

DOI:10.22144/ctu.jvn.2021.109

NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT NANO-HYDROXYAPATITE TỪ XƯƠNG CÁ NGỪ (*Thunnus tonggol*) VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TƯƠNG THÍCH SINH HỌC

Nguyễn Trí¹, Nguyễn Thị Mai Phương², Nguyễn Thị Thùy Vân¹, Nguyễn Phụng Anh¹, Dương Huỳnh Thanh Linh¹, Nguyễn Thị Hồng Nơ¹, Phan Hồng Phương², Đoàn Văn Hồng Thiện³ và Huỳnh Kỳ Phương Hạ^{2*}

¹Viện Công nghệ Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Bách Khoa – Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

³Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Huỳnh Kỳ Phương Hạ (email: hkpha@hcmut.edu.vn)

ABSTRACT

In this paper, the effects of hydrothermal and calcination conditions on the structure of nano-hydroxyapatite synthesized from *Thunnus tonggol* bone were studied. The characteristics of samples were determined by various techniques such as X-ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), field emission scanning electron microscopy (FE-SEM), transmission electron microscopy (TEM), and optical X-ray fluorescence spectroscopy (XRF). XRD results showed that the hydrothermal and calcination conditions affect the crystallinity and purity of nano-hydroxyapatite product. The suitable conditions for the synthesis of nano-hydroxyapatite have been proposed such as hydrothermal at 120°C in 7 hours and calcination at 800°C in 1 hour. Under the conditions, the hydroxyapatite had the nanoparticle size in a range of 30–100 nm, and reached a BET surface area of 15.8 m²/g, a pore volume of 0.018 cm³/g, and a pore diameter of 23.0 Å. The molar ratio of Ca/P in the nano-hydroxyapatite was 1.67, which would be the expected ratio for hydroxyapatite. The nano-hydroxyapatite product has high crystallinity and biological compatibility when tested in Simulated Body Fluid (SBF).

TÓM TẮT

Trong bài báo này, ảnh hưởng của điều kiện thủy nhiệt và nung đến cấu trúc của nano-hydroxyapatite được tổng hợp từ xương cá ngừ bằng phương pháp thủy nhiệt đã được nghiên cứu. Các tính chất lý hóa của sản phẩm nano-hydroxyapatite được xác định bằng các phương pháp phân tích hiện đại như nhiễu xạ tia X (XRD), quang phổ hồng ngoại biến đổi Fourier (FTIR), hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM), hiển vi điện tử truyền qua (TEM) và quang phổ huỳnh quang tia X (XRF). Kết quả phổ XRD cho thấy điều kiện thủy nhiệt và nung ảnh hưởng đến độ kết tinh cũng như độ tinh khiết của hydroxyapatite. Các điều kiện thích hợp để tổng hợp nano-hydroxyapatite đã được xác định cụ thể thủy nhiệt ở 120°C trong 7 giờ và nung ở 800°C trong 1 giờ. Ở các điều kiện phù hợp, nano-hydroxyapatite thu được có kích thước hạt 30–100 nm và đạt diện tích bề mặt BET 15,8 m²/g, thể tích lỗ xốp 0,018 cm³/g, và đường kính lỗ xốp 23,0 Å. Tỷ lệ mole của Ca/P trong nano-hydroxyapatite được tổng hợp là 1,67 bằng tỉ lệ xác định theo lý thuyết trong hydroxyapatite. Sản phẩm nano-hydroxyapatite có độ kết tinh và tương thích sinh học cao khi thử nghiệm trong môi trường cơ thể người giả lập (SBF - Simulated Body Fluid).

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 26/02/2021

Ngày nhận bài sửa: 03/04/2021

Ngày duyệt đăng: 20/08/2021

Title:

Fabrication of nano-hydroxyapatite from *Thunnus tonggol* bone and its biocompatibility

Từ khóa:

Cá ngừ, nano-hydroxyapatite, tương thích sinh học, xương cá

Keywords:

Thunnus tonggol, nano-hydroxyapatite, biocompatibility, fish bone

1. GIỚI THIỆU

Hiện nay, nano-hydroxyapatite (HA) được ứng dụng rộng rãi trong nhiều lĩnh vực khác nhau như: làm chất độn (Nunes et al., 1997), sửa chữa xương và tái tạo mô xương (Heise et al., 1990) hoặc chất mang thuốc để chữa trị thoái hóa xương (Bagambisa et al., 1993) trong y sinh; làm xúc tác, vật liệu trao đổi ion, cảm biến, gốm sứ sinh học trong công nghiệp và trong xử lý môi trường (Favier et al., 2001). HA được trích xuất từ các vật liệu có nguồn gốc tự nhiên hoặc tổng hợp từ các hóa chất. So với các HA có nguồn gốc tự nhiên, HA tổng hợp từ các hóa chất thì phức tạp và không an toàn về mặt sinh học (không thể sử dụng làm vật liệu y sinh) (Panda et al., 2014). Do đó, các nhà nghiên cứu đã lựa chọn những nguồn tự nhiên để tổng hợp HA như xương cá (Chakraborty & RoyChowdhury, 2013), xương bò (Luna Zaragoza et al., 2009), răng và xương heo (Lü et al., 2007). Phân tích thành phần hóa học của những sản phẩm này đã chỉ ra rằng các sản phẩm từ những nguồn nguyên liệu trên là nguồn cung cấp calcium phong phú (Chakraborty & RoyChowdhury, 2013; Lü et al., 2007; Luna Zaragoza et al., 2009; Panda et al., 2014). Tổng hợp HA từ những nguồn phế thải này không chỉ đạt hiệu quả về kinh tế mà còn thân thiện với môi trường. Theo nhận định của Gumisiriza et al. (Gumisiriza et al., 2009), thành phần chất thải rắn (xương) chiếm 30 – 40% trong tổng lượng chất thải ra từ quá trình chế biến cá. Trong những năm gần đây, HA được tổng hợp từ xương và vảy cá nhằm thay thế cho HA tổng hợp vì các tính chất hóa học tương tự đạt được và phương pháp tổng hợp đơn giản, rẻ tiền. HA đã được chứng minh rằng nguồn nguyên liệu từ cá an toàn và dồi dào (Hoyer et al., 2012; Venkatesan et al., 2012). HA được tổng hợp có tỷ lệ Ca/P gần giống tỷ lệ Ca/P trong xương và răng của con người (chiếm đến 97% trong răng và 70% trong xương) nên nó được đánh giá có tính tương thích sinh học cao. HA với tỷ lệ cân đối calcium và phosphor được hấp thụ trực tiếp vào xương mà không cần chuyển hóa thêm, không cần dùng vitamin D để tăng cường hiệu suất hấp thụ calcium như các sản phẩm bổ sung calcium thông thường khác. Đến nay, nhiều loài cá đã được sử dụng để chế tạo HA, như cá hồi (Hoyer et al., 2012), cá chép, cá cơm nhật bản, cá ngừ (Chaves et al., 2012), cá thu, cá thằn lằn, cá chình và cá dẹt (Hamada et al., 1995), cá mè (Chaves et al., 2012; Hasan et al., 2020); cá lóc (Hariani et al., 2020),... Nhìn chung, các quá trình tổng hợp hydroxylapatite từ phụ phẩm xương cá hiện nay đều trải qua các công đoạn xử lý nguyên liệu ban đầu như nấu chín và nung nhằm tách hết thịt và mô còn

