# NGHIÊN CỨU SẢN XUẤT HYDROXYAPATITE TỪ XƯƠNG BÒ STUDY ON PRODUCTION OF HYDROXYAPATITE FROM BOVINE BONE

Hồ Quốc Phong<sup>1\*</sup>, Nguyễn Đình Duy<sup>2</sup>, Huỳnh Liên Hương<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Đạt<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Cần Thơ; hqphong@ctu.edu.vn <sup>2</sup>Sinh viên K39, Ngành Công nghệ Kỹ thuật Hóa học, Trường Đại học Cần Thơ

Tóm tắt - Nghiên cứu này được tiến hành nhằm sản xuất hydroxyapatite (HA) từ nguồn phụ phẩm xương bò. Sau khi tiền xử lý trong dung dịch NaOH loãng, xương bò được cắt nhỏ và nung ở nhiệt độ cao trong 6 giờ nhằm loại bỏ các thành phần hữu cơ. Mẫu sau đó được tiến hành nghiền bằng máy nghiền bỉ để tạo thành bột xương bò (BXB) nguyên liệu. BXB sau đó được phản ứng với dung dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> để chuyến hóa thành HA. Các yếu tố quan trọng ảnh hưởng đế sự hình thành HA như nồng độ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, nhiệt độ phản ứng, pH dung dịch, thời gian nung và nhiệt độ nung HA được thực hiện. Kết quả thí nghiệm cho thấy, có thể sản xuất HA dạng hình cầu bất đối xứng với kích thước tinh thể dưới 100 nm, độ tinh thể 98,3% khi phản ứng chuyển hóa BXB được thực hiện ở điều kiện H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,035 M, nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và nung ở 900°C trong thời gian 4 giờ.

**Từ khóa -** Xương bò; hydroxyapatite; vật liệu tương hợp sinh học; vật liệu y sinh; kỹ thuật tế bào

#### 1. Đặt vấn đề

Hydroxyapatite (HA) là một trong bốn dạng của apatite (họ khoáng phosphate của canxi, có công thức chung là  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ . Trong cơ thể của cả người và động vật, HA là thành phần chính của xương (chiếm 65–70% khối lượng) và răng (chiếm 99%) [1], vì thế HA có tính tương thích sinh học và độ ổn định tốt nhất trong môi trường sinh lý cơ thể người [2]. Thông thường, HA tồn tại ở hai dạng cấu trúc tinh thể là lục phương và đơn tà, chúng có tính ổn định nhiệt rất cao. Là dạng canxi dễ hấp thụ nhất với cơ thể người, có tính tương thích cao với các tế bào và mô [3], có khả năng dẫn tạo xương, tạo liên kết trực tiếp với xương non dẫn tới việc tái sinh xương nhanh mà không gây dị ứng, viêm nhiễm và không bị cơ thể đào thải [4].

HA được quan tâm sử dụng chế tạo các sản phẩm khác nhau như lớp phủ men răng, lớp phủ bề mặt cho xương nhân tạo và các chi tiết ghép nối xương [5]. Ở dạng khối xốp, HA dùng trong kỹ thuật mô xương nhân tạo, dùng làm răng giả, mắt giả, dùng điền đầy các hốc răng, ổ răng bị sâu và các vết rạn nứt ở xương tự nhiên [6]. HA dạng bột, với kích thước 20-100 nm dùng để dẫn truyền thuộc, làm thực phẩm bổ sung canxi, điều trị bệnh loãng xương [7]. Một số nghiên cứu kết luận rằng, vật liệu HA ở kích thước nano có tính tái hấp thu và tương thích sinh học cao hơn nhiều so với vật liệu có kích thước micro [8]. Ở dạng composite, các nhà khoa học đã phân tán HA vào các polymer sinh học để mượn khả năng liên kết của polymer với các tế bào sinh học, vì thể nâng cao tính tương thích và hấp thụ vào cơ thể [9]. Ngoài lĩnh vực y sinh và được học, HA còn có nhiều ứng dụng nổi trội ở những lĩnh vực khác như trong phương pháp sắc ký cột để tách phân đoạn các protein và axit nucleic [10], dùng cho quá trình xử lý nước, hấp phụ kim loại nặng trong đất [11].

