

## MỘT SỐ ĐẶC TÍNH CỦA CANXI HYDROXYAPATIT CHIẾT XUẤT TỪ XƯƠNG CÁ NGỪ VẦN *Katsuwonus pelamis*

Lê Hồ Khánh Hy\*, Phạm Xuân Kỳ, Đào Việt Hà, Nguyễn Thu Hồng,  
Phan Bảo Vy, Đoàn Thị Thiết, Nguyễn Phương Anh

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam  
\*E-mail: lehokhanhhy@gmail.com

Ngày nhận bài: 5-8-2018; Ngày chấp nhận đăng: 16-12-2018

**Tóm tắt.** Bài báo này trình bày kết quả nghiên cứu về một số đặc tính của canxi hydroxyapatit chiết xuất từ xương cá ngừ *Katsuwonus pelamis*, một sản phẩm phụ từ ngành xuất khẩu thịt cá ngừ. Các hợp chất có giá trị là hydroxyapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  và  $\beta$ -tricanxi phosphat  $\beta$ -TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  đã được chiết xuất thành công từ xương cá ngừ vằn. Xương cá ngừ được nung ở các nhiệt độ khác nhau 600, 900 và 1.200°C. Dạng canxi thu được khi nung mẫu ở 600°C là hydroxyapatit với tỉ lệ Ca/P 1,658 gần với tỉ lệ Ca/P 1,67 trong xương người; các tinh thể hydroxyapatit có kích thước trung bình 0,25  $\mu\text{m}$  và sự phân bố kích thước tương đối đồng đều. Đối với mẫu xương được xử lý ở 900 và 1.200°C, canxi thu được là hỗn hợp hai pha hydroxyapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  và  $\beta$ -tricanxi phosphat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; tỉ lệ Ca/P từ 1,660–1,665, các tinh thể canxi có độ xốp cao và liên kết với nhau theo hướng ưu tiên kiểu hình ống với kích thước lớn hơn 1  $\mu\text{m}$ .

**Từ khóa:** Xương, cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis*, 600°C, 900°C, 1.200°C, hydroxyapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,  $\beta$ -tricanxi phosphat  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

### GIỚI THIỆU

Hiện nay việc tìm kiếm các vật liệu sinh học có tiềm năng trong các ứng dụng y sinh đang là vấn đề được rất nhiều nhà khoa học quan tâm, đặc biệt là nguồn vật liệu từ biển. Hơn nữa, việc tận dụng các phế phẩm biển để nghiên cứu tái sử dụng, mang lại lợi ích kinh tế là điều vô cùng cần thiết.

Hydroxyapatit (viết tắt là HAp) có công thức hoá học  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  là canxi hydroxyapatit. HAp có tỷ lệ Ca/P giống như tỷ lệ Ca/P tự nhiên trong xương và răng (Ca/P = 1,67) [1, 2]. Do có cùng bản chất hoá học và cấu trúc, HAp là canxi hydroxyapatit dễ hấp thu nhất đối với cơ thể con người. Đây là một vật liệu sinh học, đóng vai trò quan trọng trong việc thay thế các mô xương [1], tái tạo các khiếm khuyết sọ [2], tổng hợp xương nhân tạo

[3–5]. Ngoài ra, HAp còn được sử dụng trong các lĩnh vực khác như chế tạo cảm biến sinh học [6], loại bỏ các kim loại nặng tích lũy trong môi trường nước [7] và tạo chế phẩm bổ sung canxi [8].

Ở cơ thể người và động vật, HAp là thành phần chính trong xương (chiếm đến 60–70% khối lượng) [9] và răng (chiếm 97%) [10]. Các dạng canxi hydroxyapatit và dẫn xuất phổ biến hiện nay là HAp,  $\beta$ -tricanxi phosphat ( $\beta$ -TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) và biphasic canxi phosphat (hỗn hợp của HAp và  $\beta$ -TCP). Trong đó,  $\beta$ -TCP có tỉ lệ Ca/P = 1,5<sup>o</sup>; có thể dễ dàng hòa tan và hấp thu trong cơ thể, có tính tương thích sinh học cao thúc đẩy quá trình phát triển xương [11, 12].

Hiện nay, các vật liệu canxi hydroxyapatit được sử dụng là từ tổng hợp [8]. Song song với

điều này, một loạt các qui trình đã được phát triển để điều chế HAp từ các nguồn tự nhiên. Các nguồn vật liệu tự nhiên đã, đang được nghiên cứu là san hô [13, 14], nang mực [15–18], vỏ các loài động vật [19–20], vảy cá [22–24].

Ngoài các nguồn vật liệu tự nhiên trên, một số nghiên cứu về các đặc điểm hóa lý của các dạng canxi hydroxyapatit ở xương cá đã được tiến hành. Từ xương của cá tráp biển Nhật Bản, Ozawa và Suzuki [25] đã thực hiện phản ứng nhiệt theo các giai đoạn, từ 30–250°C, 250–380°C, 380–525°C và 525–1.300°C. Phân tích bằng nhiễu xạ tia X (XRD) khẳng định thu được HAp khi nung các mẫu ở 600, 800, 1.000, 1.200°C và HAp cùng với  $\beta$ -TCP cũng đã được phát hiện ở 1.300°C. Buitinguiza và nnk., [26] đã sử dụng xương của cá kiếm (*Xiphias gladius*) và cá ngừ (*Thunnus thynnus*) để thực hiện phản ứng nhiệt ở 600°C và 950°C. Kết quả cho thấy mẫu nung thu được ở 600°C từ cả hai loài cá là HAp, và ở nhiệt độ 950°C biphasic canxi hydroxyapatit HAp: $\beta$ -TCP được tìm thấy với tỉ lệ 87/13; tỉ lệ Ca/P là 1,87, cao hơn giá trị Ca/P trong xương người. Thí nghiệm thử độc tính đối với tế bào xương *in vitro* ở nồng độ 5, 10, 20, 50, 100% (0,01 g/ml) của cả 2 dạng canxi thu được cho thấy HAp và  $\beta$ -TCP không gây độc. Thêm vào đó, việc chiết xuất HAp và các hợp chất canxi hydroxyapatit khác từ xương cá tuyết Atlantic (*Gadus morhua*) cũng đã được thực hiện bởi nhóm nghiên cứu Piccirillo và nnk., [27]. Trong nghiên cứu này, xương được nung ở nhiệt độ từ 600°C và 1.200°C. Phân tích XRD cho thấy HAp thu được khi xử lý mẫu ở 600°C. Đối với nhiệt độ nung từ 900–1.200°C, biphasic canxi hydroxyapatit HAp: $\beta$ -TCP được phát hiện, tỉ lệ Ca/P là  $1,49 \pm 0,05$  tùy theo nhiệt độ nung. Ngoài phương pháp gia nhiệt, gần đây nhất, Venkatesan và nnk., [28] đã chiết xuất và điều chế bột nano HAp từ xương cá hồi (Busan, Hàn Quốc) bằng phương pháp thủy phân kiềm, kích thước hạt nano HAp từ 6–37 nm. Sự tương thích sinh học của hạt nano HAp với tế bào gốc trung mô từ tủy xương cho thấy HAp không độc và hứa hẹn là vật liệu sinh học thay thế các mô xương trong tương lai.

