



NGHIÊN CỨU TRÍCH LY HYDROXYAPATITE TỪ XƯƠNG CÁ TRA (*Pangasianodon hypophthalmus*)

Hồ Quốc Phong^{1*}, Phan Đình Khôi¹, Huỳnh Liên Hương¹, Nguyễn Văn Nhã¹, Nguyễn Thị Bích Thủy¹, Yasuaki Takagi², Lê Thị Minh Thủy³ và Trần Minh Phú³

¹Khoa Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ

²Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Japan

³Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hồ Quốc Phong (email: hqphong@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 21/10/2019

Ngày nhận bài sửa: 28/11/2019

Ngày duyệt đăng: 23/04/2020

Title:

Study on extraction of hydroxyapatite from striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) bone

Từ khóa:

Calcium phosphate, hydroxyapatite, xương động vật, xương cá tra, X-ray diffraction

Keywords:

Animal bone, calcium phosphate, hydroxyapatite, catfish bone, X-ray diffraction

ABSTRACT

Hydroxyapatite (HA) is a calcium phosphate mineral that exists in animal bones and it has good biological compatibility. Therefore, this study was conducted to produce hydroxyapatite (HA) from striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) bone. After pre-treatment in dilute NaOH solution and ethanol, the striped catfish bone was calcined at high temperature to burn all organic compounds and then grinded by ball mill machine to obtain powder of striped catfish bone. The powder was used to react with H_3PO_4 solution to produce HA. Some important factors affecting HA formation such as concentration of H_3PO_4 , reaction temperature, pH value, calcinating time and temperature were investigated. Experimental results showed that it could be produced HA in crystal size of 100 nm and particle size of 1,100 nm when reaction was carried out in solution of H_3PO_4 60 mM, reaction temperature 90 °C, pH 11 and calcinating at 1,000°C in 2 hours.

TÓM TẮT

Hydroxyapatite (HA) là một loại khoáng calcium phosphate tồn tại trong xương động vật và có tính tương hợp sinh học tốt. Vì thế, nghiên cứu được tiến hành nhằm sản xuất hydroxyapatite từ xương cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Sau khi được xử lý với dung dịch NaOH loãng và cồn, xương cá được nung ở nhiệt độ cao nhằm loại bỏ các hợp chất hữu cơ và được nghiền thành bột bằng máy nghiền bi. Bột xương cá sau đó được chuyển hóa thành HA. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự hình thành của HA như nồng độ H_3PO_4 , nhiệt độ phản ứng, pH dung dịch phản ứng, nhiệt độ nung và thời gian nung HA được tiến hành khảo sát. Kết quả cho thấy, có thể sản xuất HA dạng hạt với kích thước tinh thể khoảng 100 nm và kích thước hạt khoảng 1.100 nm khi phản ứng chuyển hóa bột xương cá được thực hiện ở điều kiện H_3PO_4 60 mM, nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và nung ở 1.000 °C trong thời gian 2 giờ.

Trích dẫn: Hồ Quốc Phong, Phan Đình Khôi, Huỳnh Liên Hương, Nguyễn Văn Nhã, Nguyễn Thị Bích Thủy, Yasuaki Takagi, Lê Thị Minh Thủy và Trần Minh Phú, 2020. Nghiên cứu trích ly hydroxyapatite từ xương cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*). Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 56(Số chuyên đề: Thủy sản)(2): 199-211.

1 GIỚI THIỆU

Hydroxyapatite (HA) là một loại muối calcium phosphate, có công thức hóa học là $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ với tỉ lệ Ca/P là 1,67. Trong xương động vật HA chiếm khoảng 65-70%, 5-8% là nước và thành phần còn lại collagen (Sato, 2007). HA được biết như là vật liệu không độc, không gây dị ứng và có tính sát khuẩn cao (Zakharov *et al.*, 2004). Những năm gần đây các nhà khoa học tiến hành nghiên cứu tổng thành công HA từ các loại hóa chất tinh khiết và các thử nghiệm sinh học cho thấy rằng HA có hoạt tính sinh học cao, có khả năng phát triển và hình thành tế bào mô xương, đồng thời thúc đẩy quá trình hình thành xương (Sadat-Shojai *et al.*, 2013).

Trong lĩnh vực y học nhiều ứng dụng của vật liệu HA có thể kể đến như HA dạng bột mịn với kích thước vào khoảng 20 – 100 nm được sử dụng làm thực phẩm chức năng cung cấp calcium cho cơ thể với hiệu quả cao (Guicciardi *et al.*, 2001), tạo các tấm lót ceramic bao bọc các chi tiết kim loại và hợp kim dùng trong kỹ thuật cấy ghép và thay thế xương (Dorozhkin and Sergey, 2010), chế tạo răng giả và sửa chữa các khuyết tật của xương (Kasioptas *et al.*, 2008). Ngoài ra, HA còn được sử dụng là vật liệu gia cường tạo composite với polymer chế tạo các chi tiết cấy ghép xương chất lượng cao, làm kẹp nối xương, làm vật liệu dẫn truyền thuốc (Narayan and Roger, 2009) và HA có cấu trúc xốp, nhẹ được nghiên cứu thành công trong việc chế tạo mắt giả thay thế cho con người (Kundu *et al.*, 2004). Vì thế việc tổng hợp HA được rất nhiều các nhà khoa học quan tâm.

Các nghiên cứu cho thấy rằng HA có thể được tổng hợp từ các chất tinh khiết bằng các phương pháp, có thể phân thành ba nhóm chính như (i) phương pháp khô bao gồm phản ứng pha rắn và hóa cơ (Barakat *et al.*, 2009); (ii) phương pháp ướt bao gồm kết tủa hóa học, thủy phân, sol-gel, thủy nhiệt, nhũ tương (Sopyan *et al.*, 1970; Dawson and William, 1988; Barakat *et al.*, 2008; Shavandi *et al.*, 2015); (iii) phương pháp nhiệt độ cao bao gồm đốt, phân hủy nhiệt (Pattanayak *et al.*, 2007). Mỗi phương pháp có ưu nhược điểm riêng như nhóm phương pháp khô thì dễ dàng tiến hành, mức độ tinh thể cao nhưng kích thước hạt lớn; nhóm phương pháp ướt cho kích thước hạt đạt nano tuy nhiên phải tiến hành qua nhiều công đoạn và mức độ tinh thể không cao; nhóm phương pháp nhiệt độ cao phải sử dụng nhiều năng lượng.

Ngoài ra, một số nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, HA được tổng hợp bằng hóa chất tinh khiết mặc dù

có tính chất sinh học khá tốt nhưng vẫn chưa như mong muốn (Naga *et al.*, 2015; Pon-On *et al.*, 2016). Vì thế, một số nghiên cứu gần đây đã tiến hành điều chế HA sử dụng nguyên liệu là nguồn tự nhiên như vỏ trai (Shavandi *et al.*, 2015), xương bò (Barakat *et al.*, 2009), vỏ trứng (Gergely *et al.*, 2010; Kamalanathan *et al.*, 2014), vẩy cá (Pon-On *et al.*, 2016) nhằm tăng cường tính tương hợp sinh học để có thể thay thế cho các loại HA được tổng hợp từ hóa chất tinh khiết. HA được điều chế từ các nguồn tự nhiên có tính tương hợp sinh học cao hơn so với HA được điều chế từ hóa chất tinh khiết bởi ngoài thành phần chính là calcium và phosphorus thì trong thành phần của xương còn tồn tại một lượng nhỏ các nguyên tố khác như Al, Fe, Mg, K và Cl, các nguyên tố này có thể góp phần tạo điều kiện cho tế bào phát triển trên bề mặt vật liệu tốt hơn và từ đó phát triển mô liên kết (Lin *et al.*, 2011a; Zhang *et al.*, 2014).