HA được tổng hợp bằng nhiều phương pháp, có thể phân loại thành năm nhóm như: (i) phương pháp khô có

**Abstract** - This study is conducted to produce hydroxyapatite (HA) from bovine bone. After pretreatment in dilute NaOH solution, the bovine bone is calcined at 900°C in 6 hours to burn all organic compounds. The sample is then grinded by ball mill machine to obtain powder of bovine bone. The powder is used to react with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> solution to produce HA. Some important factors affecting HA formation such as concentration of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, reaction temperature, pH value, calcinating time and temperature are investigated. Experimental results show that HA particles with crystal size less than 100 nm, 98.3% of crystallinity could be produced when reaction is carried out in the condition of H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.035 M, reaction temperature 90°C, pH 11 and calcinating at 900°C in 4 hours.

**Key words -** Bovine bone; hydroxyapatite; biocompatible materials; biomedical materials; tissue engineering

phản ứng pha rắn và hóa cơ; (ii) phương pháp ướt bao gồm kết tủa, sol-gel, nhũ tương, siêu âm và thủy nhiệt; (iii) quá trình nhiệt đô cao bao gồm nhiệt phân và thiệu kết; (iv) tổng hợp từ các nguồn gen sinh học và (v) kết hợp nhiều phương pháp lại với nhau [12]. Việc kết hợp những phương pháp lại với nhau nhằm mục đích mượn ưu điểm của từng phương pháp, cho ra sản phẩm mang đặc tính tối ưu. HA có thể được tổng hợp từ các tiền chất tinh khiết như CaO, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. Tuy nhiên, chúng không đạt được các đặc tính sinh học như xương tự nhiên, chính vì thể hiện nay HA tổng hợp từ nguyên liệu có nguồn gốc tự nhiên vỏ sò hay xương động vật rất được quan tâm [13-16]. Ở Việt Nam, hàng năm lượng xương bò thải ra trong quá trình chế biến thực phẩm là rất lớn. Chúng thường được sử dụng để chế biến thức ăn gia súc và giá trị kinh tế thường khá thấp. Vì vậy, nghiên cứu này sẽ tiến hành chuyển hóa xương bò phế phẩm thành HA, sử dụng phương pháp nhiệt kết hợp với phương pháp kết tủa.

#### 2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Xương ống của bò khoảng 2-3 năm tuổi được thu mua từ lò giết mổ bò với số lượng đủ để sử dụng cho nghiên cứu. Các hóa chất như NaOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> và NH<sub>3</sub> được cung cấp bởi Công ty Merck được sử dụng trong tiền xử lý và tổng hợp HA từ bột xương bò.

#### 2.2. Tiến hành thí nghiệm

HA được tổng hợp từ nguyên liệu xương bò theo qui trình được tiến hành qua ba bước chính: (i) tiền xử lí nguyên liệu, (ii) tạo bột xương bò và (iii) chuyển hóa bột xương bò thành HA. Xương bò được thu mua từ lò giết mổ sẽ được rửa sơ bộ bằng nước để tách một số thành phần tạp chất bám trên xương và tiếp tục hầm thêm từ 24 giờ ở nhiệt độ khoảng 100°C nhằm để loại bỏ triệt để những hợp chất hữu cơ thịt, gân, các mô tủy bên trong xương. Xương sau đó tiến hành cắt khúc với kích thước tương đối 3-5 cm và xử lý với NaOH 0,1 M trong 48 giờ và được rửa sạch lại với nước cất và ethanol, sấy khô ở 100°C. Mẫu xương sau xử lý sẽ được tiến hành nung theo các nhiệt độ khảo sát khác nhau thay đổi từ 700, 900 và 1100°C trong 6 giờ sử dụng lò nung (Nabertherm, LHT 1750°C), nhằm làm sạch các tạp chất hữu cơ có trong xương.