Xuất phát từ nhu cầu về canxi hydroxyapatit, từ năm 2006 ở nước ta đã có những nghiên cứu tổng hợp HAp bằng các phương pháp hóa học như kết tủa hóa học hay sol-gel từ nguồn Canxi thương mại (Đỗ Ngọc Liên, Báo cáo đề tài cấp Bộ Khoa học và Công nghệ 2006) [29]. Các nhà khoa học trong nước đã thử nghiệm chế tạo HAp từ nguồn nguyên liệu tự nhiên như mai mực, vỏ sò nhưng canxi từ nguồn nguyên liệu ban đầu này thành phần chính là canxi cacbonat, nên đòi hỏi phải có công đoạn tổng hợp hóa học để chuyển hóa thành HAp [30, 31].

Năm 2011, Nguyễn Văn Hương đã khảo sát quá trình tách HAp từ xương ống của bò. Các mẫu được khảo sát ở trong nồi áp suất ở 700°C (Báo cáo Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, 2011). HAp thu được có kích thước hạt trung bình dưới 500 nm, giản đồ XRD cho thấy sản phẩm chỉ có HAp. Năm 2009, nhóm tác giả Nguyễn Thị Lan Chi và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu trích ly canxi từ đầu, xương, vây, đuôi cá tra (Báo cáo Viện nghiên cứu nuôi trồng thủy sản II). Kết quả khảo sát cho thấy xương cá có thành phần canxi chiếm tỷ lệ cao nhất (4,49%) so với các bộ phận khác Tuy nhiên, các tác giả chưa có nghiên cứu sâu hơn về quy trình tinh chế và sản xuất bột xương, cũng như giá trị sinh học của bột xương ứng dụng làm chế phẩm bổ sung canxi cho con người. Và sau đó không có nghiên cứu tiếp tục về vấn đề trên. Hiện nay, không có bất cứ công trình công bố nào về thành phần và đặc điểm hóa lý của canxi hydroxyapatit từ xương các loài cá biển Việt Nam mặc dù số lượng loài cá biển khá lớn và nguồn phụ phẩm như xương cá chiếm tỷ lệ cao.

Cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis*, một trong những loài cá ngừ đại dương chiếm trữ lượng lớn tại vùng biển xa bờ miền Trung (Bình Định, Phú Yên, Khánh Hòa), khả năng khai thác có thể đạt tới 200.000 tấn/năm (nguồn báo VGP News 2014). Hơn nữa, cá ngừ vằn chiếm tỷ lệ cao nhất so với trên 200 loài cá khác nhau bắt gặp trong sản lượng các mẻ lưới rê của các tàu đánh bắt xa bờ [32]. Các số liệu báo cáo trong ngành sản xuất thịt cá ngừ cũng cho thấy

các phế phẩm, phụ phẩm (bao gồm đầu, bộ xương, nội tạng, mang, phần thịt màu sẫm, vây bụng và da) chiếm khoảng 50% tổng nguyên liệu ban đầu (đầu và xương chiếm 30%). Với sản lượng cá ngừ cao, lượng phụ phẩm xương cá là nguồn thu nhận canxi hydroxyapatit khá dồi dào. Trong nghiên cứu này, kết quả các loại canxi hydroxyapatit chiết xuất từ xương cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis* ở những nhiệt độ khác nhau và những đặc tính của nó được báo cáo.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**Vật liệu nghiên cứu.** Ba cá thể cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis* (tổng trọng lượng 10 kg) được thu mua tại cảng Hòn Rớt, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa vào tháng 5/2017. Mẫu cá sau đó được rửa sạch, bảo quản bằng đá lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tiếp theo, sau khi tách lấy phi-lê cá, xương được cạo sạch để loại sạch phần mô mềm còn sót lại, trộn chung xương của 3 cá thể, phơi khô đến khối lượng không đổi.

300 g xương cá ngừ sau khi phơi khô được ngâm trong 3 l dung dịch NaOH 1% trong nhiều giờ liền để loại bỏ phần mô mềm, tiếp tục thay dung dịch NaOH 1% đến khi phần xương trở nên trắng hơn so với mẫu xương ban đầu. Sau đó, xương được rửa với nước nhiều lần sao cho pH nước trở về trung tính [28]. Tiếp theo xương được sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi, cắt nhỏ, trộn đều để chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

### Phương pháp nghiên cứu

**Bố trí thí nghiệm điều chế canxi hydroxyapatit từ xương cá ngừ vằn.** Mẫu xương cá sau khi được xử lý theo phương pháp của Coelho và nnk., [33], cụ thể như sau: Xương cá được nung ở các nhiệt độ khác nhau 600, 900 và 1.200°C trong vòng 8 h, quá trình gia nhiệt là 10°C/phút (máy gia nhiệt Nabertherm); ở mỗi nhiệt độ, số mẫu được nung là 3 (n = 3) với khối lượng mỗi mẫu 20 g. Mẫu sau khi nung được nghiền nhỏ, tán mịn bằng cối đá. Với mỗi nhiệt độ khác nhau, lấy 3 phần ở 3 mẫu xương cá đã nung với khối lượng giống nhau, trộn đều để phân tích các dạng và

đặc điểm hóa lý chủ yếu của canxi hydroxyapatit từ xương cá ngừ vằn.

**Phương pháp xác định các dạng của canxi hydroxyapatit ở các nhiệt độ khác nhau.** Mẫu xương cá được phân tích bằng phổ nhiễu xạ tia X (XRD) (máy D2 Pharsler - Brucker), phổ hấp thụ hồng ngoại (FTIR) (máy Bruker Equinox 55), từ đó cho phép xác định các dạng canxi hydroxyapatit chiết xuất từ xương cá ngừ [26].

**Phương pháp xác định các đặc tính hóa lý chủ yếu của canxi hydroxyapatit ở các nhiệt độ khác nhau.** Xác định hình dạng và kích thước của tinh thể canxi hydroxyapatit bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử SEM (máy Jeol JSM-6480 LV) [33]. Kích thước trung bình tinh thể canxi được tính toán dựa vào phần mềm ImageJ 1.48V với thanh thước tỉ lệ trong hình chụp.

Xác định hàm lượng nguyên tố Canxi và Phospho bằng phương pháp đo quang phổ phát xạ (máy Agilent 7700x - LC-ICP-MS).

**Xử lý số liệu.** Hàm lượng, kích thước của các dạng canxi hydroxyapatit thể hiện bằng giá trị trung bình  $\pm$  SE, được tính toán trên phần mềm Excel; hàm lượng canxi, phospho được thể hiện bằng giá trị %.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

**Đánh giá cảm quan.** Hình 1 mô tả hình dạng ngoài của xương cá ban đầu và bột canxi hydroxyapatit sau khi nung ở các nhiệt độ khác nhau. Hình 1a là xương cá sau khi được cắt nhỏ, xay nhuyễn và tiếp theo trong hình 1b là bột xương hình thành ở các nhiệt độ khác nhau. Đánh giá cảm quan ban đầu cho thấy về màu sắc bột canxi điều chế có màu trắng ngà, mịn và khi được nung ở nhiệt độ cao hơn, bột canxi có màu trắng sáng hơn. Các tính chất cảm quan này của bột canxi điều chế có tính tương đồng với bột canxi hydroxyapatit tổng hợp có màu trắng, trắng ngà, vàng nhạt hoặc xanh lơ tùy theo điều kiện hình thành, kích thước hạt và trạng thái tập hợp (Đỗ Ngọc Liên, Báo cáo đề tài cấp Bộ Khoa học và Công nghệ 2006).