Ở Việt Nam ngành thủy sản rất phát triển đặc biệt là cá tra. Theo thông kê của FAO và báo cáo thường niên ngành thủy sản năm 2017 và kế hoạch năm 2018, sản lượng nuôi trồng thủy sản của Việt Nam đạt 3,6 triệu tấn, trong đó cá tra đạt sản lượng 1.3 triệu tấn (FAO, 2018). Với sản lượng thủy sản, đặc biệt cá tra lớn thì xương cá thải ra trong quá trình chế biến là rất đáng kể. Lượng xương cá này có thể tận dụng làm thức ăn chăn nuôi, cũng có thể điều chế nguồn calcium bổ sung. Tuy nhiên, trong nghiên cứu này nhằm tận dụng nguồn xương cá là nguyên liệu để điều chế HA, một loại vật liệu tiềm năng được sử dụng trong lĩnh vực y sinh và kỹ thuật tế bào.

2 PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1 Nguyên liệu và hóa chất

Xương cá tra khoảng 1,5 tuổi được thu mua từ khu công nghiệp Trà Nóc. Các hóa chất như NaOH, H_3PO_4 và NH_3 được cung cấp bởi Công ty Merck được sử dụng trong tiền xử lý và tổng hợp HA từ bột xương cá tra.

2.2 Thử nghiệm

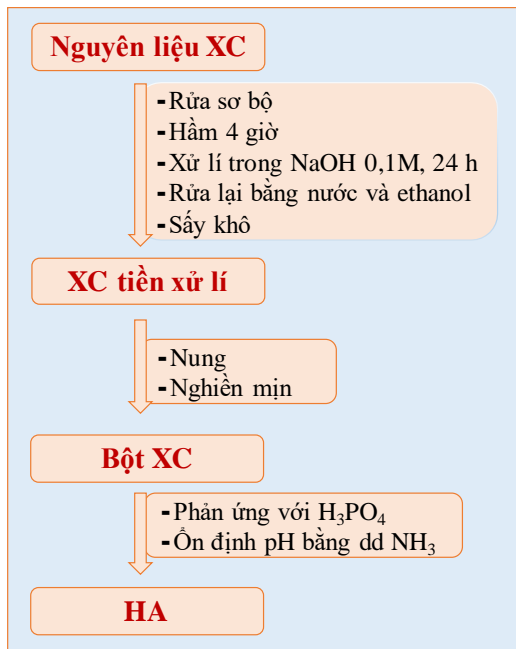
2.2.1 Điều chế bột xương cá

HA được tổng hợp từ xương cá tra theo qui trình được mô tả như Hình 1. Xương cá sau khi thu mua sẽ được rửa sạch và hầm trong 4 giờ để loại bỏ thịt và mỡ. Mẫu xương sau đó được xử lý trong dung dịch NaOH 0.1 M trong 24 giờ để loại bỏ protein trên xương. Mẫu được tiếp tục rửa với nước cất và ethanol 96°, sấy khô ở 100 °C nhằm làm sạch mẫu sau khi đã xử lý bằng NaOH. Mẫu sẽ được nung trong lò (Nabertherm LHT 1750) ở các nhiệt độ khác nhau từ 700°C - 1.100°C trong 6 giờ để loại bỏ

hết tạp chất hữu cơ còn lại trong xương. Mẫu xương cá sau khi nung được nghiền tạo thành bột với kích thước khoảng 5-10 μm sử dụng máy nghiền bi siêu tốc thành bột xương cá (BXC) sử dụng cho quá trình chuyển hóa thành HA.

2.2.2 Chuyển hóa bột xương cá thành HA

Để chuyển hóa bột xương cá thành HA, một lượng 10 g BXC nguyên liệu phản ứng với dung dịch H_3PO_4 với tỉ lệ 1/10 (g/mL) ở các nồng độ khác nhau (0-60 mM). Dung dịch sau đó được đưa về nhiệt độ phòng và ổn định pH 9-12 bằng dung dịch amoniac và khuấy đều trong 2 giờ. Kết thúc phản ứng dung dịch được giữ ổn định 24 giờ ở nhiệt độ phòng, lọc và sấy khô mẫu ở nhiệt độ 100°C. Cuối cùng, mẫu được nung ở nhiệt độ cao (700 – 1.000 °C) nhằm ổn định cấu trúc và thu được bột HA sản phẩm. Sản phẩm HA được xác định kích thước hạt dựa trên phân tích ảnh chụp của kính hiển vi điện tử quét (SEM). Cấu trúc và kích thước của tinh thể của HA được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD). Chất lượng sản phẩm được đánh giá dựa trên so sánh giữa các peak nhiễu xạ XRD của mẫu sản phẩm và mẫu HA chuẩn được cung cấp từ hãng Merck. Qua đó mẫu được đánh giá là tốt hay chất lượng cao khi có sự tương đồng về góc nhiễu xạ và cường độ peak nhiễu xạ và đồng thời không xuất hiện các peak nhiễu xạ của các cấu trúc khác. Nghiên cứu được tiến hành khảo sát theo phương pháp luân phiên từng biến.



Hình 1: Sơ đồ qui trình điều chế bột HA từ xương cá tra

2.3 Phương pháp phân tích đánh giá

2.3.1 Phương pháp nhiễu xạ tia X

Thành phần pha và kích thước trung bình tinh thể được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD), trên máy D8 Advance của hãng Bruker (CHLB Đức), với góc quét 2θ WL = 1,54060 quét từ 10 – 55°, bước đo 0,01 độ/phút, thiết bị hoạt động ở hiệu điện thế U = 40 kV và cường độ dòng điện I = 30 A. Kích thước tinh thể được tính dựa vào phổ nhiễu xạ XRD, sử dụng phương trình Scherrer (Vorokh, 2018). Mẫu tổng hợp được so sánh với HA chuẩn (Merck) với độ tinh khiết > 99,5%.

2.3.2 Phương pháp quét kính hiển vi điện tử

Các đặc trưng về hình thái và kích thước hạt được quan sát bằng phương pháp quét kính hiển vi điện tử (FE-SEM), S-4800 của hãng HITACHI (Nhật Bản) có độ phân giải cao và độ phóng đại từ x25 đến x800, và điện áp gia tốc 30 kV. Kích thước của hạt HA được xác định bằng phần mềm phân tích ảnh ImageJ thông qua ảnh SEM của mẫu.