Xương bò sau khi nung được nghiền thành bột với kích thước khoảng 5-10  $\mu$ m bằng máy nghiền bi siêu tốc. 10 gam bột xương bò (BXB) được phân tán đều vào 100 mL nước cất, tạo thành hệ huyền phù với tốc độ khuấy 500 v/phút sau đó được phản ứng với dung dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> theo nồng độ khác nhau. Sau đó, hỗn hợp được đưa về nhiệt độ phòng và ổn định pH bằng dung dịch amoniac trong 2 giờ. Kết thúc phản ứng, hỗn hợp được làm ổn định qua đêm, lọc thu mẫu, sấy khô ở 100°C và tiếp tục nung ở các nhiệt độ cao nhằm ổn định cấu trúc, thu sản phẩm bột HA.

Các yếu tố được tiến hành khảo sát dựa trên phương pháp luân phiên từng biến, mỗi yếu tố sẽ được khảo sát bốn giá trị khác nhau và được lặp lại ba lần, lấy giá trị trung bình. Sản phẩm thu được tiến hành phân tích nhiễu xạ tia X (XRD) xác định thành phần pha và kính hiển vi điện tử quét (SEM) xác định hình dạng cấu trúc hạt. Trên cơ sở kết quả phân tích XRD và SEM chọn ra được giá trị tối ưu ở mỗi yếu tố.

#### 2.3. Phương pháp phân tích đánh giá

#### 2.3.1. Phương pháp quang phổ huỳnh quang (XRF)

Hàm lượng thành phần nguyên tố có trong mẫu được kiểm tra phân tích định tính, định lượng bằng máy phân tích tán xạ huỳnh quang tia X (XRF – 310) của hãng PG Intruments (VQ Anh), sai số  $\leq$  3%, độ phân giải đầu dò 149 Ev, hệ thống xử lí số liệu bằng phần mềm XRF 310, thời gian đo 60 ~ 300 s, nguồn năng lượng phát ra 50 W, sử dụng nguồn điện cao áp cao nhất 50kV/1mA.

### 2.3.2. 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  $2\theta$  WL = 1,54060 quét từ  $10 - 70^{\circ}$ , 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 [17].

# 2.3.3. Phương pháp quét kính hiển vi điện tử quét

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 x800.000, 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.

#### 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Tiền xử lý

Nhằm loại bỏ các tạp chất, xương bò được tiến hành nung ở các nhiệt độ khác nhau. Sau khi nung mẫu được quan sát và ghi nhận bằng máy ảnh (Hình 1). Kết quả cho thấy, ở nhiệt độ 700°C mẫu xương sau khi nung có màu xám do vẫn còn một số tạp chất hữu cơ chưa được cháy hết. Khi nhiệt độ tăng lên 900°C mẫu xương có màu trắng sạch, cho thấy các tạp chất hữu cơ (protein và collagen) đã được loại bỏ. Mẫu xương sẽ chuyển sang màu trắng và phần lõi xương có ánh xanh khi nung ở nhiệt độ 1100°C. Bên cạnh sự thay đổi màu sắc, khối lượng của xương sau khi nung cũng giảm 44,1%, 44,9% và 49,1% về khối lượng, ở nhiệt độ tưởng ứng 700°C, 900°C và 1100°C.



Hình 1. Mẫu xương nguyên liệu được nung ở nhiệt độ khác nhau: (a) 700°C, (b) 900°C và (c) 1100°C

Kết quả phân tích thành phần của mẫu xương sau khi nung bằng XRF được trình bày ở Bảng 1. Như đã thấy, Ca và P là hai thành phần chính được tìm thấy nhiều nhất trong xương ở dạng oxide, chiếm 41,56% CaO và 36,90%  $P_2O_5$ trọng lượng ở 900°C, tiếp theo 43,63% CaO và 37,66%  $P_2O_5$  ở 1100°C còn lại là các thành phần oxide khác khác. Nghiên cứu của Bahrololoom và cộng sự cho thấy, thành phần của xương đầu bò sau khi nung có 42,7% CaO và 53,4%  $P_2O_5$  [18]. Thành phần chính của xương bò không khác nhau nhiều khi ở nhiệt độ 900°C và 1100°C, cùng với khả năng chuyển hóa HA thành  $\beta$ -TCP ở nhiệt độ 1100°C [19], thì 900°C được chọn làm nhiệt độ nung xương bò dùng làm bột nguyên liệu tổng hợp HA.