sót lại trên bề mặt và các chất hữu cơ có trong xương hoặc xử lý NaOH và H₂O₂, các công đoạn này làm tăng chi phí cho quá trình sản xuất HA, và đây là rào cản lớn cho việc ứng dụng triển khai vào thực tiễn. Gần đây, nghiên cứu thủy phân xương cá ngừ bằng enzyme ở nhiệt độ thấp (45°C) thu nhận sản phẩm có giá trị protein được thực hiện bởi nhóm chúng tôi (2020). Bã rắn thải ra từ quá trình thủy phân rất có tiềm năng cho việc tổng hợp HA. Nguyên liệu để tổng hợp HA là nguồn bã thải rắn giàu canxi này sẽ tạo tác động kép vừa tiết kiệm được chi phí năng lượng vừa tạo HA độ kết tinh và độ tinh sạch cao. Do vậy, trong nghiên cứu này, bã rắn thải ra từ quá trình thủy phân enzyme thu nhận protein sẽ được tiến hành nghiên cứu tổng hợp nano-hydroxyapatite bằng phương pháp thủy nhiệt và để đánh giá tiềm năng ứng dụng của trong thực tiễn, sản phẩm HA thu được bằng quy trình tốt nhất sẽ được xác định các tính chất lý hóa đặc trưng cũng như khả năng tương thích sinh học của nó.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Tổng hợp nano canxi hydroxyapatite

Nguyên liệu: Bã rắn của xương cá ngừ thu hồi từ quá trình thủy phân enzyme *alcalase* với nồng độ enzyme 2,3 %kl, thời gian thủy phân 7 giờ ở nhiệt độ 45°C. H₃PO₄ (Xilong, 85%), NH₄OH (Xilong, 25-28%), ethanol (Xilong, 95%) và nước cất.

Quy trình tổng hợp:

Xương cá ngừ sau quá trình thủy phân được rửa bằng nước 3 lần để loại bỏ các tạp chất còn sót lại. Sau đó, xương được sấy khô ở 60°C trong 24 giờ. Sau đó, đem xương khô nghiền mịn thành dạng bột đảm bảo kích thước hạt phải nhỏ hơn 0,25 mm. Cuối cùng, lấy mẫu đem phân tích XRF để xác định thành phần các nguyên tố của xương trước khi làm tiền chất tổng hợp HA.

Cân 1 g xương cá khô đã được nghiền mịn cho vào beaker 250 mL, thêm vào 50 mL nước cất rồi khuấy ở nhiệt độ phòng với tốc độ khuấy 300 vòng/phút trong thời gian 30 phút. Tiếp theo, thêm từ từ từng giọt dung dịch H₃PO₄ nồng độ 1% vào hỗn hợp, lượng thể tích dung dịch H₃PO₄ nồng độ 1% thêm vào tùy thuộc vào từng loại xương cá, đồng thời dùng NH₄OH pha loãng 5 % để duy trì pH = 10 trong suốt quá trình phản ứng. Lượng phospho bổ sung vào sao cho tỉ lệ mol Ca/P trong dung dịch phản ứng là 1,8. Dựa vào kết quả phân tích thành phần (XRF) các nguyên tố trong các loại xương ban đầu, lượng dung dịch H₃PO₄ nồng độ 1% bổ sung vào đối với quá trình tổng hợp HA là 14 mL. Trong giai đoạn phản ứng này, hỗn hợp vẫn được khuấy từ

giữ ở nhiệt độ phòng và thời gian phản ứng là 2 giờ tính từ khi nhỏ giọt H₃PO₄ cuối cùng. Kết thúc phản ứng đem hỗn hợp ủ nhiệt trong tủ để đảm bảo ổn định cấu trúc của sản phẩm HA. Nhiệt độ ủ (T_h) và thời gian ủ (t_h) được tiến hành khảo sát, từ đó chọn điều kiện ủ phù hợp thông qua kết quả đánh giá thành phần pha và kích thước tinh thể HA thu được.

Sau khi ủ nhiệt, gạn lấy phần rắn đem rửa bằng nước cất và ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút, thời gian mỗi lần ly tâm là 15 phút. Tiến hành rửa và ly tâm nhiều lần cho đến khi pH dung dịch sau lọc đạt giá trị 7 ± 0,2. Tiếp theo, rửa và ly tâm lần cuối cùng thực hiện với ethanol 95%. Sau ly tâm, mẫu rắn được đem sấy khô ở nhiệt độ 80°C trong thời gian 12 giờ. Mẫu sau sấy được đem nung để loại bỏ các thành phần hữu cơ còn liên kết chặt chẽ trong xương cá để thu nhận được sản phẩm HA. Nhiệt độ nung (T_c) và thời gian nung (t_c) được tiến hành khảo sát, từ đó chọn điều kiện nung phù hợp thông qua kết quả đánh giá thành phần pha và kích thước tinh thể HA thu được.