Hình 1. Xương cá ban đầu và bột xương sau khi nung ở các nhiệt độ khác nhau

**Các dạng canxi hydroxyapatit hình thành ở nhiệt độ khác nhau**

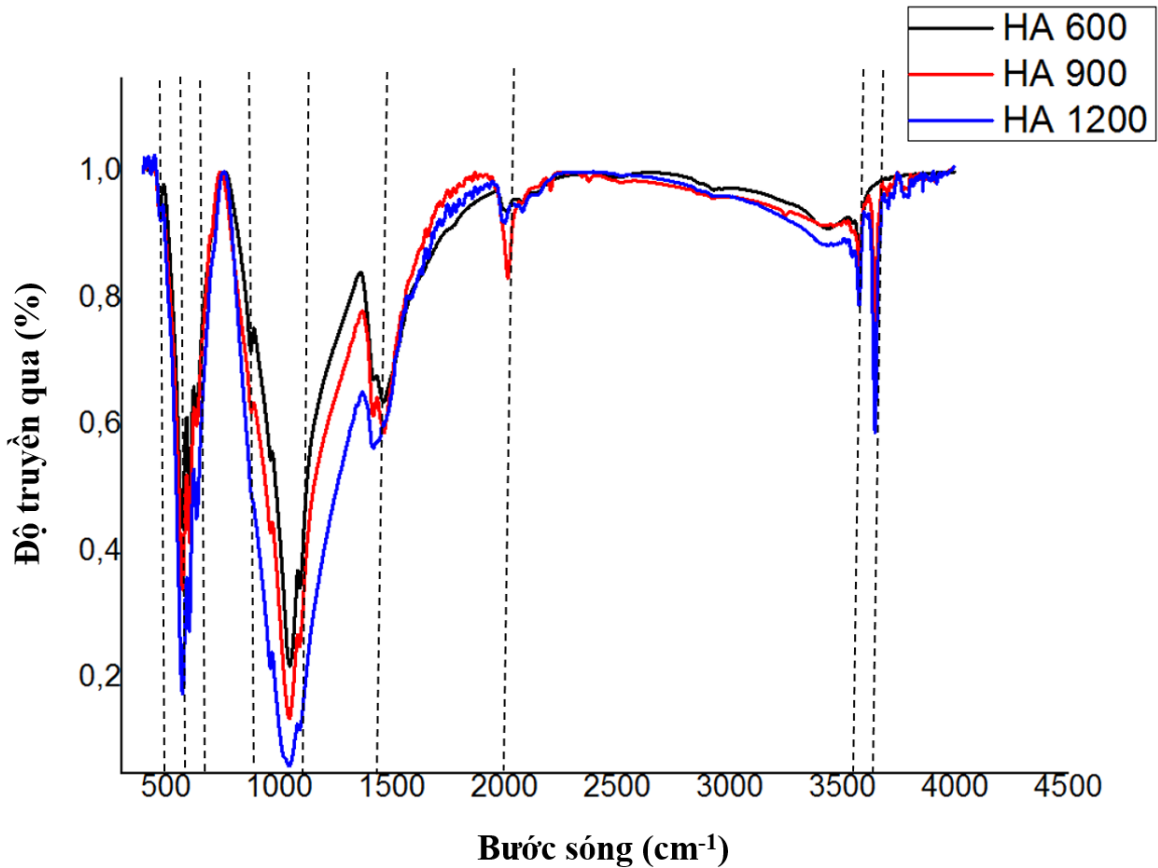
**Phổ hồng ngoại FTIR.** Phổ hồng ngoại của các mẫu canxi được hình thành ở những nhiệt độ khác nhau được thể hiện trong hình 2 và bảng 1. Tất cả các phổ hồng ngoại đều thể hiện nét tương đồng hoàn toàn ở các đỉnh hấp thụ của các nhóm chức khác nhau; kết quả này có các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho các nhóm chức tương tự với các nghiên cứu trước đây của Buitinguiza và nnk., [26] trên xương cá kiếm (*Xiphias gladius*), cá ngừ (*Thunnus thynnus*) và Venkatesan và nnk., [28] trên xương cá hồi. Cụ thể đối với phổ hồng ngoại của mẫu ở 600°C (phân tích tương tự với phổ hồng ngoại của các mẫu ở 900°C và 1.200°C), phổ hiển thị các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho nhóm  $PO_3^{4-}$  bao gồm ba vùng chính. Vùng đầu tiên thể hiện các đỉnh 1.091, 1.046  $cm^{-1}$ , tương trưng cho dao động co giãn v3 và 960  $cm^{-1}$  tương ứng với dao động co giãn v1. Vùng thứ hai của ion phosphat thể hiện dao động uốn v4 với các đỉnh được xác định rõ ở 633, 602 và 569  $cm^{-1}$ . Vùng thứ ba được quan sát thấy ở đỉnh hấp thụ yếu 471  $cm^{-1}$  tương ứng với chế độ uốn v2. Đối với nhóm

chức OH, dao động giãn được thể hiện tại bước sóng 3.571  $cm^{-1}$ . Sự hiện diện của vật chất dưới dạng hữu cơ (C-H) được phát hiện dưới dạng các đỉnh cường độ thấp ở bước sóng 2.926  $cm^{-1}$ . Ngoài các đỉnh hấp thụ chính của các nhóm chức hiện diện trong cấu trúc của canxi hydroxyapatit, trong phổ của các mẫu còn xuất hiện các đỉnh của nhóm chức cacbonat: Đỉnh từ 1.417 đến 1.463  $cm^{-1}$  và đỉnh ở 873, 1.995  $cm^{-1}$ . Sự hình thành ion cacbonat có thể là do sự hấp thụ  $CO_2$  trong khí quyển trong thời gian thực hiện thí nghiệm. Hiện tượng này liên quan đến điều kiện kiểm trong dung dịch, trong đó có ion  $OH^-$  đủ để phản ứng với  $CO_2$  [34].

Ngoài các đỉnh hấp thụ tương tự nhau trên các phổ, phổ hồng ngoại của các mẫu nung ở 900 và 1.200°C có sự xuất hiện thêm của đỉnh hấp thụ ở bước sóng 3.642  $cm^{-1}$ . Theo các nghiên cứu trước đây [35–37], đỉnh hấp thụ ở bước sóng 3.642  $cm^{-1}$  là đỉnh hấp thụ của CaO. Như vậy, trong nghiên cứu này, khi nung mẫu xương ở nhiệt độ cao 900 và 1200°C, có sự hiện diện của CaO bên cạnh các dạng canxi hydroxyapatit hình thành.