Thành phần	SiO <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	CaO	MgO	SO <sub>3</sub>	K <sub>2</sub> O	Na <sub>2</sub> O	Cl	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Ca/P
900°C	-	0,48	0,01	41,56	1,33	1,15	0,02	3,78	0,04	36,9	1,43
1100°C	0,02	0,04	0,01	43,63	1,46	1,16	-	2,53	0,04	37,66	1,47

Bảng 1. Thành phần xương sau nung được phân tích bằng XRF

### 3.2. Chuyển hóa thành HA

#### 3.2.1. Ånh hưởng của nồng độ $H_3PO_4$ đến sự hình thành HA

Thành phần của xương bò sau khi nung ở 900°C chiếm 41,56% CaO và 36,9%  $P_2O_5$  tính theo khối lượng (Bảng 1) và kết quả phân tích XRD (Hình 2) cho thấy bản thân xương bò sau khi nung đã tồn tại cấu trúc tinh thể HA. Như vậy, để chuyến hóa hết phần CaO được tạo ra trong quá trình nung thành HA thì BXB được phản ứng với H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> với các nồng độ khác nhau. Phản ứng thực hiện với tỉ lệ cố định giữa BXB và dung dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (BXB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) là 1/10, ở điều kiện nhiệt độ phản ứng 80°C, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc HA sau khi tổng hợp là 900°C.

Kết quả cho thấy, khi so sánh với phổ nhiễu xạ HA chuẩn các mẫu tổng hợp đều tồn tại các đỉnh đặt trưng của HA cùng với sự xuất hiện của một vài đỉnh đặc trưng của  $\beta$ -TCP và CaO tại các vị trí  $2\theta = 31.3$ ; 33,67; 34,6; 35,85 và 23,11°. Khi nồng độ của H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> tăng lên thì các đỉnh này cũng dần biết mất và cường độ của các đỉnh đặc trưng cho HA cũng tăng lên. Khi sử dụng H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> có nồng độ là 0,035 M thì các đỉnh đặc trưng  $\beta$ -TCP và CaO hầu như biến mất. Kích thước tinh thể HA được tính dựa vào phương trình scherrer và trình bày ở Bảng 2. Bảng 2 cho thấy, kích thước tinh thể dao động từ 83– 88 nm. Ngoài ra, kết quả phân tích SEM (Hình 3) của các mẫu cho thấy, các mẫu có dạng hạt cầu bất đối xứng. Quan sát từ ảnh có thể thấy, ở nồng độ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> khác nhau, các hạt hầu như ít có sự thay đổi về hình thái và khá đồng đều và kích thước hạt khoảng 1000nm.



Hình 2. Nhiễu xạ XRD mẫu HA tổng hợp ở các nồng độ H<sub>3</sub>PO4 khác nhau: (a) 0 M, (b) 0,025 M, (c) 0,030 M và (d) 0,035 M. Điều kiện cố định: BXB/ H<sub>3</sub>PO4 = 1/10, nhiệt độ phản ứng 80°C, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C



Hình 3. Ảnh SEM của mẫu HA tổng hợp ở các nồng độ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> khác nhau: (a) 0 M, (b) 0,025 M, (c) 0,030 M và (d) 0,035 M.
Điều kiện cố định: BXB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, nhiệt độ phản ứng 80°C, pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C

Điều này cho thấy, đối với quá trình tổng hợp HA có nguồn gốc từ xương bò thì gần như không có sự tác động lớn đến hình thái hạt. Kết quả này cũng khá phù hợp với một kết quả nghiên cứu của tác giả Rhee [20] và Shojai [12]. Như vậy, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> với nồng 0,035 M được xem như

điều kiện phù hợp để chuyển hóa xương bò thành HA. **Bảng 2.** Ảnh hưởng nồng đô dụng dịch H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> đến HA

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , M	0	0,025	0,03	0,035			
Kích thước tinh thể, nm	83,6	84,8	86,4	88,3			
Kích thước hạt, nm	995±50	1035±40	1100±55	1050±65			