2.2. Phân tích các tính chất của HA

Trạng thái pha của mẫu sau khi tổng hợp được xác định thông qua nhiễu xạ tia X (XRD). XRD được xác định trên thiết bị XRD Bruker D8 Advance, bức xạ CuK_α. Mẫu đo được nghiền thành dạng bột mịn, tạo thành bề mặt phẳng có bề dày khoảng 100 Å, sau đó tiến hành đo ở nhiệt độ phòng. Từ kết quả XRD, kích thước trung bình của tinh thể hạt nano-hydroxyapatite được xác định theo công thức Scherrer (1) (Patterson, 1939):

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (1)$$

Trong đó, d đường kính trung bình của tinh thể (nm), K = 0,94; λ: là bước sóng của bức xạ tia X, λ = 0,1541 nm; và β là FWHM (độ rộng bán) của đỉnh XRD tại góc nhiễu xạ θ (radian). Các nguyên liệu xương cá và sản phẩm dạng bột được xác định thành phần các nguyên tố bằng phương pháp quang phổ huỳnh quang tia X trên thiết bị S2 PUMA – BRUCKER. Diện tích bề mặt riêng, thể tích lỗ xốp và phân bố đường kính lỗ xốp của các mẫu được xác định bằng phương pháp hấp phụ N₂ (BET) trên thiết bị BET NOVA 2200 E (số liệu được xử lý bằng phần mềm Quantan Chrome). Mẫu trước khi đo được xử lý trong dòng khí N₂ (99,999%) ở nhiệt độ 200°C trong thời gian 2 giờ. Hình thái bề mặt của các mẫu được đánh giá qua ảnh kính hiển vi điện tử quét (SEM) và ảnh kính hiển vi điện tử truyền qua độ phân giải cao (HR-TEM). Ảnh SEM được xác định

trên máy Hitachi S4800 và ảnh HRTEM được xác định trên thiết bị JEOL JEM 1400.

2.3. Đánh giá khả năng tương thích sinh học của HA

Các mẫu HA sau khi tổng hợp được đánh giá khả năng tương thích sinh học theo phương pháp của Kokubo et al. (Kokubo & Takadama, 2006). Các mẫu được ngâm trong dung dịch mô phỏng dịch thể người (SBF-Simulated Body Fluid, có thành phần các ion tương tự như máu trong cơ thể con người) và được đánh giá sự thay đổi các tính chất lý hóa theo thời gian ngâm.

Lấy các mẫu HA được tổng hợp trong điều kiện tốt nhất sau khi đã được phân tích thành phần, cấu trúc, hình thái và cấu trúc bề mặt, ngâm trong dung dịch SBF đã pha như trên. Tiến hành khảo sát với tỷ lệ ngâm 250 mg HA/500 mL dung dịch SBF trong thời gian ngâm lần lượt là 3 ngày, 7 ngày, 14 ngày và 21 ngày. Sau từng khoảng thời gian ngâm, mẫu bột vật liệu được tách ra và rửa với nước cất 3 lần để loại bỏ các ion dư thừa sau đó rửa lại với cồn nguyên chất để loại bỏ hoàn toàn các ion tự do. Mẫu được đem đi sấy khô ở 80°C trong 12 giờ và được đem đi phân tích xác định các tính chất lý hóa và so sánh với các tính chất các mẫu ban đầu.

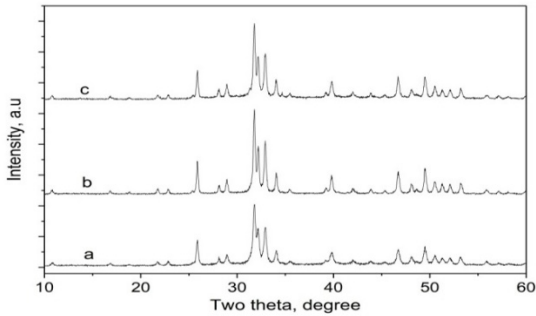
Các mẫu HA sau khi ngâm trong môi trường SBF được đem đi phân tích lại các tính chất lý hóa và so sánh với mẫu trước thử nghiệm với mục đích đánh giá khả năng tương thích sinh học của vật liệu HA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tổng hợp HA

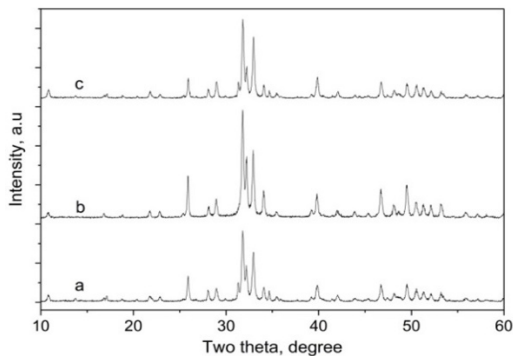
Nhiều xạ tia X của các mẫu HA được tổng hợp ở các thời gian thủy nhiệt khác nhau được thể hiện trên Hình 1. So sánh với nhiễu xạ tia X của HA chuẩn (JCPDS 09-0432), cả 3 mẫu được ủ trong khoảng thời gian từ 6, 7 và 8 giờ đều thể hiện được gần như toàn bộ các đỉnh đặc trưng của HA, đặc biệt là đỉnh có cường độ cao nhất tại 2θ = 31,4°. Tuy nhiên, mẫu tổng hợp với thời gian thủy nhiệt 6 giờ có các đỉnh thể hiện độ sắc nét và tách ra không rõ so với 2 mẫu tổng hợp ở thời gian 7 giờ và 8 giờ, có thể ở thời gian 6 giờ mẫu có độ kết tinh chưa cao. Mặt khác, mẫu tổng hợp với thời gian 8 giờ có sự xuất hiện của đỉnh lạ tại 2θ = 34,6° đặc trưng cho thành phần pha β-TCP (JCDPS 09-0169). Trong khi đó, mẫu ủ trong 7 giờ chỉ thể hiện các đỉnh của HA, không có sự tồn tại của pha khác. Kết hợp với kích thước tinh thể trung bình của các mẫu HA thu được khi thời gian thủy nhiệt 6, 7 và 8 giờ lần lượt

31,5, 37,4 và 37,6 nm, chọn thời gian ủ nhiệt phù hợp để tổng hợp HA là 7 giờ.