Bảng 1. So sánh phổ hồng ngoại của canxi hydroxyapatit hình thành ở những nhiệt độ khác nhau

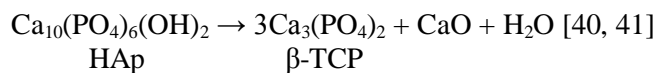
Canxi hydroxyapatit		600°C	900°C	1.200°C
		Bước sóng ( $cm^{-1}$ )		
$PO_3^{4-}$	v3	1.091, 1.046	1.090, 1.044	1.090, 1.043
	v1	960	960	959
	v4	633, 602, 569	633, 601, 569	633, 600, 570
	v2	471	472	472
OH		3.571	3.571	3.570
			3.642	3.642
$CO_3^{2-}$		1.417 → 1.463	1.416 → 1.464	1.418 → 1.463
		873	875	873
		1.995	2.000	2.030
C-H		2.926	2.924	2.926



Hình 2. Phổ hồng ngoại của canxi hydroxyapatit ở những nhiệt độ khác nhau (Màu đen: Mẫu ở 600°C; Màu đỏ: Mẫu ở 900°C; Màu xanh: Mẫu ở 1.200°C)

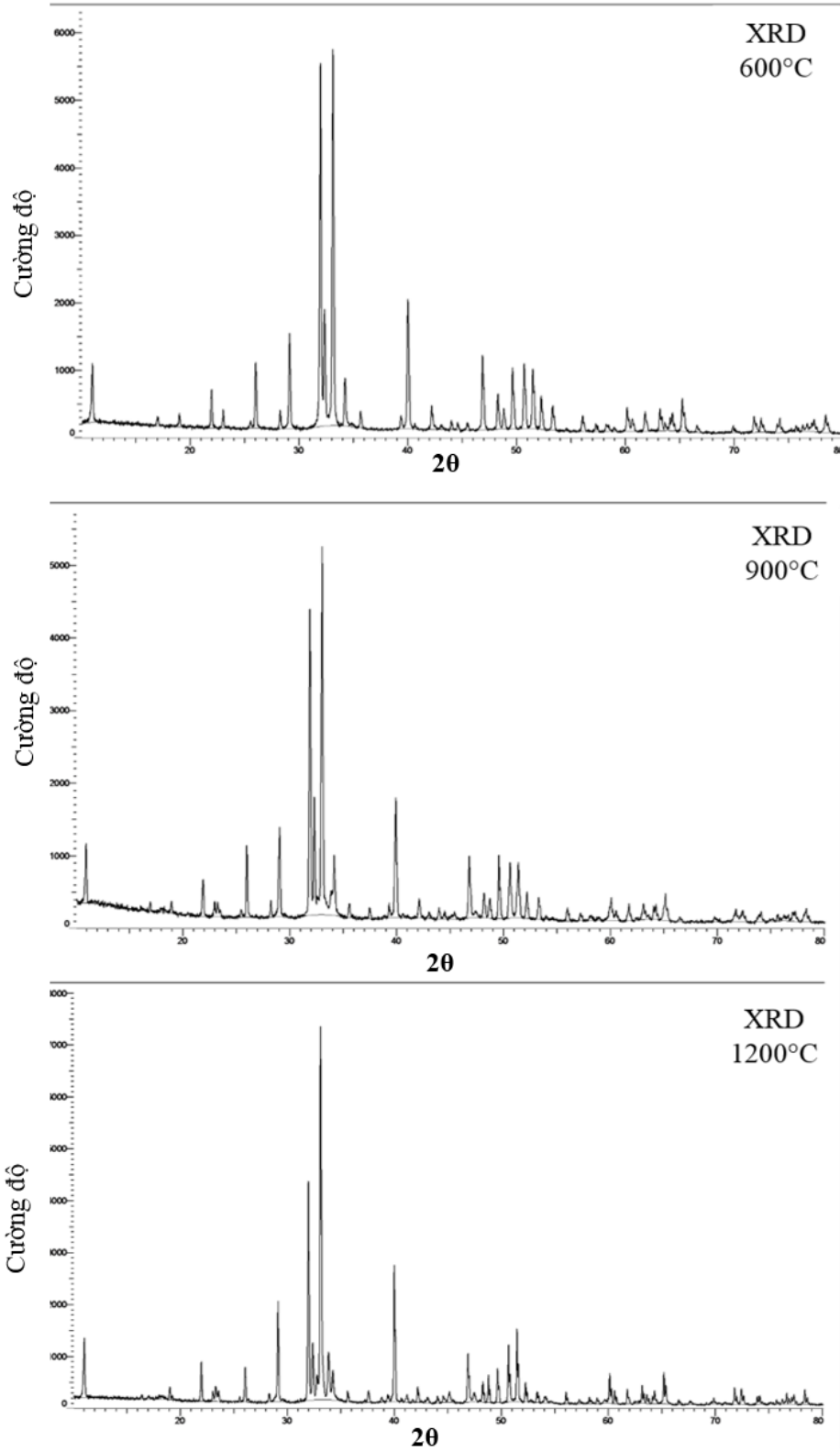
**Phổ nhiễu xạ tia X.** Hình 3 và hình 4 thể hiện phổ nhiễu xạ tia X của các mẫu, trong đó hình 3 trình bày kết quả từng phổ của các mẫu ở ba nhiệt độ khác nhau 600, 900, 1.200°C; hình 4 trình bày kết quả từng phổ và so sánh với phổ chuẩn của hydroxyapatit HAp  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (International Centre for Diffraction Data ICDD 04-007-2837). Khi so sánh phổ của mẫu ở 600°C với phổ chuẩn của HAp, mẫu canxi ở nhiệt độ này chỉ chứa HAp với các đỉnh hoàn toàn trùng khớp với phổ chuẩn và các nghiên cứu trước đây [26, 35, 37]. Đối với mẫu canxi được xử lý ở nhiệt độ 900 và 1.200°C, ngoài sự

xuất hiện của các đỉnh được xác định của pha HAp, trong phổ XRD của hai mẫu này còn có xuất hiện thêm của các đỉnh khác. Các đỉnh này là do sự có mặt của pha  $\beta\text{-TCP}$   $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  trong mẫu canxi, hiện diện ở các góc  $2\theta$  trùng khớp với các tài liệu mô tả pha canxi này trước đây [37, 38]. Ngoài ra, còn có sự hiện diện của các đỉnh CaO ở các góc  $2\theta$  32,3; 37,4; 53,9; 64,2 [37, 39] trên phổ XRD, các đỉnh này có sự trùng lặp với các đỉnh của  $\beta\text{-TCP}$ . Như vậy là có thể có sự chuyển đổi một phần từ pha HAp sang pha  $\beta\text{-TCP}$  và CaO khi nung mẫu từ 900°C theo công thức chuyển đổi:

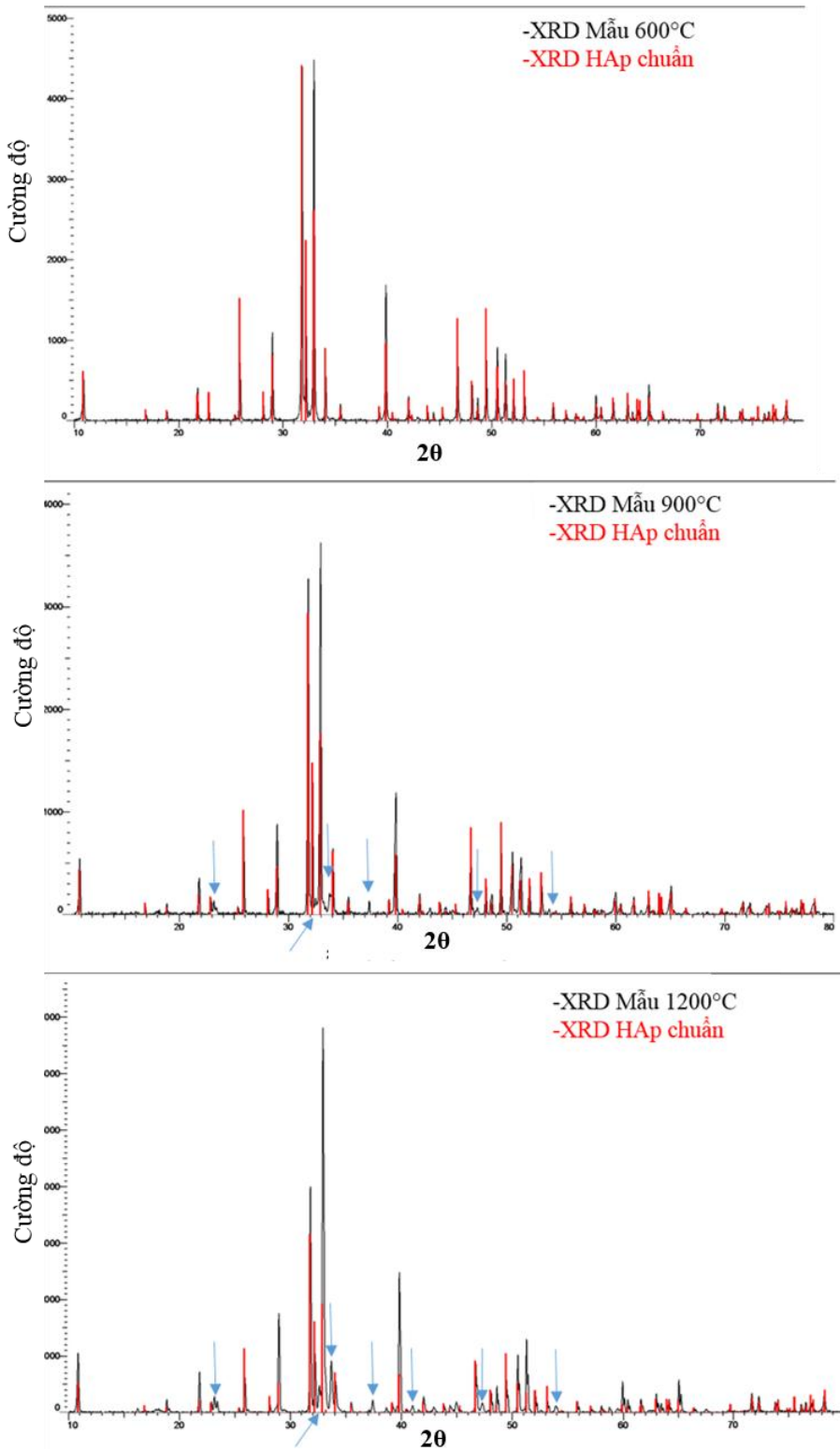


Như vậy, dựa vào phổ nhiễu xạ tia X của các mẫu canxi ở các nhiệt độ khác nhau, mẫu canxi ở 600°C được xác định chỉ hoàn toàn chứa HAp;

trong khi đó, mẫu canxi ở 900 và 1.200°C có chứa hỗn hợp hai pha HAp:  $\beta\text{-TCP}$  và CaO do sự chuyển đổi một phần từ HAp sang  $\beta\text{-TCP}$ , CaO.



Hình 3. Phổ nhiễu xạ tia X của các mẫu canxi ở 600, 900, 1.200°C

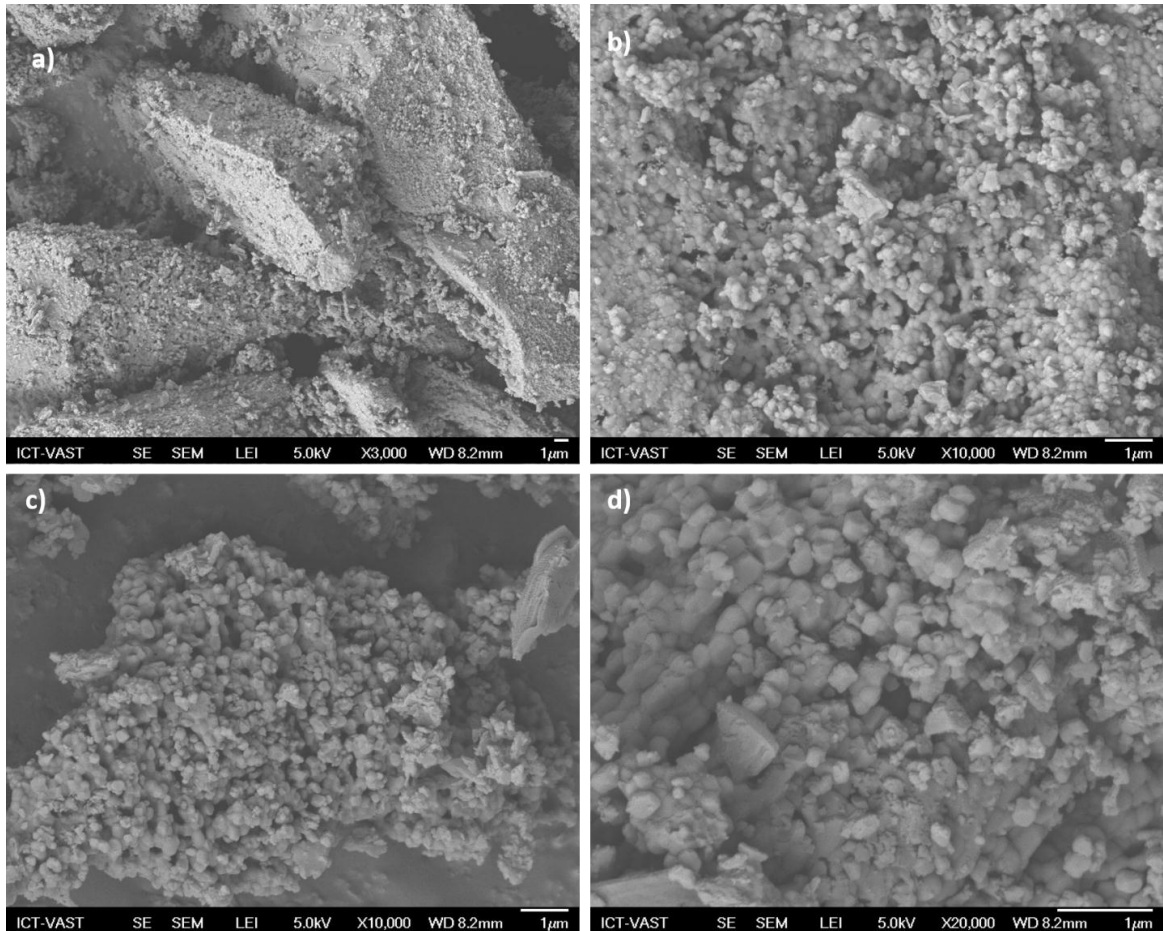


Hình 4. Phổ nhiễu xạ tia X của các mẫu ở 600, 900, 1.200°C so sánh với phổ chuẩn của HAp  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