### 3.2.2. Ảnh hưởng nhiệt độ phản ứng đến sự hình thành HA

Điều kiện nhiệt độ thay đổi từ 60 – 90°C để khảo sát ảnh hưởng đến quá trình hình thành HA. Hình 4 thể hiện kết quả phân tích nhiễu xa XRD các mẫu HA được tổng hợp ở các điều kiện nhiệt độ phản ứng khác nhau cho thấy, có sự xuất hiện đầy đủ các vạch nhiễu xạ đặc trưng của HA. Tuy nhiên, mẫu được tổng hợp ở nhiệt đô 60, 70, 80°C có xuất hiện thêm một vài đỉnh với cường độ nhỏ đặc trưng của β-TCP. Với mẫu tổng hợp ở 90°C hầu như chỉ sự xuất hiện các đỉnh đặc trưng của HA. Kết quả chứng tỏ, khi nhiệt độ tăng đã thúc đẩy quá trình phản ứng nhanh, chuyển pha tao ra HA tinh khiết điều này đúng với công bố trước đó năm 2015 của Jing Luo và cộng sự về khảo sát nhiệt độ phản ứng 70 – 95°C [21]. Mặt khác, bên cạnh sư tăng cường độ thì các đỉnh nhiễu xạ XRD cũng trở nên sắc nhọn hơn, điều này cho thấy khi tăng nhiệt độ phản ứng thì độ kết tinh của tinh thể tăng [22]. Cụ thể, Bảng 3 cho thấy, khi nhiệt độ tăng từ 60 – 90°C thì độ kết tinh của tinh thể HA cũng tăng từ 93,5 – 97,7%, kèm với đó kích thước tinh thể cũng tăng từ 80,3 – 95,7 nm. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Wijesinghe và cộng sự [22]. Như vậy, 90°C là nhiệt độ thích hợp để chuyển hóa HA.



Hình 4. Nhiễu 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: BXB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(0,035 M), pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C
Bảng 3. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến HA

Nhiệt độ (°C)	60	70	80	90
Kích thước tinh thể, nm	80,3	86,5	88,3	95,7
Độ tinh thể, %	93,5	94,8	95,9	97,7
Kích thước hạt, nm	999±80	920±73	1020±77	$1005 \pm 90$



Hình 5. 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: BXB/ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(0,035 M), pH 11 và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C

Ngoài ra, ảnh hưởng của nhiệt độ đến sự hình thành HA còn được đánh giá qua phân tích SEM của các mẫu (Hình 5). Kết quả cho thấy, ở các nhiệt độ phản ứng khác nhau, hạt HA đều có dạng hình cầu không đối xứng và kích thước hạt vào khoảng 900-1000 nm.

3.2.3. Anh hưởng của pH đến sự hình thành HA



Hình 6. Nhiễu xạ XRD mẫu HA tổng hợp ở các pH khác nhau: (a) pH 9, (b) pH 10, (c) pH 11 và (d) pH 12. Điều kiện cố định: BXB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,035 M), nhiệt độ phản ứng 90°C và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C

Mẫu HA hợp được tiến hành tổng hợp ở các giá trị pH 9-12, để khảo sát ảnh hưởng của chúng đến quá hình thái và cấu trúc HA. Mẫu sau khi tổng hợp được tiến hành phân tích nhiễu xạ XRD kết quả cho thấy, các mẫu đều xuất hiện đầy đủ các vạch nhiễu xạ đặc trưng của HA (Hình 6). Tuy nhiên, mẫu được tổng hợp ở pH 9, pH 10 và pH 12 có xuất hiện thêm một vài đỉnh đặc trưng của  $\beta$ -TCP. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu trước đó của Peipei Wang và cộng sự cho rằng, pH 9 tạo nên hỗn hợp  $\beta$ -TCP và HA, pH 10 bước đầu hình thành HA tinh khiết [23]. Mẫu được tổng hợp ở pH 11 hầu như chỉ sự xuất hiện các đỉnh đặc trưng của HA và đạt độ tinh thể cao nhất là 97,7%. Tuy nhiên, kích thước của tinh thể có xu hướng tăng khi tăng pH và phù hợp với nghiên cứu của Jingbing Liu và cộng sự [24].

Kết quả phân tích SEM cho thấy, các mẫu đều có sự hình thành hạt HA ở dạng hình cầu không đối xứng (Hình 7). Không có sự khác nhau về kích thước hạt giữa các mẫu và kích thước hạt dao động từ 990 – 1090 nm (Bảng 4). Như vậy, pH 11 được cho là điều kiện phù hợp để tổng hợp HA.

Bảng 4. Ảnh hưởng của pH đến HA

÷	-	-		
pH	9	10	11	12
Kích thước tinh thể, nm	89,3	91,9	95,7	104,5
Độ tinh thể, %	94,3	94,44	97,7	94,9
Kích thước hạt, nm	1088±90	990±82	1090±97	1025±91



Hình 7. Ảnh SEM mẫu HA được tổng hợp ở các pH khác nhau:
(a) pH 9, (b) pH 10, (c) pH 11 và (d) pH 12. Điều kiện cố định:
BXB/ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,035 M), nhiệt độ phản ứng 90°C và nhiệt độ nung ổn định cấu trúc là 900°C

#### 3.2.4. Ảnh hưởng nhiệt độ nung đến sự hình thành HA

Để khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ nung đến quá trình hình thành và cấu trúc HA, mẫu tổng hợp được tiến hành ở nhiệt độ 700 – 1000 °C. Kết quả phân tích nhiễu xạ XRD của các mẫu nung ở các nhiệt độ khác nhau điều cho thấy xuất hiện các đỉnh đặc trưng của HA (Hình 8).

Tuy nhiên, mẫu được nung ở 700°C và 800°C vẫn còn xuất hiện thêm một vài đỉnh đặc trưng của pha  $\beta$ -TCP nhưng với cường độ rất nhỏ. Sự xuất hiện của pha  $\beta$ -TCP ở nhiệt độ nung thấp, chứng tỏ có sự phân hủy HA xảy ra ở nhiệt độ thấp hơn dự kiến, ở các nghiên cứu trước đây giai đoạn này chỉ bắt đầu khi nung trên 1000°C [25] và hiện tượng này tương tự với nghiên cứu của Malina và cộng sự [26]. Ở nhiệt độ nung thấp có sự xuất hiện của hai pha HA và  $\beta$ -TCP, tuy nhiên khi tăng nhiệt độ thì  $\beta$ -TCP chuyển hoàn toàn thành pha HA. Chính vì thế khi nung ở 900°C và 1000°C thì chỉ còn xuất hiện pha đơn HA và đỉnh nhiễu xạ cũng trở nên hẹp và sắc nét hơn. Vì thế, HA có độ tinh khiết pha cao. Số liệu từ Bảng 5 cho thấy, độ kết tinh tăng từ 83,7% đến 99,0% khi nhiệu độ tăng từ 700°C lên 1000°C. Tuy nhiên, khi tăng nhiệt độ thì kích thước của tinh thể cũng tăng. Mặt dù, sự phân hủy pha HA không được phát hiện ở mẫu 1000°C.



Hình 8: Nhiễu xạ XRD mẫu HA tổng hợp ở nhiệt độ nung khác nhau: a) 700°C, (b) 800°C, (c) 900°C và (d) 1000°C.
 Điều kiện cố định: BXB/H3PO4 = 1/10, H3PO4 (0,035 M), nhiệt độ phản ứng 90°C và pH = 11

Kết quả phân tích SEM (Hình 9) cho thấy, HA cũng có dạng hình câu không đối xứng với kích thước phân bố từ 1000 nm đến 1055 nm (Bảng 5).