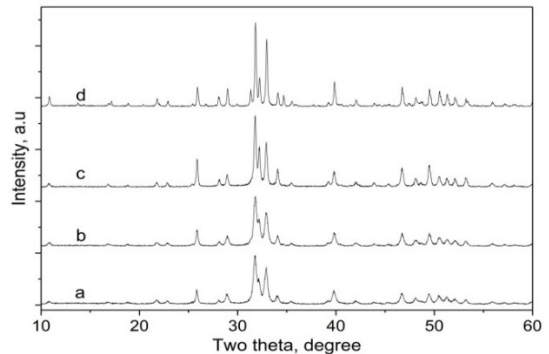
Hình 1. Nhiễu xạ tia X của các mẫu HA được tổng hợp với thời gian ủ (t_h) khác nhau (T_h = 120°C, T_c = 800°C và t_c = 1 giờ); a) t_h = 6 giờ; b) t_h = 7 giờ; c) t_h = 8 giờ

Nhiễu xạ tia X của các mẫu HA được tổng hợp ở nhiệt độ thủy nhiệt khác nhau trong cùng một thời gian thủy nhiệt 7 giờ được thể hiện trên Hình 2. So với nhiễu xạ tia X của HA chuẩn (JCPDS 09-0432), phổ thu được của cả 3 mẫu đều thể hiện được hết các đỉnh đặc trưng của HA trong khoảng 2θ = 20° – 60° và đỉnh có cường độ cao nhất tại 2θ = 31,4°. Mẫu thủy nhiệt ở 120°C chỉ thể hiện các đỉnh của HA trong khi mẫu ủ ở 100°C và 140°C có sự tồn tại rõ rệt một số đỉnh lạ tại 2θ = 31,1° và 2θ = 34,4° với cường độ yếu, chứng tỏ sự hiện diện của lượng rất nhỏ β-TCP (JCDPS 09-0169). Mặt khác, khi thay đổi nhiệt độ thủy nhiệt, kích thước tinh thể gần như không thay đổi (37,4–37,8 nm). Điều này chứng tỏ kích thước tinh thể HA thu được ít phụ thuộc vào nhiệt độ thủy nhiệt. Vậy, điều kiện ủ nhiệt phù hợp là 120°C trong 7 giờ sẽ cho ra sản phẩm HA đơn pha và độ tinh khiết cao. Điều kiện này được sử dụng để tiến hành các khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nung đến quá trình tổng hợp HA.



Hình 2. Nhiễu xạ tia X của các mẫu HA được tổng hợp ở nhiệt độ ủ (T_h) khác nhau (t_h = 7 giờ, T_c = 800°C và t_c = 1 giờ); a) T_h = 100°C; b) T_h = 120°C; c) T_h = 140°C

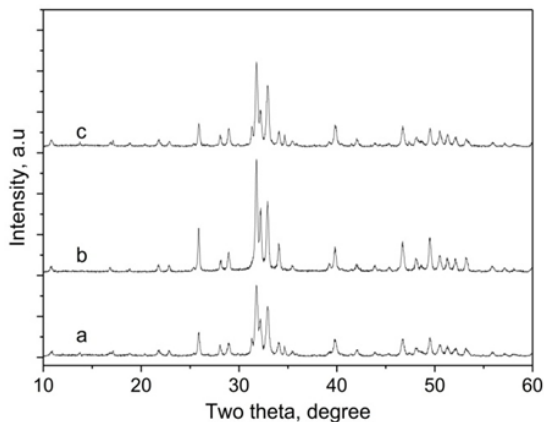
Nhiều xạ tia X của các mẫu HA nung ở nhiệt độ khác nhau trong cùng thời gian nung 1 giờ (Hình 3) cho thấy so với 2 mẫu nung ở nhiệt độ 800 và 850°C, hai mẫu nung ở nhiệt độ 700 và 750°C các đỉnh đặc trưng cho thành phần pha HA xuất hiện chưa sắc nét và tách rõ ràng ở vùng 2θ = 30 – 35°, có thể do nung ở 2 nhiệt độ này chưa loại được hết các chất có trên bề mặt HA. Điều này chứng tỏ độ tinh khiết của sẽ HA tăng khi tăng nhiệt độ nung. Ngoài ra, quá trình nung còn làm tăng độ kết tinh tinh thể HA (Juang & Hon, 1996). Trong khi mẫu nung ở nhiệt độ 850°C các đỉnh xuất hiện rõ, tách rõ ràng nhưng lại xuất hiện các đỉnh có cường độ yếu tại 2θ = 31,1° và 2θ = 34,4°, các đỉnh thể hiện sự có mặt của một lượng nhỏ β-TCP (JCDPS 09-0169). Mẫu nung 800°C thể hiện các đỉnh đặc trưng rõ ràng trùng với phổ HA chuẩn và tách tốt, đồng thời không xuất hiện các đỉnh lạ, điều này chứng tỏ mẫu HA kết tinh tốt, đơn pha và có độ độ tinh khiết cao. Kích thước trung bình tinh thể của HA của các mẫu nung ở nhiệt độ 700, 750, 800 và 850°C lần lượt là 32,1, 32,6, 37,4 và 52,2 nm. Từ những kết quả trên, chọn nhiệt độ nung phù hợp là 800°C.