2.3.3 Phương pháp quang phổ huỳnh quang tia X (XRF)

Thành phần và hàm lượng các hợp chất trong xương nguyên liệu được phân tích bằng phương pháp quang phổ huỳnh quang tia X (XRF). Phương pháp được thực hiện trên dòng máy XRF-310, sản xuất bởi hãng PG Instruments. Thông số thiết bị như các nguyên tố trong phạm vi đo Al - U, phạm vi hàm lượng đo từ 1 ppm – 99.9%, nguồn năng lượng phát xạ 50 W, độ phân giải đầu dò 149 Ev, liều lượng phát xạ $\leq 0.2 \mu\text{Sv/h}$.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

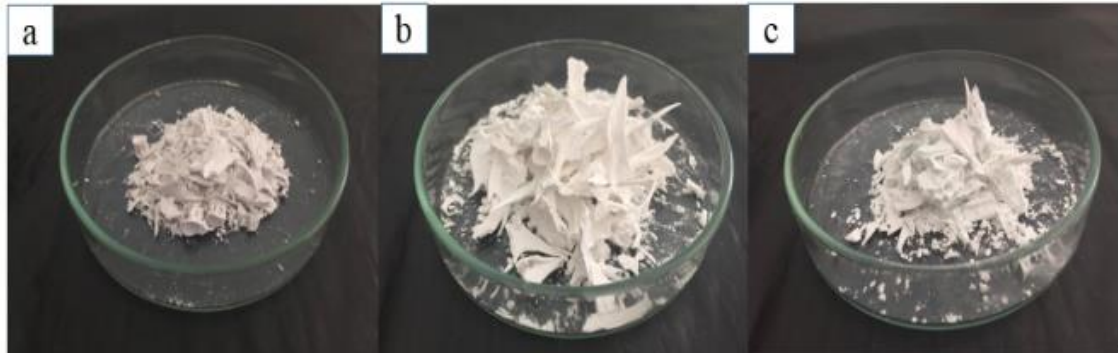
3.1 Điều chế bột xương cá

Xương cá đã qua các giai đoạn hầm 4 giờ, rửa và xử lí bằng ethanol, mẫu xương cá vẫn còn nhiều thành phần hữu cơ tồn tại phía trong. Để loại bỏ toàn bộ thành phần hữu cơ này, xương cá sau khi xử lí được nung ở các nhiệt độ khác nhau trong khoảng 700°C đến 1.100 °C. Kết quả ở Hình 2 cho thấy xương cá nung ở nhiệt độ này tạp chất hữu cơ và carbon chưa phân hủy hoàn toàn. Ở nhiệt độ 900°C, mẫu xương cá có màu trắng sáng do đó tạp chất hữu cơ trong xương đã được loại bỏ hoàn toàn. Đối với mẫu xương nung ở 1.100 °C, xương có màu trắng ánh xanh.

Bên cạnh, kết quả phân tích thành phần nguyên tố XRF (Bảng 1) cho thấy ở cả hai mẫu xương đều có thành phần tương tự nhau. Ca và P là hai thành

phần chính được tìm thấy nhiều nhất trong xương ở dạng oxide CaO và P₂O₅, còn lại là các thành phần oxide khác. Đối với mẫu nung ở nhiệt độ 900°C, hàm lượng CaO 43.4% và P₂O₅ 36.2%, bên cạnh mẫu nung ở nhiệt độ 1.100°C hàm lượng CaO 44.6% và P₂O₅ 39.1%. Bảng 1 cũng cho thấy tỉ lệ của Ca/P giảm khi nung ở nhiệt độ 1.100°C so với ở

900°C. Kết quả tương tự với nghiên cứu của Venkatesan *et al.* (2010) khi nung xương cá ngừ thì hàm lượng CaO 38.9% và P₂O₅ 32.7% (Venkatesan and Kim, 2010). Vì thế, 900°C được chọn làm nhiệt độ nung xương các dùng làm bột nguyên liệu tổng hợp HA.



Hình 2: Mẫu xương cá nguyên liệu được nung ở nhiệt độ khác nhau: (a) 700°C, (b) 900°C và (c) 1100°C

Bảng 1: Thành phần xương cá sau khi nung được phân tích bằng XRF

Nhiệt độ nung, °C	Thành phần hóa học bột xương cá sau khi nung, %khối lượng								
	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	Cl	P ₂ O ₅	Ca/P
900	0,09	0,01	43,40	1,16	0,01	3,42	0,01	36,23	1,52
1100	0,11	0,01	44,63	1,14	0,01	3,96	0,01	39,16	1,44

3.2 Ảnh hưởng của nồng độ dung dịch H₃PO₄ đến sự chuyển hóa HA từ BXC

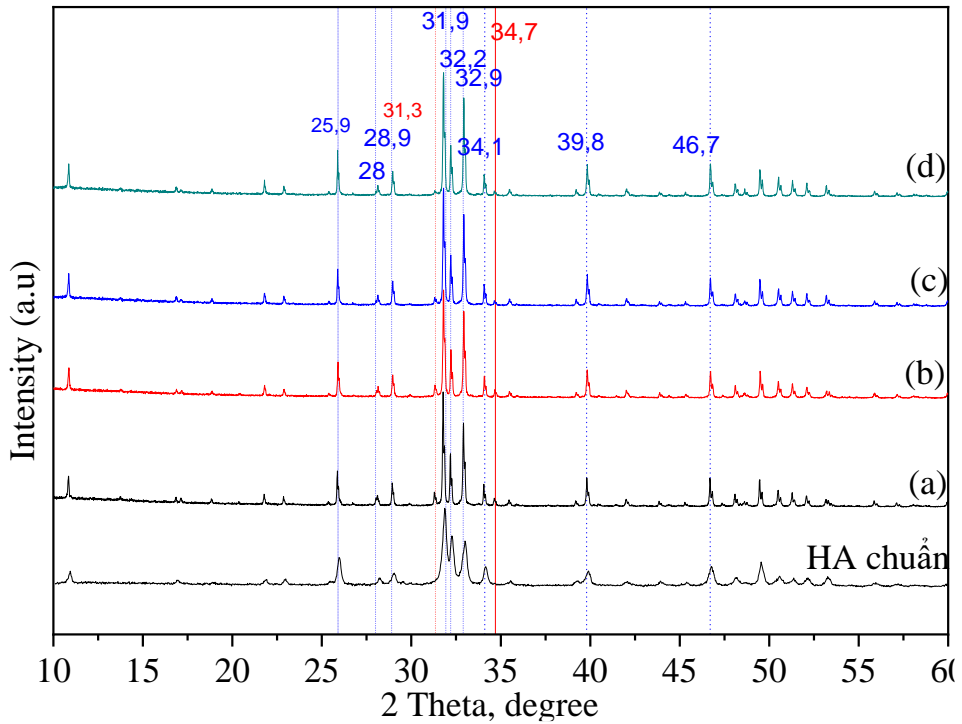
Sau khi nung ở 900°C, thành phần khối lượng của xương cá chiếm 43,4% CaO và 36,2% P₂O₅ (Bảng 1) và kết quả phân tích nhiễu xạ tia X (XRD) (Hình 3a) cho thấy rằng mẫu BXC đã tồn tại các đỉnh đặt trung của HA tại các vị trí 2θ = (25.9; 28; 28.9; 31.9; 32.2; 32.9; 34.1; 39.8; 46.7; 48.1; 49.5; 50.6; 51.3; 52.1; 53.2) cùng với các đỉnh đặc trưng của β-TCP và CaO ở các vị trí 2θ = 31,3 và 34,7. Như vậy, xương cá sau khi nung đã tồn tại cấu trúc tinh thể HA. Để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ H₃PO₄ đến sự hình thành HA, bột xương cá (BXC) được phản ứng với dung dịch H₃PO₄ ở các nồng độ khác nhau thay đổi từ 40 mM đến 60 mM. Điều kiện phản ứng được cố định tỉ lệ BXB/dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), nhiệt độ phản ứng 80 °C, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ. Kết quả phân tích XRD cho thấy các mẫu sau khi phản ứng có cường độ peak đặc trưng của HA tăng lên khi tăng nồng độ dung dịch H₃PO₄ và đồng thời các cường độ của các peak ở các vị trí 2θ = 31,3 và 34,7

giảm xuống (Hình 3b-d) chứng tỏ hàm lượng β-TCP và CaO đã giảm xuống.