Hình 9. 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: BXB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(0,035 M), nhiệt độ phản ứng 90°C và pH = 11

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

Nhiệt độ nung (°C)	700	800	900	1000
Kích thước tinh thể, nm	90,6	92,5	95,7	101,8
Độ tinh thể, %	83,7	95,9	97,7	99,0
Kích thước hạt, nm	1000±94	1020±86	1050±91	1055±97

# 3.2.5. Ảnh hưởng của thời gian nung đến sự hình thành HA

Để khảo sát ảnh hưởng của thời gian nung, thí nghiệm được tiến hành ở thời gian nung khác nhau. Kết quả phân tích nhiễu xạ XRD cho thấy, chỉ xuất hiện các đỉnh đặc trưng của pha đơn HA ngoài ra không cho thấy sự có mặt của các đỉnh nhiễu xạ pha khác khi tiến hành thời gian nung 1 - 4 giờ (Hình 10).



Hình 10. Nhiễu xạ XRD mẫu HA tổng hợp với thời gian nung khác nhau: a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ và (d) 4 giờ. Điều kiện cố định: BXB/H3PO4 = 1/10, H3PO4 (0,035 M), nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và nhiệt độ nung là 900°C



Hình 11. Ảnh SEM của HA tổng hợp với thời gian nung khác nhau: a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ và (d) 4 giờ. Điều kiện cố định: BXB/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 1/10, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0,035 M), nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 và nhiệt độ nung là 900°C

Ngoài ra, độ kết tinh của tinh thể của HA tăng nhẹ từ 95,1% lên 98,3% và kích thước tinh thể của chúng cũng tăng nhẹ từ 94,1 nm lên 96,5 nm khi tăng thời gian nung từ 1-4 giờ (Bảng 6). Điều này phù hợp với công bố trước đó

Thời gian nung, giờ	1	2	3	4
Kích thước tinh thể, nm	94,1	95,7	96,3	96,5
Độ tinh thể, %	95,1	97,7	98,1	98,3
Kích thước hạt, nm	1050±94	1120±96	1054±98	1015±90

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian nung đến kích thước của HA

## 4. Kết luận

24

Kết quả nghiên cứu cho thấy, nguồn nguyên liệu phế phẩm xương bò có thể sử dụng để sản xuất HA. Xương bò sau khi xử lí sơ bộ và nung ở nhiệt độ 900°C vẫn tồn tại một lượng lớn HA tự nhiên chính vì thế chỉ cần chuyển một lượng CaO được tạo ra trong quá trình nung là có thể tạo được HA. Có thể tạo ra hạt HA có kích thước tinh thể dưới 100 nm, có độ tinh thể lên đến 99% khi cho phản ứng chuyển hóa được thực hiện ở điều kiện nồng độ H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> = 0,035 M, nhiệt độ 90°C, pH 11, nung ở 900°C trong thời gian 4 giờ.

**Lời cảm ơn:** Nhóm tác giả xin cảm ơn Quỹ nghiên cứu của Bộ Giáo dục & Đào tạo đã hỗ trợ cho nghiên cứu này. Mã số đề tài: B2017-TCT-20ĐT

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ferraz, M., F. Monteiro, and C. Manuel, "Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies", *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*. 2(2)2004: p. 74-80.
- [2] Kokubo, T. and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*. 27(15)2006: p. 2907-2915.
- [3] Chen, L., et al., "The role of surface charge on the uptake and biocompatibility of hydroxyapatite nanoparticles with osteoblast cells", *Nanotechnology*. 22(10)2011: p. 105708.
- [4] O'Hare, P., et al., "Biological responses to hydroxyapatite surfaces deposited via a co-incident microblasting technique", *Biomaterials*. 31(3)2010: p. 515-522.
- [5] Dorozhkin, S.V., "Calcium orthophosphates as bioceramics: state of the art", *Journal of Functional Biomaterials*. 1(1)2010: p. 22-107.
- [6] Seol, Y.-J., et al., "Fabrication of a hydroxyapatite scaffold for bone tissue regeneration using microstereolithography and molding technology", *Microelectronic Engineering*. 86(4)2009: p. 1443-1446.
- [7] Dent, C. and I. Davies, "Calcium metabolism in bone disease: effects of treatment with microcrystalline calcium hydroxyapatite compound and dihydrotachysterol", *Journal of the Royal Society of Medicine*, 73(11)1980: p. 780-785.
- [8] Wang, Y., L. Liu, and S. Guo, "Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/ polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro", *Polymer Degradation and Stability*. 95(2)2010: p. 207-213.
- [9] Wang, X., et al., "Development of biomimetic nano-

Hồ Quốc Phong, Nguyễn Đình Duy, Huỳnh Liên Hương, Nguyễn Văn Đạt

hydroxyapatite/poly (hexamethylene adipamide) composites", *Biomaterials*. 23(24)2002: p. 4787-4791.

- [10] Jungbauer, A., et al., "Performance and characterization of a nanophased porous hydroxyapatite for protein chromatography", *Biotechnology and bioengineering*. 87(3)2004: p. 364-375.
- [11] Hashimoto, Y., T. Taki, and T. Sato, "Sorption of dissolved lead from shooting range soils using hydroxyapatite amendments synthesized from industrial byproducts as affected by varying pH conditions", *Journal of environmental management*. 90(5)2009: p. 1782-1789.
- [12] Sadat-Shojai, M., et al., "Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures", *Acta Biomater*. 9(8)2013: p. 7591-621.
- [13] Gergely, G., et al., "Preparation and characterization of hydroxyapatite from eggshell", *Ceramics International*. 36(2)2010: p. 803-806.
- [14] Vecchio, K.S., et al., "Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants", *Acta biomaterialia*. 3(6)2007: p. 910-918.
- [15] Venkatesan, J. and S.K. Kim, "Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (Thunnus obesus) bone", *Materials*. 3(10)2010: p. 4761-4772.
- [16] Pap, L., et al., "Brief notes on previous and recent results of thermoanalytical research of bone", Acta GGM Debrecina Geol. Geomorph. Phys. Geogr. Ser. DEBRECEN. 32008: p. 15-22.
- [17] Vorokh, A.S., "Scherrer formula: estimation of error in determining small nanoparticle size", *Nanosystems: Physics, Chemistry, Mathematics*. 9(3)2018: p. 364-369.
- [18] Bahrololooma, M.E., et al., "Characterisation of natural hydroxyapatite extracted from bovine cortical bone ash", *Journal of Ceramic Processing Research*. 10(2)2009: p. 129-138.
- [19] Liao, C.-J., et al., "Thermal decomposition and reconstitution of hydroxyapatite in air atmosphere", *Biomaterials*. 20(19)1999: p. 1807-1813.
- [20] Rhee, S.H., et al., "Effect of heat-treatment temperature on the osteoconductivity of the apatite derived from bovine bone", *Key Engineering Materials.* 309-3112006: p. 41-44.
- [21] Zhou, J., et al., "Temperature Effect on Hydroxyapatite Preparation by Co-precipitation Method under Carbamide Influence", *MATEC Web of Conferences*. 26(01007)2015: p. 1-5.
- [22] Wijesinghe, W., et al., "Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity", Materials Science and Engineering: C. 422014: p. 83-90.
- [23] Wang, P., et al., "Effects of synthesis conditions on the morphology of hydroxyapatite nanoparticles produced by wet chemical process", *Powder Technology*. 203(2)2010: p. 315-321.
- [24] Liu, J., et al., "The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method", *Ceramics international*. 29(6)2003: p. 629-633.
- [25] Sung, Y.-M., J.-C. Lee, and J.-W. Yang, "Crystallization and sintering characteristics of chemically precipitated hydroxyapatite nanopowder", *Journal of Crystal Growth*. 262(1)2004: p. 467-472.
- [26] Dagmara Malina\*, K.B., Agnieszka Sobczak-Kupiec, "Studies on sintering process of synthetic hydroxyapatite", *Acta biochimica Polonica* 60(4)2013: p. 851-855.
- [27] Aminatun, S., YM Penga, Istifarah, and R Apsari, "The Effect of Sintering Process on the Characteristics of Hydroxyapatite from Cuttlefish Bone (Sepia Sp.)", *Research Journal of Pharmaceutical*, *Biological and Chemical Sciences*. 4(4)2013: p. 1431-1442.

(BBT nhận bài: 25/02/2019, hoàn tất thủ tục phản biện: 17/6/2019)