Hình 3. Nhiễu xạ tia X của các mẫu HA tổng hợp ở điều kiện ủ nhiệt phù hợp được nung ở nhiệt độ khác nhau (T_h = 120°C, t_h = 7 giờ, t_c = 1 giờ); a) T_c = 700°C; b) T_c = 750°C; c) T_c = 800°C; d) T_c = 850°C

Nhiều xạ tia X của các mẫu HA nung ở nhiệt độ 800°C trong các khoảng thời gian khác nhau (Hình 4) cho thấy so với mẫu nung 1 giờ, hai mẫu nung 0,5 và 1,5 giờ bên cạnh xuất hiện các đỉnh đặc trưng cho thành phần pha HA, nhiễu xạ tia X của 2 mẫu này còn xuất hiện các đỉnh đặc trưng cho pha tạp β-TCP tại 2θ = 31,1° và 2θ = 34,4° (JCDPS 09-0169) nhưng với cường độ yếu. Xét kích thước tinh thể trung bình cho thấy thời gian nung càng dài thì kích thước tinh thể HA càng tăng nhưng tăng cũng không nhiều kích thước tinh thể các mẫu đều đạt <50 nm, cụ thể các mẫu HA nung trong khoảng thời gian 0,5,

4,0 và 1,5 giờ lần lượt là 35,6, 37,4 và 41,5 nm. Dựa vào tiêu chí chọn mẫu HA sau tổng hợp là đơn pha, thời gian nung phù hợp được lựa chọn là 1 giờ. Từ kết quả khảo sát ảnh hưởng các yếu tố của quá trình quá trình thủy nhiệt và nung đến thành phần pha cũng như kích thước tinh thể của sản phẩm HA, quy trình tổng hợp HA từ xương cá ngừ phù hợp nhất đã được đề xuất với các thông số như sau: nhiệt độ thủy nhiệt: 120°C; thời gian thủy nhiệt: 7 giờ; nhiệt độ nung: 800°C; thời gian nung: 1 giờ.



Hình 4. Nhiễu xạ tia X của các mẫu HA tổng hợp được khi nung với thời gian nung khác nhau ($T_h = 120^\circ\text{C}$, $t_h = 7$ giờ, $T_c = 800^\circ\text{C}$): a) $t_c = 0,5$ giờ; b) $t_c = 1$ giờ; c) $t_c = 1,5$ giờ

3.2. Các tính chất lý hóa của HA

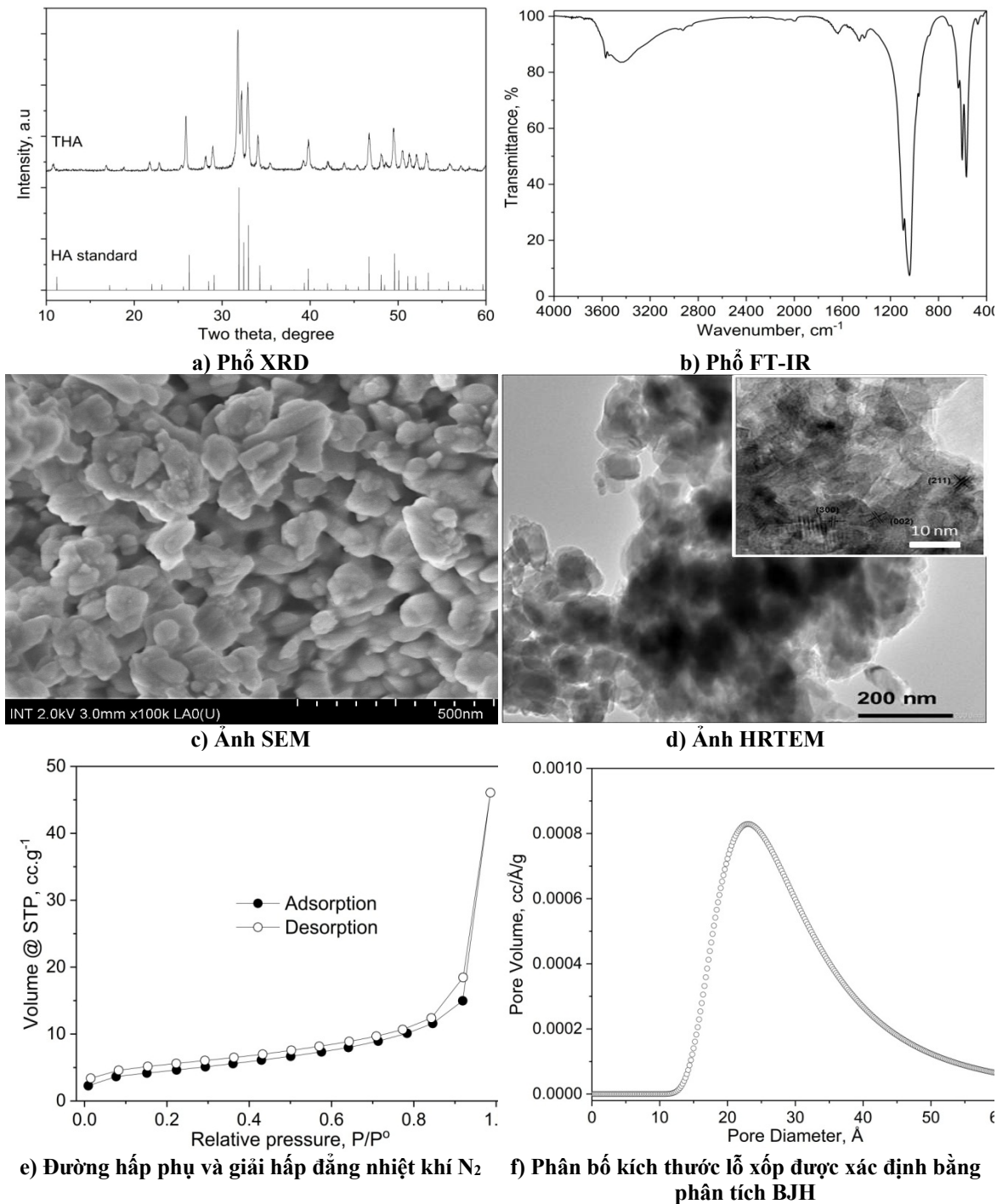
Thành phần một số nguyên tố trong xương cá ngừ thô và sản phẩm HA được tổng hợp trong điều kiện tốt nhất được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1. Thành phần nguyên tố có trong xương cá ngừ thô và sản phẩm HA thu được