**Các đặc tính hóa lý chủ yếu của canxi hydroxyapatit ở các nhiệt độ khác nhau**

Hình ảnh của canxi hydroxyapatit được quan sát dưới kính hiển vi điện tử quét. Hình 5 là hình ảnh kính hiển vi điện tử quét của HAp hình thành ở 600°C. Hình ảnh SEM của các hạt

hydroxyapatit HAp ở các vị trí khác nhau độ phóng đại khác nhau có độ xốp cao; các khối tinh thể kết dính với nhau, phân bố với kính thước tương đối đồng đều (0,1–0,3 μm). Kích thước trung bình của các khối tinh thể là  $0,245 \pm 0,049 \mu\text{m}$  (dựa vào phần mềm ImageJ).



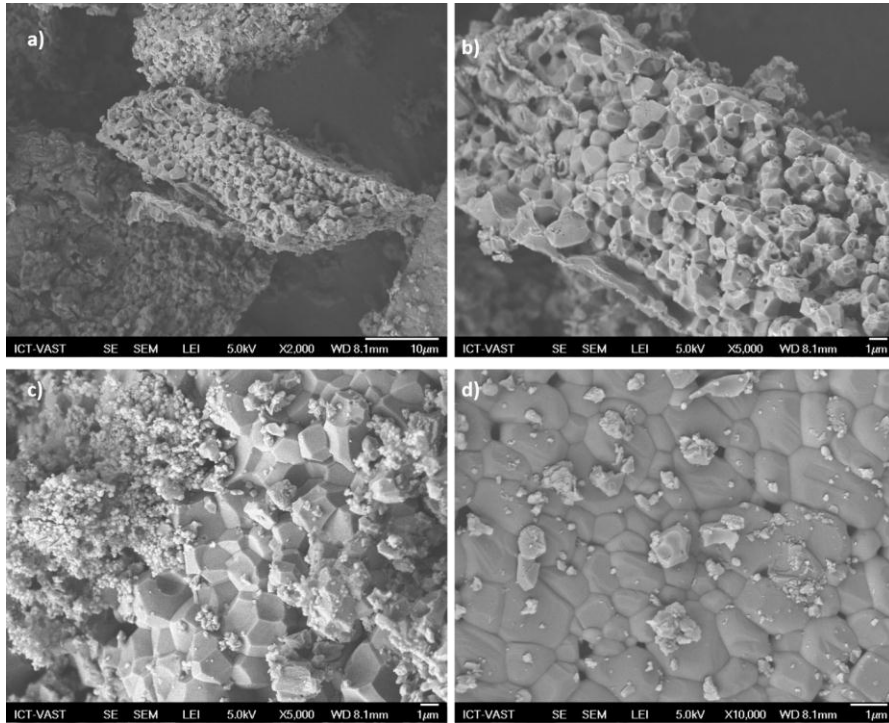
Hình 5. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của HAp ở 600°C ở các độ phóng đại khác nhau: a) X3000; b, c) X10000; d) X20000

Hình 6 và hình 7 thể hiện ảnh chụp của các mẫu canxi ở 900 và 1.200°C với các độ phóng đại khác nhau; ở đây quan sát thấy các tinh thể canxi thể hiện xu hướng kết dính theo hướng ưu tiên và có hình dạng tương đồng ở cả 2 mẫu, hình ống xốp và phân bố kích thước tương đối đồng đều (lớn hơn 1 μm). Kích thước trung bình các tinh thể vào khoảng  $1,263 \pm 0,874 \mu\text{m}$  ở 900°C và  $2,260 \pm$

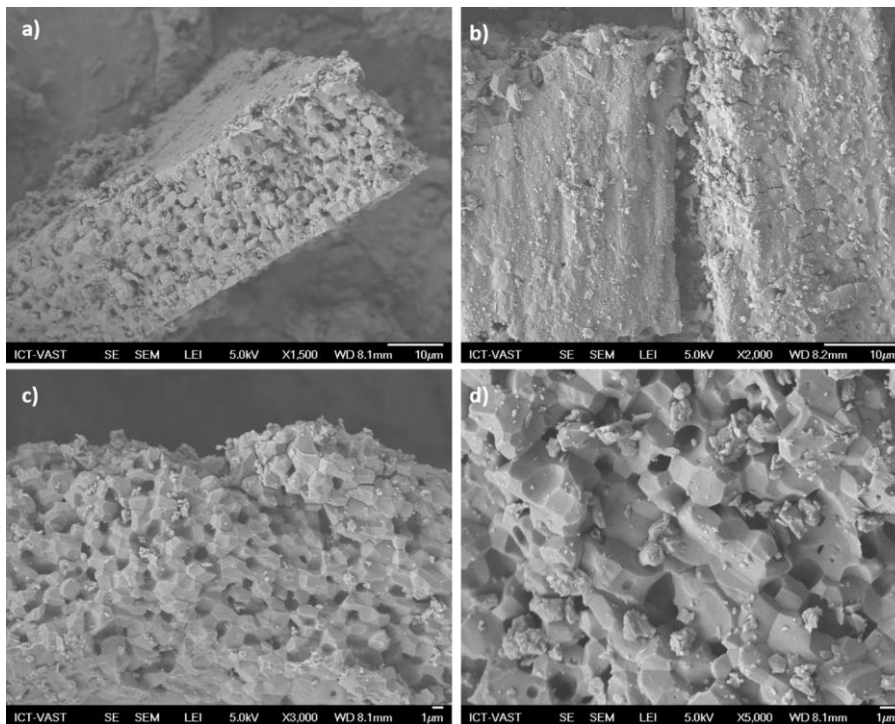
$0,753 \mu\text{m}$  ở 1.200°C.

Các tinh thể canxi hình thành ở 900 và 1.200°C có xu hướng tụ hợp hình ống khác với các tinh thể hình thành một cách rời rạc ở 600°C, ở đây có thể do thành phần cấu tạo của mẫu canxi ở nhiệt độ cao 900 và 1.200°C bao gồm HAp, β-TCP và CaO; khác với mẫu ở 600°C chỉ chứa hoàn toàn HAp.