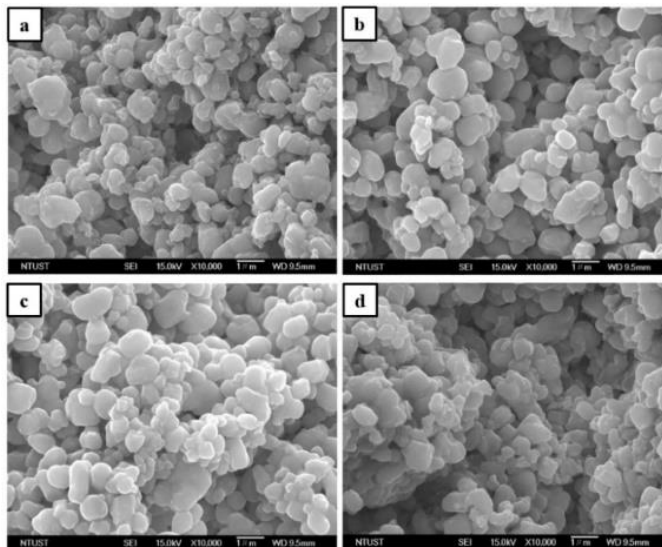
Kích thước tinh thể được xác định từ nhiễu xạ sử dụng công thức Scherrer và trình bày trong Bảng 2 cho thấy kích thước tinh thể dao động từ 96 – 97 nm. Ngoài ra, kết quả phân tích SEM (Hình 4) của các mẫu cho thấy, các mẫu có dạng hạt cầu bất đối xứng. Quan sát từ ảnh có thể thấy ở nồng độ H₃PO₄ khác nhau, các hạt hầu như ít có sự thay đổi về hình thái và khá đồng đều và kích thước hạt khoảng 900-1150 nm. Từ những nhận định trên, nồng độ H₃PO₄ 60 mM được chọn làm điều kiện cố định cho các khảo sát tiếp theo.

Bảng 2: Ảnh hưởng nồng độ dung dịch H₃PO₄ đến HA

Kích thước (nM)	Nồng độ H ₃ PO ₄ , (mM)			
	0	40	50	60
Kích thước tinh thể	97,4	96,9	97,2	96,8
Kích thước hạt	895±102	1055±90	1150±85	1150±95



Hình 3: Nhiễu xạ XRD mẫu HA tổng hợp ở các nồng độ H_3PO_4 khác nhau: (a) 0 mM, (b) 40 mM, (c) 50 mM và (d) 60 mM. Điều kiện cố định: BXC/ dd H_3PO_4 = 1/10, nhiệt độ phản ứng 80°C, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ



Hình 4: Ảnh SEM của mẫu HA tổng hợp ở các nồng độ H_3PO_4 khác nhau: (a) 0 mM, (b) 40 mM, (c) 50 mM và (d) 60 mM. Điều kiện cố định: BXC/ dd H_3PO_4 = 1/10, nhiệt độ phản ứng 80°C, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ

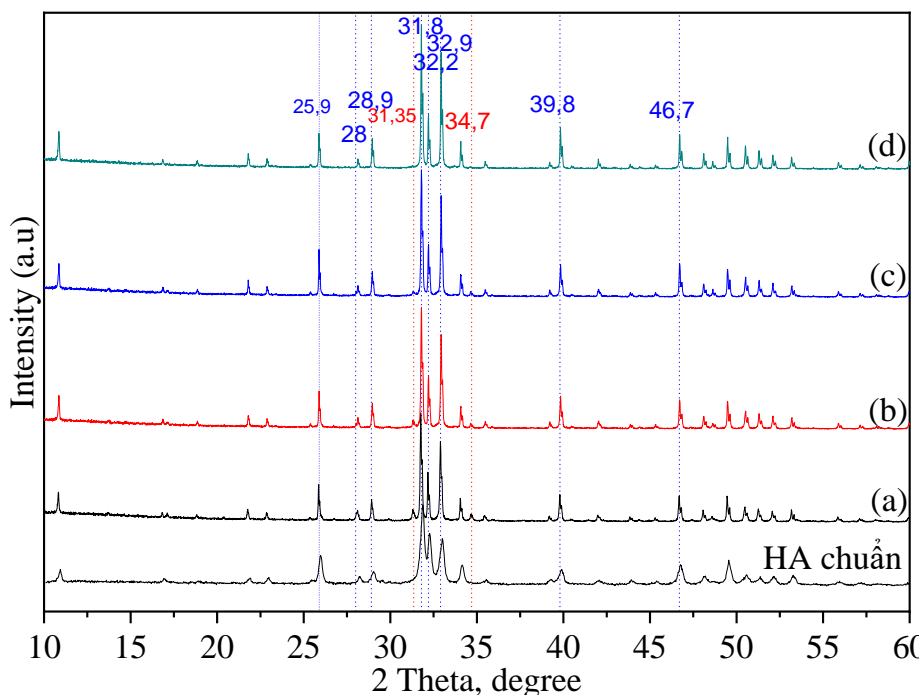
3.3 Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến sự chuyển hóa HA từ BXC

Thí nghiệm được tiến hành ở điều kiện nhiệt độ thay đổi từ 60 °C đến 90 °C để khảo sát ảnh hưởng

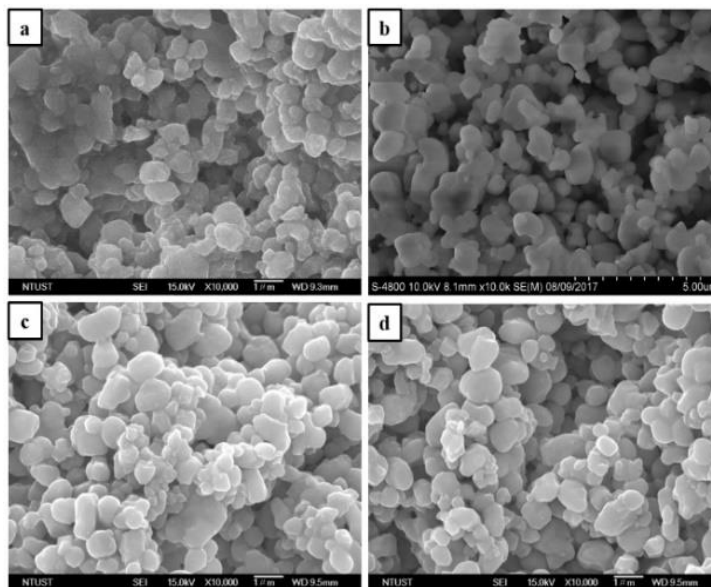
của nhiệt độ đến sự hình thành HA. Điều kiện phản ứng được cố định tỉ lệ BXB/dd H_3PO_4 = 1/10 (g/mL), dung dịch H_3PO_4 60 mM, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ. Kết quả

phân tích XRD (Hình 5) cho thấy nhiều xạ của các mẫu tổng hợp đều có các đỉnh đặc trưng của HA tại các vị trí $2\theta = (25.9; 28; 28.9; 31.9; 32.2; 32.9; 34.1; 39.8; 46.7; 48.1; 49.5; 50.6; 51.3; 52.1; 53.2)$. Cường độ của các đỉnh của HA tăng dần khi tăng nhiệt độ phản ứng đồng thời các đỉnh đặc trưng của β -TCP tại các vị trí $2\theta = 31,3$ và $34,7$ giảm dần. Ở nhiệt độ phản ứng từ $70 - 90^\circ\text{C}$ có sự chuyển hóa β -TCP theo hướng hình thành HA. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước đó của Jing Luo *et al.* (2015) khi tiến hành tổng hợp HA từ nhiệt độ $75 - 95^\circ\text{C}$, β -TCP có xu hướng chuyển dần sang HA, khi nhiệt độ phản ứng trên 90°C trong thành phần hầu như còn lại 1 pha duy nhất là HA (Luo *et al.*, 2015).

Kết quả phân tích SEM (Hình 6) cho thấy các mẫu đều có sự hình thành HA dạng hình cầu không đối xứng. Kích thước hạt HA vào khoảng 1.000 nm và không có sự khác nhau giữa các mẫu. Tuy nhiên, kết quả phân tích kích thước cho thấy HA có kích thước tinh thể trung bình khá nhỏ ($60-100\text{ nm}$), khi tăng nhiệt độ phản ứng kích thước tinh thể tăng lên (Bảng 3). Điều này có thể thấy rằng khi nhiệt độ tăng lên làm tăng tốc độ phản ứng dẫn đến tăng kích thước tinh thể. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lazic *et al.* (2001) khi tổng hợp HA trong dung dịch. Từ các kết quả thu được cho thấy, nhiệt độ 90°C thích hợp để chuyển hóa BXC thành HA.



Hình 5: Nhiều xạ XRD mẫu HA tổng hợp ở các nhiệt độ khác nhau: (a) 60°C , (b) 70°C , (c) 80°C và (d) 90°C . Điều kiện cố định: BXC/ dd $\text{H}_3\text{PO}_4 = 1/10$ (g/mL), H_3PO_4 (60 mM), pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ



Hình 6: Ảnh SEM mẫu HA tổng hợp ở các nhiệt độ khác nhau: (a) 60°C, (b) 70°C, (c) 80°C và (d) 90°C. Điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ (60 mM), pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ

Bảng 3: Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến HA

Kích thước, nm	Nhiệt độ, °C			
	60	70	80	90
Kích thước tinh thể	61,7	88,3	96,6	99,3
Kích thước hạt	995±92	1.025±98	1.010±105	1.050±95

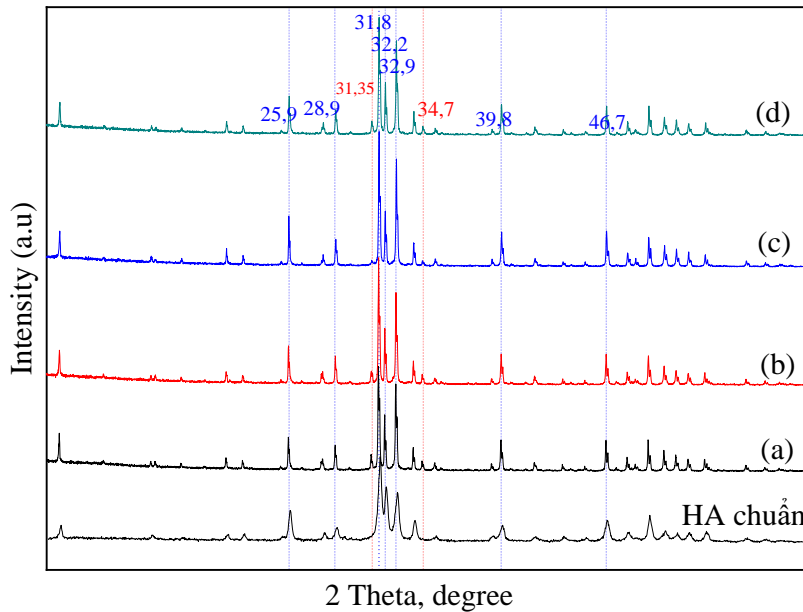
3.4 Ảnh hưởng pH đến sự chuyển hóa BXC thành HA

Khảo sát ảnh hưởng của pH lên sự chuyển hóa BXC thành HA được thí nghiệm thực hiện trong môi trường pH (9-12). Điều kiện phản ứng được cố định tỉ lệ BXB/dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), dung dịch H₃PO₄ 60 mM, nhiệt độ phản ứng là 90 °C và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900 °C trong 1 giờ. Kết quả phân tích nhiễu xạ tia X cho thấy rằng các mẫu đều tồn tại các peak đặc trưng của HA tại vị trí 2θ = (25.9; 28; 28.9; 31.9; 32.2; 32.9; 34.1; 39.8; 46.7; 48.1; 49.5; 50.6; 51.3; 52.1; 53.2) (Hình 7). Cường độ của các peak đặc trưng HA tăng dần khi pH tăng

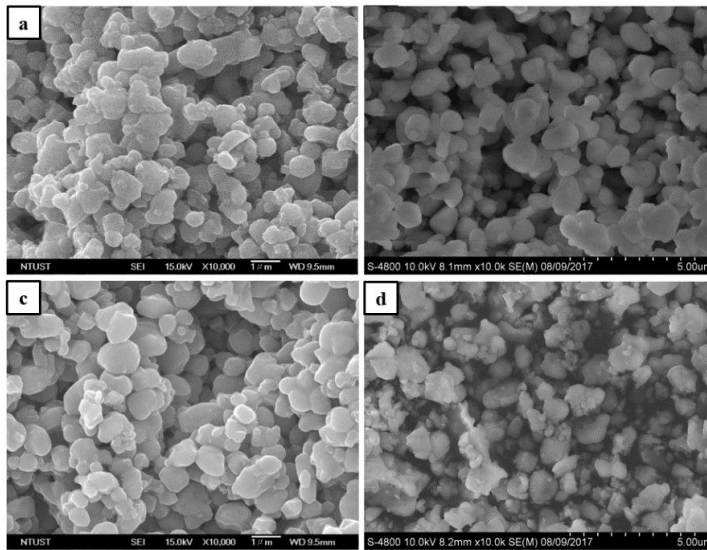
từ 9 -11 sau đó giảm khi pH 12. Cường độ peak của β - TCP tại vị trí 2θ = 31,3 và 34,7 giảm dần khi tăng pH và hầu như tiêu biến ở pH 11. Tuy nhiên, khi tăng pH lên 12, cường độ peak tại vị trí 2θ = 31,3 và 34,7 xuất hiện trở lại. Palanivelu *et al.* (2014) cho thấy rằng khi tăng từ pH sẽ tăng dần sự biến đổi của các ion Ca²⁺ và PO₄³⁻ và làm tăng sự chuyển hóa theo hướng hình thành HA và pH 11 là điều kiện tốt nhất. Bảng 4 cho thấy kích thước tinh thể của HA vào khoảng 100 nm. Kết quả phân tích SEM (Hình 8) cho thấy ở môi trường pH khác nhau có hình dạng tương tự nhau và kích thước của hạt là khoảng 1000 nm (Bảng 4).

Bảng 4: Ảnh hưởng của pH ứng đến kích thước của HA

Kích thước, nm	pH			
	9	10	11	12
Kích thước tinh thể, nm	102,0	101,6	99,3	100,9
Kích thước hạt, nm	1.005±91	1.035±99	1.060±106	1.010±94



Hình 7: Nhiễu xạ XRD mẫu HA tổng hợp ở môi trường pH khác nhau: (a) pH 9, (b) pH 10, (c) pH 11 và (d) pH 12. Điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ (60 mM), nhiệt độ phản ứng 90°C và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ



Hình 8: Ảnh SEM mẫu HA tổng hợp ở môi trường pH khác nhau: (a) pH 9, (b) pH 10, (c) pH 11 và (d) pH 12. Điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ (60 mM), nhiệt độ phản ứng 90°C và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C trong 1 giờ

3.5 Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến sự chuyển hóa của HA

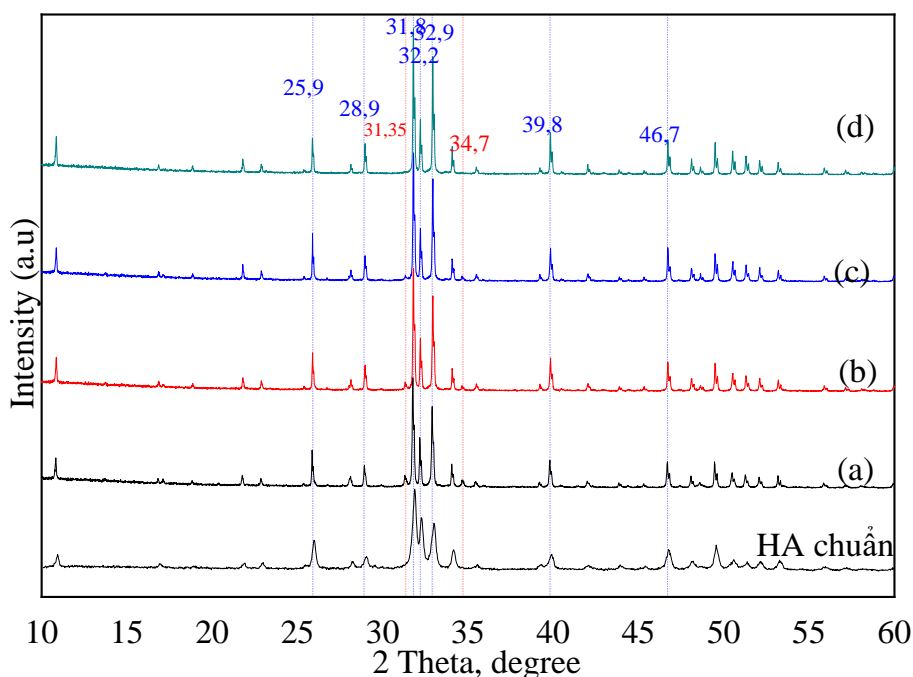
Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến HA các thí nghiệm được khảo sát ở trong khoảng từ 700°C - 1000°C. Trong đó, các điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ 60 mM, nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và thời gian nung trong 1

giờ. Kết quả phân tích nhiễu xạ tia X cho thấy các mẫu đều tồn tại các peak đặc trưng của HA tại vị trí $2\theta = (25.9; 28; 28.9; 31.9; 32.2; 32.9; 34.1; 39.8; 46.7; 48.1; 49.5; 50.6; 51.3; 52.1; 53.2)$ (Hình 9). Cường độ của các peak đặc trưng HA tăng dần khi pH khi tăng nhiệt độ nung và cao nhất ở 1000°C. Ngược lại, cường độ peak của β - TCP tại

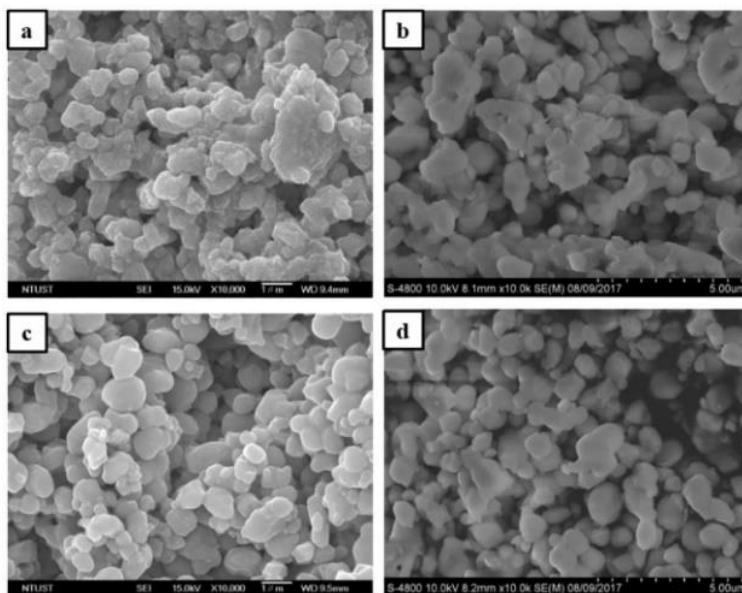
vị trí $2\theta = 31,3$ và $34,7$ giảm dần khi tăng nhiệt độ và hầu như biến mất khi nhiệt độ ở 1.000°C . Như vậy, nhiệt độ nung có ảnh hưởng lớn đến quá trình thành và ổn định cấu trúc tinh thể HA. Tuy nhiên, cần lưu ý khi nhiệt độ cao 1.100°C , HA sẽ chuyển thành các dạng khác như β -TCP, α' -TCP hay α -TCP (Oshida, 2014).

Kết quả phân tích kích thước tinh thể trung bình từ giản đồ XRD (Bảng 5), thấy rằng các kích thước tinh thể tăng khi tăng nhiệt độ. Kích thước tinh thể của HA là $61,7$ nm, $88,3$ nm, $99,3$ nm và $101,2$ nm, tương ứng nhiệt độ nung là 700°C , 800°C , 900°C và 1.000°C . Như vậy, nhiệt độ nung có ảnh hưởng quan trọng đến sự ổn định và hình thành cấu trúc HA và hình thành tinh thể HA. Tuy nhiên, khi tổng hợp HA

bằng hóa chất tinh khiết cho thấy nhiệt độ nung phù hợp để ổn định cấu trúc chỉ vào khoảng 600°C (Pattanayaket al., 2007; Abidi and Murtaza, 2014). Điều này cho thấy HA được chuyển hóa từ xương tự nhiên cần nhiệt độ nung khá cao để ổn định cấu trúc. Tương tự như trong trường hợp sử dụng bột xương bò làm nguyên liệu, nhiệt độ nung ổn định cấu trúc cũng là 900°C trong khoảng thời gian 4 giờ (Phong et al., 2019). Như vậy, nhiệt độ thích hợp để nung ổn định cấu trúc của HA khi sử dụng BXC làm nguyên liệu là 1.000°C trong khoảng thời gian 2 giờ. Kết quả phân tích SEM (Hình 10) cho thấy ở nhiệt độ nung từ 700 đến 1.000°C , HA có hình dạng tương tự nhau và kích thước của hạt là khoảng 1.050 nm.