Nguyên tố	Xương thô (%)	HA (%)
Ca	70,7	65,3
P	23,7	30,0
Mg	2,1	1,9
Sb	0,1	KPH
Cd	0,1	KPH
Sr	0,5	0,3
Si	0,8	KPH
S	0,4	KPH
Na	1,1	2,3
Zn	0,2	0,2
K	0,2	KPH
Sn	0,1	KPH
Tỷ lệ mol Ca/P	2,29	1,67

Dựa vào Bảng 1, có thể xác định tỷ lệ mol Ca/P trong sản phẩm HA thu được là 1,67 đúng bằng tỷ lệ Ca/P trong xương và răng của con người. Ngoài ra, thành phần HA tổng hợp từ xương cá ngừ còn chứa lượng nhỏ các nguyên tố như Mg, Na, Zn, Sr,... có vai trò rất quan trọng trong các quá trình chuyển hóa và tái tạo tế bào. Mặt khác, Sr liên quan đến việc giảm tái hấp thu xương và tăng sự hình thành xương có tác dụng ngăn ngừa nguy cơ gãy xương (Boutinguiza et al., 2012).

Nhiều xạ tia X của mẫu HA tổng hợp từ xương cá ngừ theo quy trình tốt nhất so với với phổ chuẩn HA (JCPDS 09-0432) ở Hình 5a cho thấy phổ XRD của mẫu HA thể hiện các đỉnh đặc trưng của HA và không tồn tại đỉnh nào của pha khác. Điều này chứng tỏ HA đơn pha và tinh khiết. Kích thước tinh thể trung bình xác định được là 37,4 nm, đạt xấp xỉ kích thước HA thu được từ xương cá lóc (Hariani et al., 2020) và nhỏ hơn nhiều so với HA được điều chế từ xương cá và vỏ trai bằng phương pháp vi sóng (Irfan et al., 2021). Phổ FT-IR của mẫu HA (Hình 5b) cũng thể hiện các dao động đặc trưng của nhóm PO_4^{3-} tại các bước sóng 1092 cm^{-1} ; 1045 cm^{-1} ; $602,3\text{ cm}^{-1}$ và $569,5\text{ cm}^{-1}$; nhóm OH^- tại $3571,4\text{ cm}^{-1}$; $3446,4\text{ cm}^{-1}$ và $632,5\text{ cm}^{-1}$; và nhóm CO_3^{2-} tại 2001 cm^{-1} (cường độ rất thấp do có sự hấp thụ CO_2 từ không khí trong suốt quá trình tổng hợp). Ngoài ra, phổ FT-IR của mẫu HA có xuất hiện đỉnh tại 1641 cm^{-1} đặc trưng cho nước hấp phụ trên bề mặt. Sự có mặt đầy đủ của các nhóm chức cũng như không xuất hiện các nhóm chức lạ khác và cùng kết hợp với phổ XRD có thể kết luận HA đơn pha và có độ tinh sạch cao (Fathi et al., 2008). Quan sát hình ảnh SEM (Hình 5c) cho thấy mẫu HA tồn tại các hạt có kích thước khá đồng đều kết nối đan xen nhau tạo ra những khe hở, độ xốp cho vật liệu và có thể nhận ra kích thước hạt của mẫu HA được tổng hợp ở điều kiện tốt nhất trong khoảng 30 – 100 nm. Ảnh HRTEM của mẫu HA (Hình 5d) cũng cho thấy các hạt kết nối với nhau thành cụm. Mẫu HA xuất hiện ba mặt tinh thể đặc trưng (211), (002) và (300) với dspacing tương ứng là 0,38; 0,26; và 0,20 nm. Phân tích BET mẫu HA tổng hợp từ xương cá ngừ trong điều kiện tốt nhất (Hình 5e và f) cho kết quả diện tích bề mặt riêng là $15,8\text{ m}^2/\text{g}$, đường kính lỗ xốp là $23,0\text{ \AA}$ và thể tích lỗ xốp là $0,018\text{ cm}^3/\text{g}$. Đường hấp phụ - giải hấp đẳng nhiệt N_2 cho thấy mẫu HA tổng hợp được thuộc loại vật liệu loại II, đặc trưng cho vật liệu có cấu trúc không xốp (Miyachi et al., 2019).

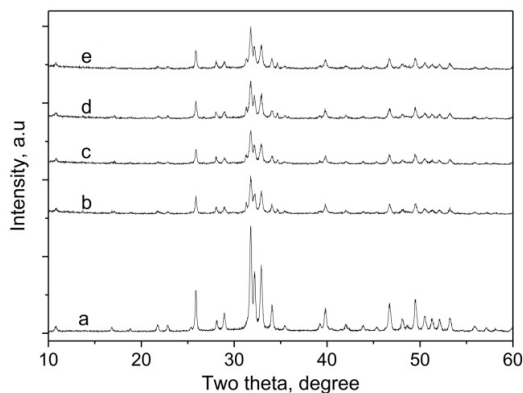


Hình 5. Các tính chất đặc trưng của HA từ xương cá ngừ

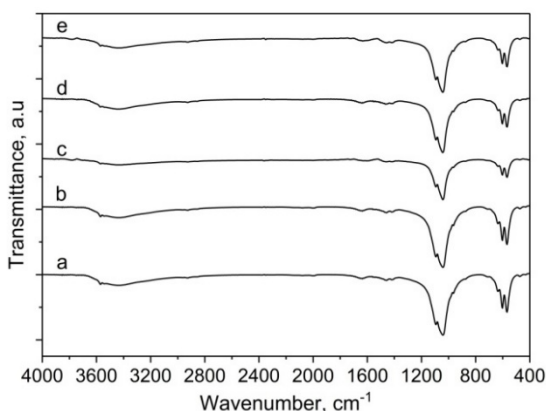
3.3. Khả năng tương thích sinh học của mẫu HA

Kết quả đánh giá khả năng tương thích sinh học của mẫu HA thông qua việc đánh giá sự thay đổi các

tính chất thành phần pha, các nhóm chức bề mặt, hình thái bề mặt và các đặc điểm như diện tích bề mặt riêng, đường kính và thể tích lỗ xốp được trình bày ở Hình 6-8 và Bảng 2.



