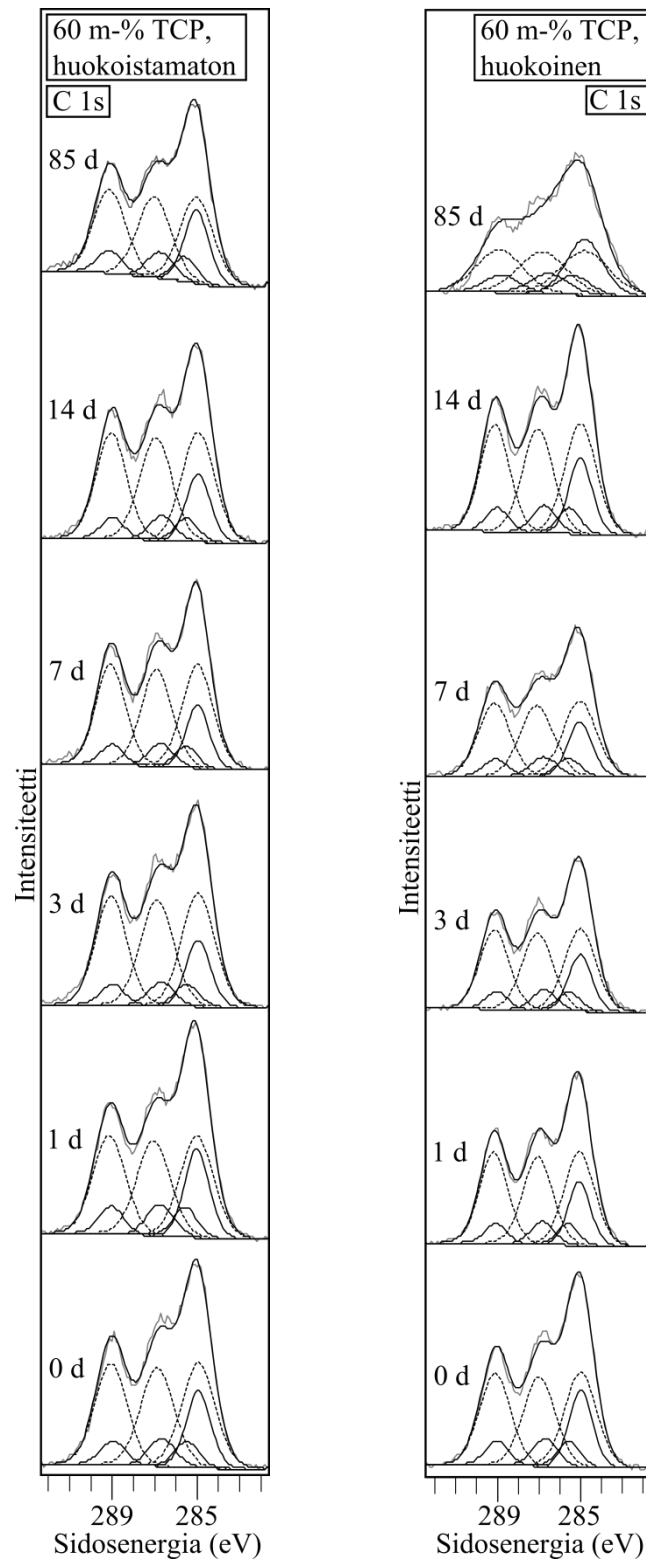
## LIITE D: HIILEN TARKKUUSSPEKTRIT



**Kuva D.1:** Hiilen tarkkuusspektrit 100 % PLCL näytteeltä hydrolyysiajan funktiona. Vasemmalla huokoistamattoman ja oikealla huokoisien näytteen spektrit. Oikealla olevaan kuvaan on nimetty sovitteet, vastaava nimeäminen koskee kaikkia liitteen D hiilen tarkkuusspektrejä.



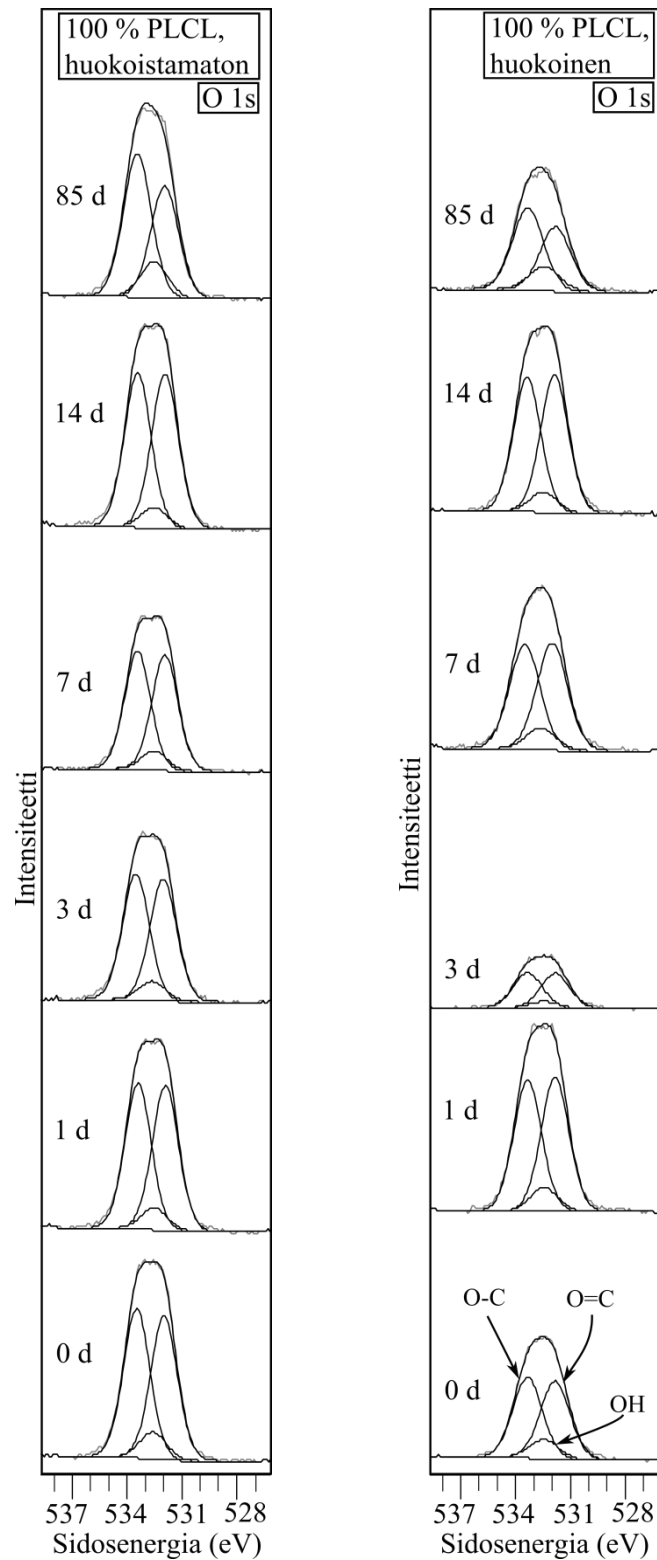
**Kuva D.2:** Hiilen tarkkuusspektrit 40 m-% TCP näytteeltä hydrolyysiajan funktiona. Vasemmalla huokoistamattoman ja oikealla huokoisien näytteen spektrit. Kuvan spektrit ovat edustavimmat mitatut kyseisiä mittauspisteitä vastaavat spektrit. Joitain mittauksia toistettiin ja toistoista työn tulostuksiin on merkitty virhepalkit.



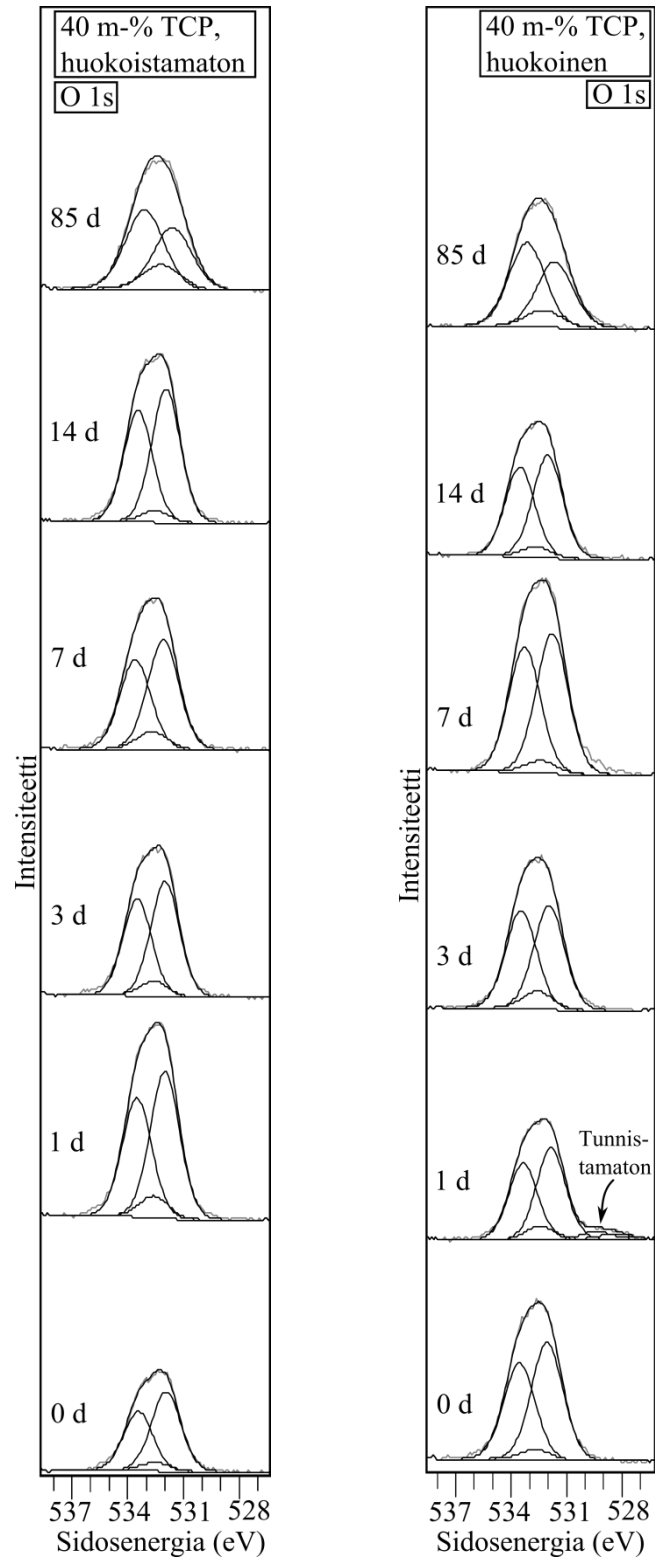
**Kuva D.3:** Hiilen tarkkuusspektrit 60 m-% TCP näytteeltä hydrolyysiajan funktiona. Vasemmalla huokoistamattoman ja oikealla huokoisien näytteen spektrit. Kuvan spektrit ovat edustavimmat mitatut kyseisiä mittauspisteitä vastaavat spektrit. Joitain mittauksia toistettiin ja toistoista työn tulokuviiin on merkitty virhepalkit.



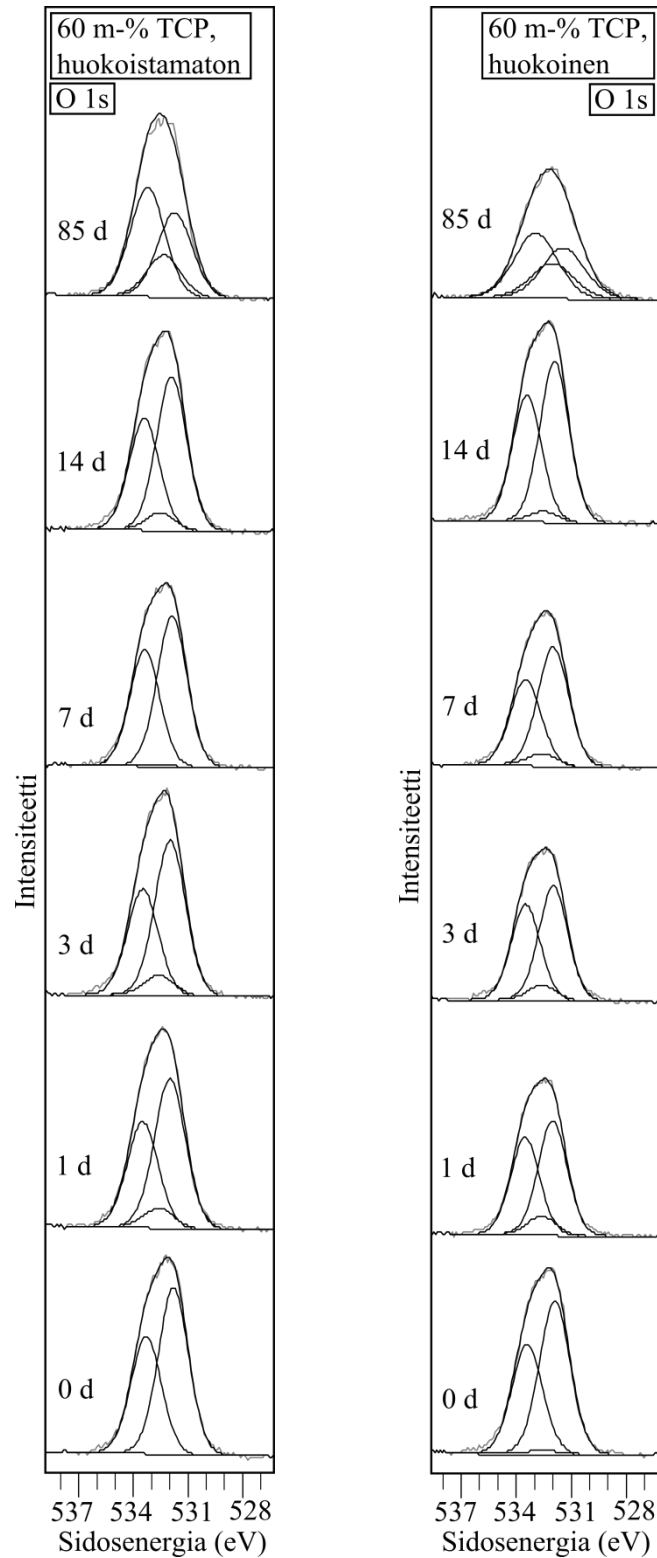
## LIITE E: HAPEN TARKKUUSSPEKTRIT



**Kuva E.1:** Hapen tarkkuusspektrit 100 % PLCL näytteiltä hydrolyysiajan funktiona. Vasemmalla huokoistamattoman ja oikealla huokoisen näytteen spektrit. Oikealla olevaan kuvaan on nimetty sovitteet, vastaava nimeäminen koskee kaikkia liitteen E hapen tarkkuusspektrejä.



**Kuva E.2:** Hapen tarkkuusspektrit 40 m-% TCP näytteiltä hydrolyysiajan funktiona. Vasemmalla huokoistamattoman ja oikealla huokoisien näytteen spektrit. Kuvan spektrit ovat edustavimmat mitatut kyseisiä mittauspisteitä vastaavat spektrit. Joitain mittauksia toistettiin ja toistoista työn tulokuvuihin on merkitty virhepalkit.



**Kuva E.3:** Hapen tarkkuusspektrit 60 m-% TCP näytteiltä hydrolyysiajan funktiona. Vasemmalla huokoistamattoman ja oikealla huokoisien näytteen spektrit. Kuvan spektrit ovat edustavimmat mitatut kyseisiä mittauspisteitä vastaavat spektrit. Joitain mittauksia toistettiin ja toistoista työn tulokuviiin on merkitty virhepalkit.