Hình 9: Nhiễu xạ XRD mẫu HA được nung ở các nhiệt độ khác nhau: (a) 700°C , (b) 800°C , (c) 900°C và (d) 1000°C . Điều kiện cố định: BXC/ dd $\text{H}_3\text{PO}_4 = 1/10$ (g/mL), H_3PO_4 (60 mM), nhiệt độ phản ứng 90°C , pH 11 và thời gian nung trong 1 giờ



Hình 10: Ảnh SEM mẫu HA được nung ở các nhiệt độ khác nhau: (a) 700°C, (b) 800°C, (c) 900°C và (d) 1000°C. Điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ (60 mM), nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và thời gian nung trong 1 giờ

Bảng 5: Ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến kích thước của HA

Kích thước, nm	Nhiệt độ nung (°C)			
	700	800	900	1000
Kích thước tinh thể	61,7	88,3	99,3	101,2
Kích thước hạt	1025±96	1075±97	1080±98	1060±104

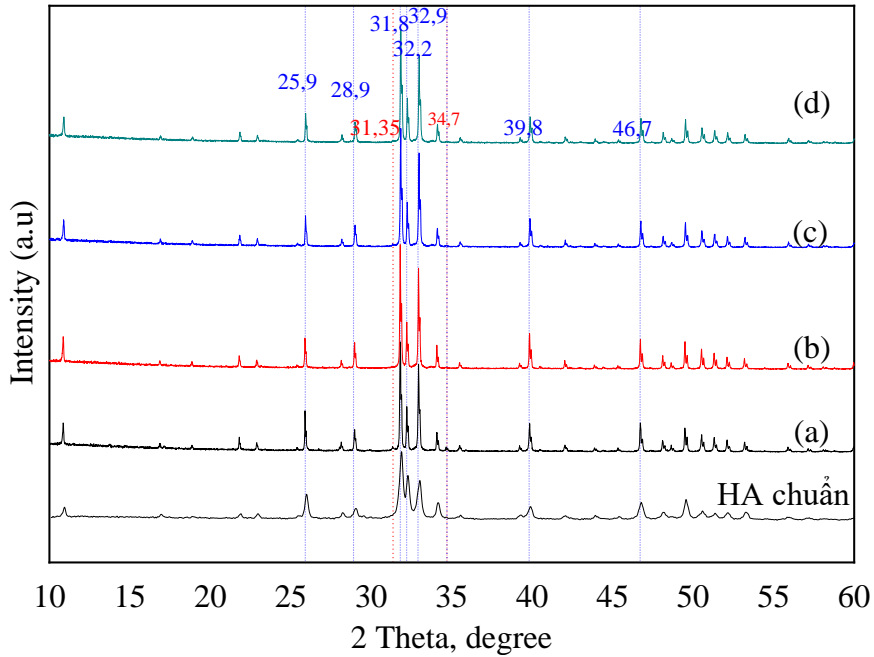
3.6 Ảnh hưởng của thời gian nung đến sự chuyển hóa của HA

Để khảo sát ảnh hưởng của thời gian nung lên sự hình thành HA, các mẫu sau tổng hợp được nung ở các nhiệt độ khác nhau 1000 °C trong các khung thời gian từ 1- 4 giờ. Trong đó, các điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ 60 mM, nhiệt độ phản ứng 90 °C, pH 11 và nhiệt độ nung 1000 °C. Kết quả phân tích nhiễu xạ tia X cho thấy các mẫu đều tồn tại các peak đặc trưng của HA tại vị trí 2θ = (25.9; 28; 28.9; 31.9; 32.2; 32.9; 34.1; 39.8; 46.7; 48.1; 49.5; 50.6; 51.3; 52.1; 53.2) (Hình 11). Cường độ của các peak đặc trưng HA tăng khi thời

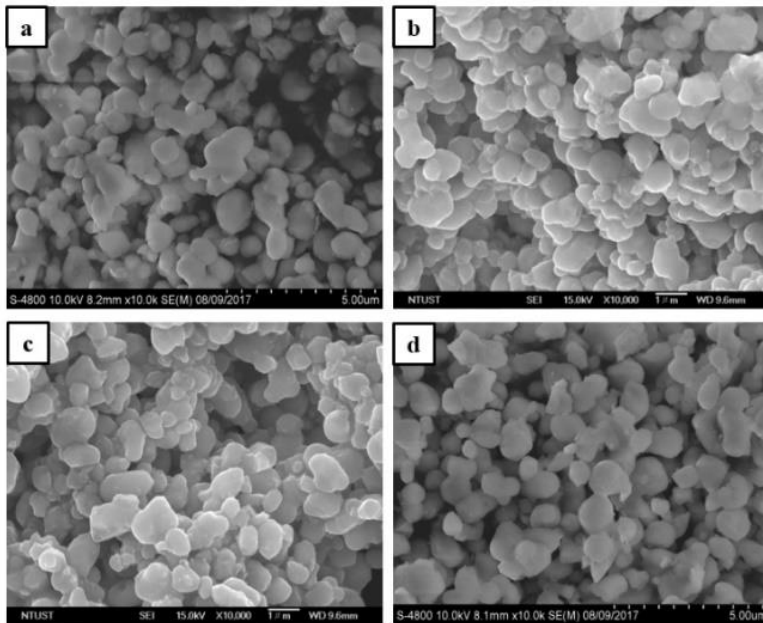
gian nung tăng từ 1 giờ lên 2 giờ. Tuy nhiên, khi thời gian tăng lên 3 giờ và 4 giờ, cường độ các peak này có xu hướng giảm xuống. Cường độ peak của β - TCP tại vị trí 2θ = 31,3 và 34,7 giảm dần và biến mất khi thời gian nung là 2 giờ. Kích thước tinh thể HA được tính toán và trình ở Bảng 6, cho thấy kích thước tinh thể có xu hướng tăng khi tăng thời gian nung từ 1 đến 4 giờ. Kết quả phân tích SEM (Hình 12) cho thấy thời gian nung từ 1 đến 4 giờ, HA có hình dạng tương tự nhau và kích thước của hạt là khoảng 1100 nm. Kết quả trên cũng phù hợp với nghiên cứu của Aminatun et al. (2013) khi tiến hành tổng hợp HA từ nang mực. Như vậy, 2 giờ là thời gian thích hợp cho quá trình nung để hình thành và ổn định cấu trúc HA.