Hình 6. Nhiễu xạ tia X của mẫu HA ban đầu (a) và các mẫu HA ngâm trong dung dịch SBF 3 ngày (b), 7 ngày (c); 14 ngày (d) và 21 ngày (e)



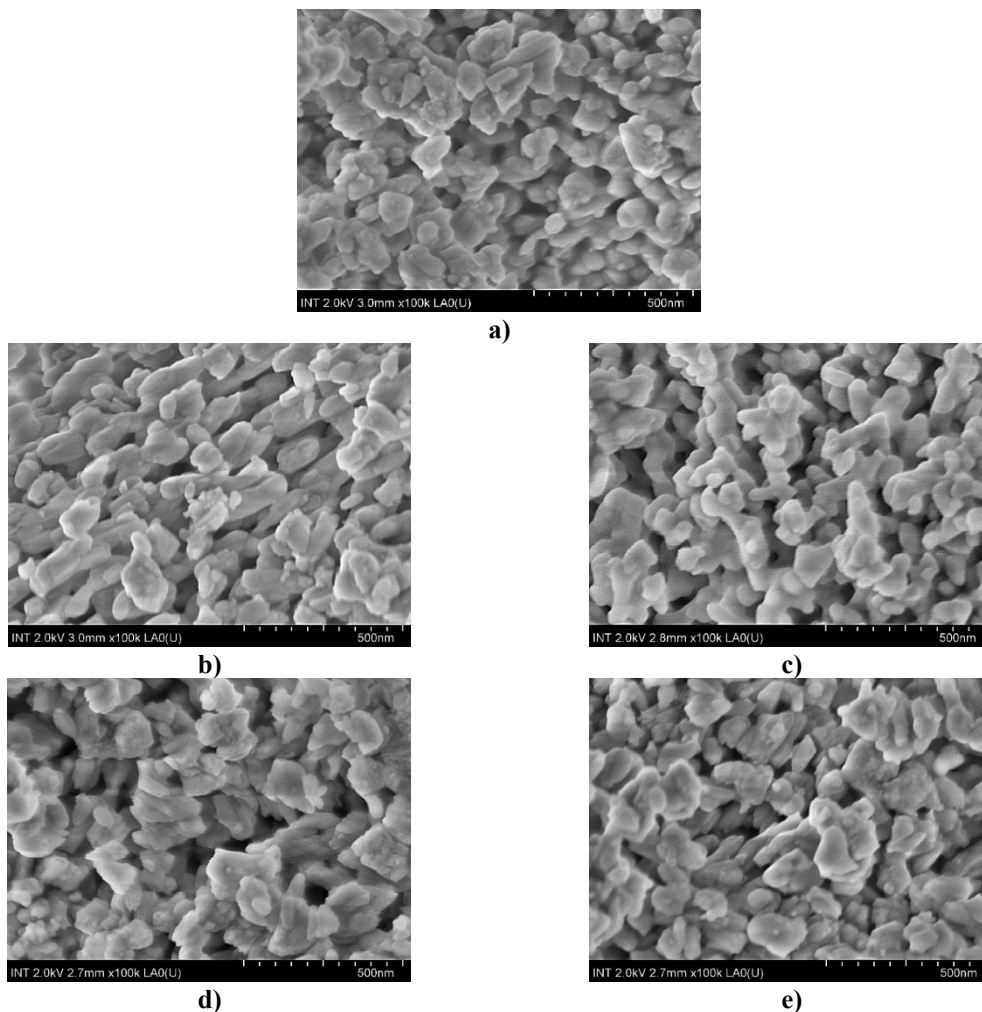
Hình 7. Phổ FT-IR của mẫu HA ban đầu (a) và các mẫu HA ngâm trong dung dịch SBF 3 ngày (b), 7 ngày (c); 14 ngày (d) và 21 ngày (e)

Các kết quả thu được cho thấy theo thời gian ngâm, nhiễu xạ tia X và phổ FT-IR vẫn còn thể hiện sự hiện diện đầy đủ các đỉnh đặc trưng của HA. Bề mặt các vật liệu sau ngâm nhìn chung đã điền đầy vật liệu HA mới (thể hiện ở các ảnh SEM) chính điều này dẫn các lỗ xốp giảm (đường kính lỗ xốp và thể tích lỗ xốp giảm, thể hiện ở kết quả BET). Tuy đặc điểm diện tích bề mặt, thể tích và đường kính lỗ xốp thay đổi nhưng kích thước hạt của các mẫu thay đổi không đáng kể. Trong quá trình hình thành lớp

khoáng HA mới trong môi trường H⁺, một số hợp chất calcium phosphate khác cũng có thể được hình thành. Cụ thể là khi quan sát trên các phổ XRD của các mẫu sâu ngâm, thấy có tồn tại của một đỉnh lạ tại 2θ = 31,1°, chứng tỏ có sự hình thành β-TCP (JCDPS 09-0169). Như đã đề cập ở trên, β-TCP cũng là một dạng hợp chất bổ sung canxi, không làm ảnh hưởng đến khả năng tương thích sinh học của HA. Từ những kết quả này cho thấy mẫu HA cũng có tính tương thích sinh học cao.

Bảng 2. Sự thay đổi diện tích bề mặt riêng (S_{BET}), đường kính lỗ (d_{pore}) và thể tích lỗ xốp (V_{pore}) của các mẫu HA ban đầu và sau khi ngâm 3, 7, 14 và 21 ngày trong dung dịch SBF

Mẫu	S _{BET} , m ² /g	d _{pore} , Å	V _{pore} , cm ³ /g
HA ban đầu	15,8	23,0	0,018
HA sau ngâm SBF	3 ngày	16,2	0,017
	7 ngày	18,7	0,012
	14 ngày	23,5	0,015
	21 ngày	24,5	0,016



Hình 8. Ảnh SEM của vật liệu HA trước (a) và sau khi ngâm trong dung dịch SBF 3 ngày (b), 7 ngày (c), 14 ngày (d) và 21 ngày (e)

4. KẾT LUẬN

HA được tổng hợp thành công từ chất thải xương cá ngừ bằng phương pháp phương pháp thủy nhiệt đơn giản, dễ thực hiện. Mối tương quan chặt chẽ giữa điều kiện thủy nhiệt, điều kiện nung và thành phần pha và kích thước tinh thể HA đã làm sáng tỏ. Từ đó, điều kiện thủy nhiệt và điều kiện nung đã được xác định: điều kiện thủy nhiệt 120°C trong 7 giờ và điều kiện nung ở 800°C trong 1 giờ. Sản phẩm HA thu được có kích thước trung bình <40 nm với độ tinh khiết, độ kết tinh và có khả năng tương thích sinh học cao. Kết quả đạt được ở nghiên cứu này đã đề xuất một giải pháp hữu ích để tổng hợp hydroxyapatite có nguồn gốc từ xương cá không qua bước tiền xử lý nung nguyên liệu thô ban đầu, thông qua kết hợp với công đoạn thủy phân enzyme tạo ra

hai dòng sản phẩm (nano-hydroxyapatite và protein) có giá trị cao từ phụ phẩm xương cá.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được thực hiện bằng nguồn kinh phí hỗ trợ từ Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ TP.HCM, Sở Khoa học và Công nghệ TP.HCM, theo hợp đồng số 78/2019/HĐ-QPTKHCN.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bagambisa, F. B., Joos, U., & Schilli, W., (1993). Mechanisms and structure of the bond between bone and hydroxyapatite ceramics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 27(8), 1047-1055
- Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., De Carlos, A., & León, B., (2012). Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, 32(3), 478-486

- Chakraborty, R. & Roy Chowdhury, D., (2013). Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. *Chemical Engineering Journal*, 215, 491-499
- Chaves, M. D., de Souza Nunes, L. S., de Oliveira, R. V., Holgado, L. A., Nary Filho, H., Matsumoto, M. A., & Ribeiro, D. A., (2012). Bovine hydroxyapatite (Bio-Oss®) induces osteocalcin, RANK-L and osteoprotegerin expression in sinus lift of rabbits. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 40(8), 315-320
- Fathi, M., Hanifi, A., & Mortazavi, V., (2008). Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder. *Journal of Materials Processing Technology*, 202(1-3), 536-542
- Favier, F., Walter, E. C., Zach, M. P., Benter, T., & Penner, R. M., (2001). Hydrogen sensors and switches from electrodeposited palladium mesowire arrays. *Science*, 293(5538), 2227-2231
- Gumisiriza, R., Mshandete, A. M., Rubindamayugi, M. S., Kansime, F., & Kivaisi, A. K., (2009). Nile perch fish processing waste along Lake Victoria in East Africa: Auditing and characterization. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 3(1), 013-020
- Hamada, M., Nagai, T., Kai, N., Tanoue, Y., Mae, H., Hashimoto, M., Miyoshi, K., Kumagai, H., & Saeki, K., (1995). Inorganic constituents of bone of fish. *Fisheries Science*, 61(3), 517-520
- Hariani, P. L., Muryati, M., Said, M., & Salni, S., (2020). Synthesis of nano-hydroxyapatite from snakehead (*Channa striata*) fish bone and its antibacterial properties. *Key Engineering Materials*, 840, 293-299
- Hasan, M. R., Yasin, N. S. M., & Mohd, M. S., (2020). Proximate and morphological characteristics of nano hydroxyapatite (nano HAP) extracted from fish bone. *Journal of Sustainability Science and Management*, 15(8), 9-21
- Heise, U., Osborn, J., & Duwe, F., (1990). Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *International Orthopaedics*, 14(3), 329-338
- Hoyer, B., Bernhardt, A., Heinemann, S., Stachel, I., Meyer, M., & Gelinsky, M., (2012). Biomimetically mineralized salmon collagen scaffolds for application in bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 13(4), 1059-1066
- Irfan, M., Suprajaa, P., Praveen, R., & Reddy, B., (2021). Microwave-assisted one-step synthesis of nanohydroxyapatite from fish bones and mussel shells. *Materials Letters*, 282, 128685
- Juang, H. Y. & Hon, M. H., (1996). Effect of calcination on sintering of hydroxyapatite. *Biomaterials*, 17(21), 2059-2064
- Kokubo, T. & Takadama, H., (2006). How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27(15), 2907-2915
- Lü, X. Y., Fan, Y. B., Gu, D., & Cui, W., (2007). Preparation and characterization of natural hydroxyapatite from animal hard tissues. *Key Engineering Materials*, 342, 213-216
- Luna Zaragoza, D., Romero Guzmán, E. T., & Reyes Gutiérrez, L. R., (2009). Surface and physicochemical characterization of phosphates vivianite, $\text{Fe}_2(\text{PO}_4)_3$ and hydroxyapatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. *Journal of Minerals and Materials Characterization and Engineering*, 8(8), 591-609
- Miyauchi, M., Watanabe, T., Hoshi, D., & Ohba, T., (2019). Irreversible adsorption of acidic, basic, and water gas molecules on calcium-deficient hydroxyapatite. *Dalton Transactions*, 48(47), 17507-17515
- Nunes, C., Simske, S., Sachdeva, R., & Wolford, L., (1997). Long-term ingrowth and apposition of porous hydroxylapatite implants. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials*, 36(4), 560-563
- Panda, N. N., Pramanik, K., & Sukla, L. B., (2014). Extraction and characterization of biocompatible hydroxyapatite from fresh water fish scales for tissue engineering scaffold. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(3), 433-440
- Patterson, A., (1939). The Scherrer formula for X-ray particle size determination. *Physical Review*, 56(10), 978
- Venkatesan, J., Pallela, R., Bhatnagar, I., & Kim, S. K., (2012). Chitosan-amylopectin/hydroxyapatite and chitosan-chondroitin sulphate/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51(5), 1033-1042