Hình 6. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của mẫu canxi ở 900°C ở các độ phóng đại khác nhau: a) X2000; b, c) X5000; d) X10000



Hình 7. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của mẫu canxi ở 1.200°C ở các độ phóng đại khác nhau: a) X1500; b) X2000; c) X3000; d) X5000

Hàm lượng nguyên tố canxi và phospho. Bảng 2 là kết quả hàm lượng % các nguyên tố Canxi và Phospho theo phương pháp đo phổ phát xạ. Dựa vào hàm lượng % rút ra được tỉ lệ mol Ca/P có trong mẫu, ở đây, các mẫu có tỉ lệ mol Ca/P dao động từ 1,658–1,660, rất gần với tỉ lệ mol Ca/P của HAp và xương người (1,67). Giá trị này tốt hơn rất nhiều khi so sánh với kết quả nghiên cứu của Buitinguiza và nnk., [26] khi chiết xuất canxi hydroxyapatit từ xương cá

ngừ vây xanh *Thunnus thynnus* và cá kiếm *Xiphia gladius* (tỉ lệ mol Ca/P dao động từ 1,84-1,89); của Piccirillo và nnk., [27] từ xương cá tuyết Atlantic *Gadus morhua* (tỉ lệ mol Ca/P  $1,49 \pm 0,05$ ). Trong nghiên cứu này, HAp hình thành từ xương cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis* ở 600°C có tỉ lệ mol Ca/P 1,658; cần có thêm các bước thử nghiệm hoạt tính sinh học để có thể tiếp tục đưa nghiên cứu ứng dụng trong y học và thực phẩm chức năng.

Bảng 2. Hàm lượng (%) và tỉ lệ mol các nguyên tố canxi và phospho trong các mẫu canxi hình thành ở các nhiệt độ khác nhau

Mẫu	Hàm lượng (%)		Tỉ lệ mol Ca/P
	Ca	P	
600°C	38,5	18,0	1,658
900°C	39,1	18,2	1,665
1.200°C	39,4	18,4	1,660

## KẾT LUẬN

Các hợp chất có giá trị là hydroxyapatit  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  và  $\beta$ -tricanxi phosphat  $\beta$ -TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  đã được chiết xuất thành công từ xương cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis*, một sản phẩm phụ từ ngành xuất khẩu thịt cá ngừ.

Khi nung xương cá ở 600°C, hydroxyapatit HAp  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  hình thành với kích thước trung bình 0,245  $\mu\text{m}$  với tỉ lệ Ca/P 1,658 gần với tỉ lệ Ca/P trong xương người, tinh thể canxi kết dính với nhau, phân bố với kính thước tương đối đồng đều.

Đối với mẫu xương cá xử lý ở nhiệt độ cao hơn là 900 và 1.200°C, ở đây tồn tại hỗn hợp 2 pha HAp và  $\beta$ -TCP  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; tỉ lệ Ca/P từ 1,660–1,665 tương thích với giá trị 1,67 trong xương người, các tinh thể canxi có độ xốp và liên kết theo hướng ưu tiên kiểu hình ống với kích thước lớn hơn 1  $\mu\text{m}$ .

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin cảm ơn Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện thực hiện đề tài cơ sở 2017 về “Nghiên cứu thành phần và đặc điểm hóa lý chủ yếu của canxi hydroxyapatit từ phụ phẩm xương cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis*”.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Tang, P. F., Li, G., Wang, J. F., Zheng, Q. J., and Wang, Y., 2009. Development,

characterization, and validation of porous carbonated hydroxyapatite bone cement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **90**(2), 886–893.

[2] Staffa, G., Nataloni, A., Compagnone, C., and Servadei, F., 2007. Custom made cranioplasty prostheses in porous hydroxy-apatite using 3D design techniques: 7 years experience in 25 patients. *Acta Neurochirurgica*, **149**(2), 161–170.

[3] Hirata, A., Maruyama, Y., Onishi, K., Hayashi, A., Saze, M., and Okada, E., 2004. A Vascularized Artificial Bone Graft Using The Periosteal Flap And Porous Hydroxyapatite; Basic Research And Preliminary Clinical Application: s-iv-04. *Wound Repair and Regeneration*, **21**(1), A4.

[4] Venkatesan, J., & Kim, S. K. (2010). Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (*Thunnus obesus*) bone. *Materials*, **3**(10), 4761–4772.

[5] Venkatesan, J., Qian, Z. J., Ryu, B., Kumar, N. A., and Kim, S. K., 2011.

- Preparation and characterization of carbon nanotube-grafted-chitosan–natural hydroxyapatite composite for bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, **83**(2), 569–577.
- [6] Salman, S., Soundararajan, S., Safina, G., Satoh, I., and Danielsson, B., 2008. Hydroxyapatite as a novel reversible in situ adsorption matrix for enzyme thermistor-based FIA. *Talanta*, **77**(2), 490–493.
- [7] Reichert, J., and Binner, J. G. P., 1996. An evaluation of hydroxyapatite-based filters for removal of heavy metal ions from aqueous solutions. *Journal of Materials Science*, **31**(5), 1231–1241.
- [8] Kano, S., Yamazaki, A., Otsuka, R., Ohgaki, M., Akao, M., and Aoki, H., 1994. Application of hydroxyapatite-sol as drug carrier. *Bio-medical Materials and Engineering*, **4**(4), 283–290.
- [9] Nieh, T. G., Choi, B. W., and Jankowski, A. F., 2000. Synthesis and characterization of porous hydroxyapatite and hydroxyapatite coatings (No. UCRL-JC-141229). *Lawrence Livermore National Lab., CA (US)*.
- [10] Robinson, C., Connell, S., Kirkham, J., Shore, R., and Smith, A., 2004. Dental enamel—a biological ceramic: regular substructures in enamel hydroxyapatite crystals revealed by atomic force microscopy. *Journal of Materials Chemistry*, **14**(14), 2242–2248.
- [11] Viswanath, B., Raghavan, R., Gurao, N. P., Ramamurthy, U., and Ravishankar, N., 2008. Mechanical properties of tricalcium phosphate single crystals grown by molten salt synthesis. *Acta Biomaterialia*, **4**(5), 1448–1454.
- [12] Sanosh, K. P., Chu, M. C., Balakrishnan, A., Kim, T. N., and Cho, S. J., 2010. Sol-gel synthesis of pure nano sized  $\beta$ -tricalcium phosphate crystalline powders. *Current Applied Physics*, **10**(1), 68–71.
- [13] Roy, D. M., and Linnehan, S. K., 1974. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, **247**(5438), 220–222.
- [14] White, E., and Shors, E. C., 1986. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dental Clinics of North America*, **30**(1), 49–67.
- [15] Rocha, J. H. G., Lemos, A. F., Agathopoulos, S., Valério, P., Kannan, S., Oktar, F. N., and Ferreira, J. M. F., 2005. Scaffolds for bone restoration from cuttlefish. *Bone*, **37**(6), 850–857.
- [16] Rocha, J. H. G., Lemos, A. F., Kannan, S., Agathopoulos, S., and Ferreira, J. M. F., 2005. Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish bones. *Journal of Materials Chemistry*, **15**(47), 5007–5011.
- [17] Rocha, J. H. G., Lemos, A. F., Agathopoulos, S., Kannan, S., Valerio, P., and Ferreira, J. M. F., 2006. Hydrothermal growth of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*, **77**(1), 160–168.
- [18] Sarin, P., Lee, S. J., Apostolov, Z. D., and Kriven, W. M., 2011. Porous biphasic calcium phosphate scaffolds from cuttlefish bone. *Journal of the American Ceramic Society*, **94**(8), 2362–2370.
- [19] Lemos, A. F., Rocha, J. H. G., Quaresma, S. S. F., Kannan, S., Oktar, F. N., Agathopoulos, S., and Ferreira, J. M. F., 2006. Hydroxyapatite nano-powders produced hydrothermally from nacreous material. *Journal of the European Ceramic Society*, **26**(16), 3639–3646.
- [20] Zhang, X., and Vecchio, K. S., 2006. Creation of dense hydroxyapatite (synthetic bone) by hydrothermal conversion of seashells. *Materials Science and Engineering: C*, **26**(8), 1445–1450.
- [21] Yang, Y., Yao, Q., Pu, X., Hou, Z., and Zhang, Q., 2011. Biphasic calcium phosphate macroporous scaffolds derived from oyster shells for bone tissue engineering. *Chemical Engineering Journal*, **173**(3), 837–845.