Bảng 6: Ảnh hưởng của thời gian nung đến HA

Thời gian nung, giờ	1	2	3	4
Kích thước tinh thể, nm	101,9	112,9	116,5	129,5
Kích thước hạt, nm	1015±99	1095±102	1140±98	1160±105



Hình 11: Nhiễu xạ XRD mẫu HA được nung ở các khoảng thời gian khác nhau: (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ và (d) 4 giờ. Điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ (60 mM), nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và nhiệt độ nung 1000°C



Hình 12: Ảnh SEM mẫu HA được nung ở các khoảng thời gian khác nhau: (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ và (d) 4 giờ. Điều kiện cố định: BXC/ dd H₃PO₄ = 1/10 (g/mL), H₃PO₄ (60 mM), nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và nhiệt độ nung 1000°C

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã chuyển hóa thành công xương cá tra thành hydroxypaptite. Các khảo sát cho thấy rằng

có thể sản xuất HA có kích thước tinh thể khoảng 100 nm và kích thước hạt khoảng 1.100 nm khi tiến hành thực hiện phản ứng chuyển hóa giữa BXC và

H₃PO₄ có nồng độ 60 mM, nhiệt độ phản ứng 90°C, pH dung dịch là 11 và nhiệt độ nung ở 1.000°C trong thời gian 2 giờ. Kết quả cho thấy nghiên cứu đã góp phần nâng cao giá trị ứng dụng của xương cá tra và đưa xương cá trở thành nguồn nguyên liệu tiềm năng trong nghiên cứu sản xuất HA có nhiều ứng dụng quan trọng trong lĩnh vực y sinh.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn kinh phí nghiên cứu được tài trợ bởi Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ chính phủ Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Abidi, Syed Sibte Asghar and Qasim Murtaza, 2014. Synthesis and characterization of nano-hydroxyapatite powder using wet chemical precipitation reaction. *Journal of Materials Science & Technology*, 30(4): 307-310.
- Aminatun, Siswanto Siswanto, YM Penga, Retna Apsari and Istifarah, 2013. The effect of sintering process on the characteristics of hydroxyapatite from cuttlefish bone (*Sepia Sp.*). 4(4): 1431-1442.
- Barakat, Nasser AM, KA Khalil, Faheem A Sheikh, AM Omran, Babita Gaihre, Soeb M Khil and Hak Yong Kim, 2008. Physicochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAP. *Materials Science and Engineering: C* 28(8): 1381-1387.
- Barakat, Nasser AM, Myung Seob Khil, AM Omran, Faheem A Sheikh and Hak Yong Kim, 2009. Extraction of pure natural hydroxyapatite from the bovine bones bio waste by three different methods. *Journal of materials processing technology* 209(7): 3408-3415.
- Dawson and J William, 1988. Hydrothermal synthesis of advanced ceramic powders. *American Ceramic Society Bulletin* 67(10): 1673-1678.
- Dorozhkin and Sergey V, 2010. Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art. *Journal of Functional Biomaterials* 1(1): 22-107.
- FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. Rome: 227.
- Gergely, Gréta, Ferenc Wéber, István Lukács, Attila L Tóth, Zsolt E Horváth, Judit Mihály and Csaba Balázs, 2010. Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell. *Ceramics International* 36(2): 803-806.
- Guicciardi, S, C Galassi, E Landi, Anana Tampieri, K Satou and G Pezzotti, 2001. Rheological characteristics of slurry controlling the microstructure and the compressive strength behavior of biomimetic hydroxyapatite. *Journal of Materials Research* 16(1): 163-170.
- Kamalanathan, P, S Ramesh, LT Bang, A Niakan, CY Tan, J Purbolaksono, Hari Chandran and WD Teng, 2014. Synthesis and sintering of hydroxyapatite derived from eggshells as a calcium precursor. *Ceramics International* 40(10): 16349-16359.
- Kasioptas, A, C Perdikouri, CV Putnis and Andrew Putnis, 2008. Pseudomorphic replacement of single calcium carbonate crystals by polycrystalline apatite. *Mineralogical Magazine* 72(1): 77-80.
- Kundu, B, Mithlesh Kumar Sinha, MK Mitra and Debabrata Basu, 2004. Fabrication and characterization of porous hydroxyapatite °Cular implant followed by an in vivo study in dogs. *Bulletin of Materials Science* 27(2): 133-140.
- Lazić, Slavica, Slavica Zec, Nada Miljević and Slobodan Milonjić, 2001. The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. 374(1): 13-22.
- Lin, Kaili, Yanling Zhou, Yue Zhou, Haiyun Qu, Feng Chen, Yingjie Zhu and Jiang Chang, 2011a. Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release. *Journal of Materials Chemistry* 21(41): 16558-16565.
- Luo, Jing, Juan Chen, Wenzhao Li, Zhiliang Huang and Changlian Chen, 2015. Temperature effect on hydroxyapatite preparation by co-precipitation method under carbamide influence. *MATEC Web of Conferences, EDP Sciences*: 1-4.
- Naga, SM, HF El-Maghraby, EM Mahmoud, MS Talaat and AM Ibrhim, 2015. Preparation and characterization of highly porous ceramic scaffolds based on thermally treated fish bone. *Ceramics International* 41(10): 15010-15016.
- Narayan and Roger, 2009. *Biomedical materials*, Springer Science & Business Media:
- Oshida, Yoshiki, 2014. *Hydroxyapatite: Synthesis and Applications*, Momentum Press:
- Palanivelu, R, A Mary Saral and A Ruban Kumar, 2014. Nanocrystalline hydroxyapatite prepared under various pH conditions. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 131: 37-41.
- Pattanayak, Deepak K, Rajalaxmi Dash, RC Prasad, BT Rao and TR Rama Mohan, 2007. Synthesis and sintered properties evaluation of calcium phosphate ceramics. *Materials Science and Engineering: C* 27(4): 684-690.

- Phong, Hồ Quốc, Nguyễn Đình Duy, Huỳnh Liên Hương and Nguyễn Văn Đạt, 2019. Nghiên cứu sản xuất hydroxyapatite từ xương bò. Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Đà Nẵng 17(7): 19-24.
- Pon-On, Weeraphat, Panan Suntornsaratoon, Narattaphol Charoenphandhu, Jirawan Thongbunchoo, Nateetip Krishnamra and I Ming Tang, 2016. Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. Materials Science and Engineering:C 62: 183-189.
- Sadat-Shojai, Mehdi, Mohammad-Taghi Khorasani, Ehsan Dinpanah-Khoshdargi and Ahmad Jamshidi, 2013. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. Acta biomaterialia 9(8): 7591-7621.
- Sato, Kimiyasu, 2007. Mechanism of hydroxyapatite mineralization in biological systems (review). Journal of the Ceramic Society of Japan 115(1338): 124-130.
- Shavandi, Amin, Alaa El-Din A Bekhit, Azam Ali and Zhifa Sun, 2015. Synthesis of nano-hydroxyapatite (nHA) from waste mussel shells using a rapid microwave method. Materials Chemistry and Physics 149: 607-616.
- Sopyan, I, AR Toibah and AN Natasha, 1970. Nanosized bi°Ceramic hydroxyapatite powders via sol-gel method. International Journal of Mechanical and Materials Engineering 3(2): 133-138.
- Venkatesan, Jayachandran and Se Kwon Kim, 2010. Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (thunnus obesus) bone. 3(10): 4761.
- Vorokh, A. S., 2018. Scherrer formula: estimation of error in determining small nanoparticle size. Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics 9(3): 364-369.
- Zakharov, Na, IA Polunina, KE Polunin, NM Rakitina, El K°Chetkova, NP Sokolova and VT Kalinnikov, 2004. Calcium hydroxyapatite for medical applications. Inorganic Materials 40(6): 641-648.
- Zhang, Na, Dong Zhai, Lei Chen, Zhaoyong Zou, Kaili Lin and Jiang Chang, 2014. Hydrothermal synthesis and characterization of Si and Sr co-substituted hydroxyapatite nanowires using strontium containing calcium silicate as precursors. %J Materials Science Engineering 37: 286-291.