- [22] Ikoma, T., Kobayashi, H., Tanaka, J., Walsh, D., and Mann, S., 2003. Microstructure, mechanical, and biomimetic properties of fish scales from *Pagrus major*. *Journal of Structural Biology*, **142**(3), 327–333.
- [23] Mondal, S., Mahata, S., Kundu, S., and Mondal, B., 2010. Processing of natural resourced hydroxyapatite ceramics from fish scale. *Advances in Applied Ceramics*, **109**(4), 234–239.
- [24] Huang, Y. C., Hsiao, P. C., and Chai, H. J., 2011. Hydroxyapatite extracted from fish scale: Effects on MG63 osteoblast-like cells. *Ceramics International*, **37**(6), 1825–1831.
- [25] Ozawa, M., and Suzuki, S., 2002. Microstructural development of natural hydroxyapatite originated from fish-bone waste through heat treatment. *Journal of the American Ceramic Society*, **85**(5), 1315–1317.
- [26] Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., De Carlos, A., and León, B., 2012. Biological hydroxyapatite obtained from fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, **32**(3), 478–486.
- [27] Piccirillo, C., Silva, M. F., Pullar, R. C., da Cruz, I. B., Jorge, R., Pintado, M. M. E., and Castro, P. M., 2013. Extraction and characterisation of apatite-and tricalcium phosphate-based materials from cod fish bones. *Materials Science and Engineering: C*, **33**(1), 103–110.
- [28] Venkatesan, J., Lowe, B., Manivasagan, P., Kang, K. H., Chalisserry, E., Anil, S., ... and Kim, S. K., 2015. Isolation and characterization of nano-hydroxyapatite from salmon fish bone. *Materials*, **8**(8), 5426–5439.
- [29] Đào Quốc Hương, Phan Thị Ngọc Bích, 2007. Tổng hợp bột hydroxyapatit kích thước nano bằng phương pháp kết tủa hoá học. *Tạp chí Hoá học*, **45**(2), 147–151.
- [30] Vũ Duy Hiền, Đào Quốc Hương, Phan Thị Ngọc Bích, 2008. Nghiên cứu chế tạo gốm hydroxyapatit từ khung xốp tự nhiên của mai mực bằng phản ứng thủy nhiệt. *Tạp chí Hoá học*, **46**(2A), 118–123.
- [31] Hien, V. D., Huong, D. Q., and Bich, P. T. N., 2010. Study of the formation of porous hydroxyapatite ceramics from corals via hydrothermal process. *Vietnam Journal of Chemistry*, **48**(5), 591–596.
- [32] Đoàn Bộ, Bùi Thanh Hùng, Nguyễn Văn Hường, 2015. Dự báo khai thác năm 2015 nguồn lợi cá ngừ vằn ở vùng biển xa bờ miền Trung. *Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ*, **31**(3S), 14–19.
- [33] Coelho, T. M., Nogueira, E. S., Steimacher, A., Medina, A. N., Weinand, W. R., Lima, W. M., ... and Bento, A. C., 2006. Characterization of natural nanostructured hydroxyapatite obtained from the bones of Brazilian river fish. *Journal of applied physics*, **100**(9), 094312.
- [34] Paz, A., Guadarrama, D., López, M., E González, J., Brizuela, N., and Aragón, J., 2012. A comparative study of hydroxyapatite nanoparticles synthesized by different routes. *Química Nova*, **35**(9), 1724–1727.
- [35] Ślósarczyk, A., Paszkiewicz, Z., and Paluszkiwicz, C., 2005. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *Journal of Molecular Structure*, **744**, 657–661.
- [36] Ji, G., Zhu, H., Jiang, X., Qi, C., and Zhang, X. M., 2009. Mechanical strengths of epoxy resin composites reinforced by calcined pearl shell powders. *Journal of Applied Polymer Science*, **114**(5), 3168–3176.
- [37] Berzina-Cimdina, L., and Borodajenko, N., 2012. Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy. In *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology. IntechOpen*.
- [38] Tavares, D. D. S., Castro, L. D. O., Soares, G. D. D. A., Alves, G. G., and Granjeiro, J. M., 2013. Synthesis and cytotoxicity evaluation of granular magnesium substituted  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Journal of Applied Oral Science*, **21**(1), 37–42.

- [39] Anand, G., Pandey, J. K., and Rana, S. (Eds.), 2017. Nanotechnology for Energy and Water: Proceedings of the International Conference NEW-2017. Springer.
- [40] De Groot, K., 1983. Bioceramics of calcium phosphate. *Ceramic of calcium phosphate: Preparation and properties*, 100–114.
- [41] Muralithran, G., and Ramesh, S., 2000. The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite. *Ceramics International*, **26**(2), 221–230.

## CERTAIN PROPERTIES OF CALCIUM HYDROXYAPATITE FROM SKIPJACK TUNA BONE (*Katsuwonus pelamis*)

**Le Ho Khanh Hy, Pham Xuan Ky, Dao Viet Ha, Nguyen Thu Hong,  
Phan Bao Vy, Doan Thi Thiet, Nguyen Phuong Anh**

*Institute of Oceanography, VAST, Vietnam*

**Abstract.** This paper is concerned with certain properties of calcium hydroxyapatite from skipjack tuna bone (*Katsuwonus pelamis*) which are by-products of fish export industry. Hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  and  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , the high-value compounds, have been successfully extracted from skipjack tuna bones. The bones were heated at different temperatures of 600°C, 900°C, 1200°C. While at 600°C hydroxyapatites were obtained with Ca/P ratio of 1.658, comparable to the value of 1.67 found in human bone; the hydroxyapatite crystals of average size of 0.25  $\mu\text{m}$  were formed with the same size distribution. In case of heated bone samples at 900°C and 1200°C, the calcium formed were biphasic calcium phosphate composed of hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate; the Ca/P ratio was between 1.660–1.665; the calcium crystals of more than 1  $\mu\text{m}$  were highly porous and connected to each other in priority orientation of tube direction.

**Keywords:** Bone, skipjack tuna bone, *Katsuwonus pelamis*, 600°C, 900°C, 1200°C, hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ,  $\beta$ -tricalcium phosphate  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .