

Certain properties of nanohydroxyapatite obtained from *Lates calcarifer* fish bone

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

Institute of Oceanography, VAST, Vietnam

*E-mail: lehokhanhhy@gmail.com

Received: 28 August 2020; Accepted: 26 October 2020

©2020 Vietnam Academy of Science and Technology (VAST)

Abstract

Fish bone by-products are considered as abundant source of hydroxyapatite (HAp). The preparation of HAp from fish bones not only contributes to improving the value of by-products but also minimizes negative impacts on the environment. In this study, nanohydroxyapatite was successfully obtained from *Lates calcarifer* fish bone purchased from seafood export company in Khanh Hoa province. Fish bones were under alkali treatment and then heated at 600°C within different time intervals of 1, 2 and 4 hours. Analysis of XRD and SEM showed that the calcium formed was completely single-phase and possessed an average size of 50–64 nm depending on the calcination time. The results of the Ca/P molar ratio from 1.839 to 1.847 prove that the nano-HAp powders are B-type biological hydroxyapatites, which has been confirmed by FTIR spectrum. In addition, the content of heavy metals such as As, Pb, Hg, Cd is detected within safety limits. These properties allow nano-HAp powders to be applied in food and medicine fields.

Keywords: Bone, *Lates calcarifer* fish, 600°C, 1, 2, 4 hours, nanohydroxyapatite, B-type biological hydroxyapatites.

Một số đặc tính hóa lý của nano hydroxyapatite thu nhận từ xương cá chêm *Lates calcarifer*

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

Viện Hải dương học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Việt Nam

*E-mail: lehokhanhhy@gmail.com

Nhận bài: 28-8-2020; Chấp nhận đăng: 26-10-2020

Tóm tắt

Phụ phẩm xương cá là nguồn thu nhận hydroxyapatite (HAp) khá dồi dào. Việc điều chế HAp từ xương cá không những góp phần nâng cao giá trị phụ phẩm mà còn giảm thiểu tác động tiêu cực đến môi trường. Trong nghiên cứu này, nano hydroxyapatite được thu nhận thành công từ xương cá chêm *Lates calcarifer* thu mua từ công ty xuất khẩu thủy hải sản ở Khánh Hòa. Xương cá được xử lý kiềm và sau đó được nung ở 600°C trong các khoảng thời gian khác nhau là 1, 2 và 4 giờ. Phân tích XRD và SEM cho thấy dạng canxi thu nhận được hoàn toàn đơn pha, có kích thước nano trung bình từ 50–64 nm tùy theo thời gian nung. Kết quả về chỉ số mol Ca/P từ 1,839–1,847 chứng tỏ bột canxi này là hydroxyapatite dạng B sinh học và đã được xác nhận bởi phổ FTIR. Thêm vào đó, hàm lượng của các kim loại nặng như As, Pb, Hg, Cd được phát hiện trong giới hạn an toàn. Những tính chất này cho phép bột nano HAp có thể được ứng dụng trong lĩnh vực thực phẩm và y dược.

Từ khóa: Xương, cá chêm *Lates calcarifer*, 600°C, 1, 2, 4 giờ, nano hydroxyapatite, hydroxyapatite dạng B sinh học.

GIỚI THIỆU

Canxi hydroxyapatite còn được gọi là hydroxyapatite (HAp) là một dạng canxi phosphat tự nhiên có tính tương thích sinh học cao với tế bào và mô [1]. HAp có công thức hoá học $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, là thành phần chính trong xương và răng người và động vật, trong xương chiếm đến 60–70% khối lượng [2] và trong răng chiếm 97% [3]. HAp có tỷ lệ Ca/P giống như tỷ lệ Ca/P tự nhiên trong xương và răng (Ca/P = 1,67) [4, 5]. Nhờ vào các tính chất quý giá trên, HAp ở dạng bột mịn, siêu mịn, dạng xốp, dạng màng đã và đang được nghiên cứu nhằm mở rộng khả năng ứng dụng của chúng. Các ứng dụng phải kể đến của HAp là: thực phẩm chức năng bổ sung canxi [6]; làm vật liệu phẫu thuật dùng trong cấy ghép xương

và răng [4, 7, 8]; khiếm khuyết sọ [9]; ứng dụng làm vật liệu hấp thụ [10].

HAp có thể được thu nhận từ 2 cách chính (1) Tổng hợp nhân tạo từ các hợp chất có chứa canxi và phospho [6]; và (2) Thu nhận từ các nguồn tự nhiên như san hô [11–13], nang mực [14–18], vỏ các loài động vật như sò, hào, ốc [19–23], vỏ trứng [24, 25], vảy cá [26–29], xương bò [30, 31], xương cá [32–35]. Đối với các sản phẩm HAp được điều chế theo phương pháp tổng hợp, tuy HAp thu được có nhiều hình dạng kích thước khác nhau tùy theo điều kiện phản ứng nhưng lại đòi hỏi các bước tinh chế để loại bỏ các sản phẩm phụ nhằm tránh ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm cũng như có thể có tác hại với đối tượng sử dụng [36]. Trong khi đó, HAp được chiết xuất từ các

nguồn tự nhiên lại có độ tinh khiết và độ tương thích sinh học cao, do đó có thể thay thế cho nguồn HAp nhân tạo.

Trong những năm gần đây, mỗi năm có đến hàng triệu tấn cá được đánh bắt để đáp ứng nhu cầu tiêu dùng của con người nhưng chỉ có 50–60% tổng sản lượng khai thác được sử dụng, phần còn lại bị loại bỏ [33]. Đi kèm với sự gia tăng các sản phẩm thủy sản góp phần phát triển kinh tế, công nghiệp chế biến thủy sản thải ra một số lượng lớn các loại phụ phẩm và phế phẩm; nếu không được xử lý kỹ sẽ là thách thức lớn với môi trường. Tuy nhiên, các phụ phẩm và phế phẩm này là nguồn nguyên liệu để tách chiết các hợp chất có giá trị, phục vụ đời sống con người. Chính vì điều đó, xương nhiều loài cá đã được sử dụng để tách HAp bằng các phương pháp khác nhau như: cá kiếm (*Xiphia gladius*) và cá ngừ (*Thunnus thynnus*) [33], cá tuyết Atlantic (*Gadus morhua*) [34], cá tráp biển Nhật Bản [33], cá hồi [37], cá mú [38], cá rô phi [39], cá ngừ vằn (*Katsuwonus pelamis*) [40]...

Tại Việt Nam hiện nay, cá chêm đang được nuôi với 2 hình thức chính là nuôi địa và nuôi lồng trên biển. Cá chêm được nuôi phân bố dọc theo bờ biển các tỉnh, thành phố như Quảng Ninh, Hải Phòng, Thừa Thiên-Huế, Quảng Nam, Đà Nẵng, Bình Định, Khánh Hòa, Bình Thuận, Bà Rịa-Vũng Tàu và quần đảo Trường Sa (Nguồn báo Thủy sản Việt Nam, 2018). Tổng sản lượng ước đạt năm 2014 với hình thức nuôi địa là 2.207 tấn và nuôi lồng là 2.175 tấn, fillet đang được xuất đi các thị trường Hoa Kỳ, Châu Âu, Đài Loan và Hàn Quốc (Nguồn báo Liên hiệp các hội khoa học kỹ thuật tỉnh Khánh Hòa, 2014). Với sản lượng cá chêm cao, lượng phụ phẩm xương cá là nguồn thu nhận HAp khá dồi dào.

Năm 2017, từ xương cá ngừ vằn *Katsuwonus pelamis*, sau khi khảo sát nung ở các nhiệt độ khác nhau 600, 900 và 1.200°C trong 9 giờ, chúng tôi nhận thấy khi nung ở 600°C, HAp được chiết xuất thành công với tỉ lệ Ca/P 1,658 gần với tỉ lệ Ca/P 1,67 trong xương người; các tinh thể HAp có kích thước nano trung bình 250 nm và có sự phân bố kích thước tương đối đồng đều [41]. Do đó, trong

nguyên cứu này, từ phế phẩm xương cá chêm *Lates calcarifer*, chúng tôi sử dụng phương pháp gia nhiệt ở 600°C trong những khoảng thời gian khác nhau 1, 2, 4 giờ để nghiên cứu điều chế HAp ở kích thước nano và khảo sát một số tính chất hóa lý của bột nano HAp này.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Xương cá chêm *Lates calcarifer* sau khi fillet và cắt bỏ đầu được thu mua tại công ty TNHH T và H (Vinh Phương, thành phố Nha Trang, tỉnh Khánh Hòa) vào tháng 1/2020. Xương cá sau đó được rửa sạch, bảo quản bằng đá lạnh, vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tiếp theo, xương cá chêm được đun sôi trong 1 giờ để loại sạch phần mô mềm còn sót lại, lọc rửa bằng nước sạch nhiều lần để loại bỏ phần cơ còn sót, quá trình đun sôi lọc rửa này được lặp lại cho đến khi xương trắng. Xương sau đó được phơi khô ở nhiệt độ phòng đến khối lượng không đổi.

Xương cá chêm được xử lý kiềm theo Venkatesan et al., (2015) [38] với một số thay đổi nhỏ. Cụ thể, xương được đun sôi với acetone (tỉ lệ 1:50 trong nước) và 2% NaOH trong 1 giờ để loại bỏ protein, lipid, dầu và các tạp chất hữu cơ khác còn bám dính (tỉ lệ xương và dung dịch lỏng là 1:50). Sau đó, xương được lọc rửa với nước, tiếp tục thay nước nhiều lần sao cho pH nước trở về trung tính. Tiếp theo xương được sấy ở 60°C đến khối lượng không đổi (24 giờ), nghiền nhỏ bằng chày và cối, trộn đều để chuẩn bị cho các thí nghiệm tiếp theo.

Phương pháp nghiên cứu

Bố trí thí nghiệm điều chế hydroxyapatite từ xương cá chêm

Mẫu xương cá sau khi được xử lý như trên được nung ở nhiệt độ 600°C trong vòng 1, 2, 4 giờ (máy gia nhiệt Nabertherm GmbH); ở mỗi khoảng thời gian khác nhau, 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 đặc điểm hóa lý của hydroxyapatite từ xương cá chêm.

Phương pháp xác định các đặc tính hóa lý chủ yếu của hydroxyapatite ở các nhiệt độ khác nhau

Mẫu xương cá sau khi nung được phân tích bằng phổ nhiễu xạ tia X (XRD) (máy D2 Phaser -Brucker), phổ hấp thụ hồng ngoại (FTIR) (máy Bruker Equinox 55), từ đó cho phép xác định đơn pha hydroxyapatite chiết xuất từ xương cá chêm [33]. Phân tích được thực hiện tại Chi Cục Kiểm Định Hải Quan 3, thành phố Hồ Chí Minh.

Xác định hình dạng và kích thước của tinh thể hydroxyapatite bằng cách sử dụng kính hiển vi điện tử SEM (máy SEM Hitachi S-4800) [41]. Kích thước trung bình tinh thể canxi thể hiện bằng giá trị trung bình \pm SE, được tính toán dựa vào phần mềm ImageJ 1.48V với thanh thước tỉ lệ trong hình chụp. Phân tích được thực hiện tại Trung tâm Nghiên cứu triển khai Khu Công nghệ cao, thành phố Hồ Chí Minh.

Xác định hàm lượng các kim loại nặng (mg/kg) như Pb, Hg, Cd, As và hàm lượng % nguyên tố canxi và phospho bằng phương pháp đo quang phổ phát xạ (máy Agilent 7700x-LC-MS). Phân tích này được thực hiện tại Trung tâm Dịch vụ Phân tích Thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hình ảnh bột hydroxyapatite được điều chế

Hình 1 mô tả hình dạng ngoài của phụ phẩm xương cá chêm *Lates calcarifer* ban đầu (a); xương trắng sau khi được loại sạch mô mềm (b) và bột canxi hydroxyapatit sau khi nung ở 600°C trong khoảng thời gian khác nhau (1, 2, 4 giờ) (c). Hình 1c cho thấy bột nguyên liệu trước khi nung khá mịn, màu trắng, sáng; trong khi đó bột canxi hydroxyapatite hình thành ở 600°C trong các khoảng thời gian khác nhau có màu trắng đục hơn, mịn, không mùi không vị và khi được nung lâu hơn, bột canxi có màu trắng sáng hơn.



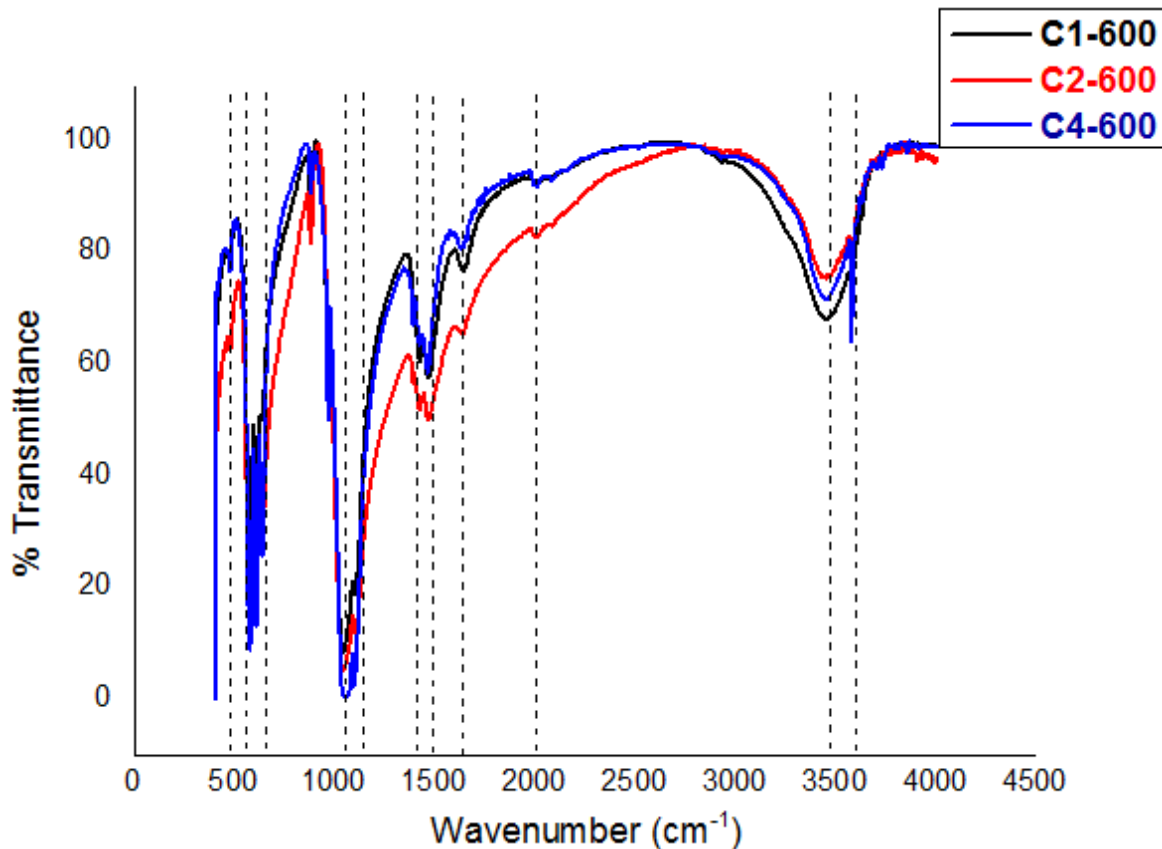
Hình 1. a) Phụ phẩm xương cá chêm *Lates calcarifer*; b) Xương trắng loại sạch phần mô mềm; c) Bột nguyên liệu xương cá và các mẫu bột canxi sau khi nung ở 600°C trong khoảng thời gian khác nhau (1, 2, 4 giờ)

Các dạng canxi hydroxyapatite hình thành ở khoảng thời gian khác nhau

Phổ hồng ngoại FTIR

Phổ hồng ngoại của các mẫu canxi được hình thành ở 600°C trong các khoảng thời gian khác nhau (1, 2, 4 giờ) được thể hiện trong hình 2 và bảng 1. Tất cả các phổ hồng ngoại

này đều thể hiện nét tương đồng ở các đỉnh hấp thụ của các nhóm chức khác nhau của HAP $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ là PO_3^{4-} và OH. Kết quả thu được này tương tự với các nghiên cứu trước đây trên xương cá kiếm (*Xiphia gladius*), cá ngừ (*Thunnus thynnus*) [33] và trên xương cá hồi [38].



Hình 2. Phổ hồng ngoại của hydroxyapatite hình thành ở 600°C trong khoảng thời gian khác nhau (màu đen: C1-600 là mẫu nung ở 600°C trong 1 giờ; màu đỏ: C2-600 là mẫu nung ở 600°C trong 2 giờ; màu xanh: C4-600 là mẫu nung ở 600°C trong 4 giờ)

Cụ thể đối với phổ hồng ngoại của mẫu nung ở 600°C trong 1 giờ (tương tự với phổ hồng ngoại của các mẫu ở 600°C trong 2 và 4 giờ), phổ hiển thị các đỉnh hấp thụ đặc trưng cho nhóm PO_3^{4-} bao gồm ba vùng chính: Vùng 1 bao gồm dao động cơ giãn ν_3 và ν_1 , vùng 2 và 3 tương ứng với dao động uốn ν_2 và ν_4 . Cụ thể, vùng đầu tiên thể hiện các đỉnh 1.094, 1.034 cm^{-1} , tương trưng cho dao động cơ giãn ν_3 và đỉnh hấp thụ ở 962 cm^{-1} tương ứng với dao động cơ giãn ν_1 . Vùng thứ hai của ion

phosphat thể hiện dao động uốn ν_4 với các đỉnh được xác định rõ ở 633, 602 và 571 cm^{-1} . Vùng thứ ba được quan sát thấy đỉnh hấp thụ yếu ở 473 cm^{-1} tương ứng với chế độ uốn ν_2 .

Đối với nhóm chức OH, dao động giãn được thể hiện tại hai bước sóng 3.451 và 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 2.933 cm^{-1} . Tuy nhiên, đỉnh này chỉ xuất hiện ở mẫu nung ở 600°C trong 1 h, đối với các mẫu nung khác ở

600°C (phổ IR C2-600 và C4-600), đỉnh này không xuất hiện chứng tỏ thời gian nung 2 và 4 giờ là khoảng thời gian đủ để các cơ còn sót lại trong xương cá phân hủy và biến mất. Ngoài các đỉnh hấp thụ chính của các nhóm chức hiện diện trong cấu trúc của hydroxyapatite, trong

phổ của các mẫu còn xuất hiện các đỉnh của nhóm chức carbonate: đỉnh từ 1.418 đến 1.460 cm^{-1} và đỉnh ở 874, 2.004 cm^{-1} . Sự hấp thụ CO_2 trong khí quyển trong thời gian thực hiện thí nghiệm là nguyên nhân dẫn đến sự hình thành ion carbonate [42].

Bảng 1. So sánh phổ hồng ngoại của hydroxyapatite hình thành ở 600°C trong khoảng thời gian khác nhau

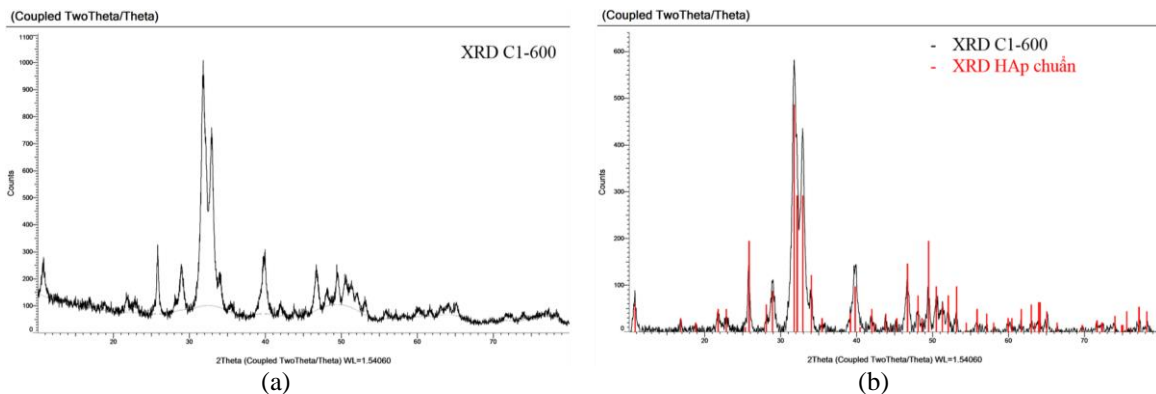
Hydroxyapatite		1 giờ	2 giờ	4 giờ
		Số sóng (cm^{-1})		
PO_3^{4-}	v3	1094, 1034	1091, 1050	1090, 1035
	v1	962	962	962
	v4	633, 602, 571	633, 601, 569	634, 603, 569
	v2	473	472	474
OH		3451, 3571	3447, 3572	3449, 3572
		1418 → 1460	1416 → 1462	1418 → 1457
CO_3^{2-}		874	875	873
		2004	2010	2004
C-H		2933	X	X

Giản đồ nhiễu xạ tia X

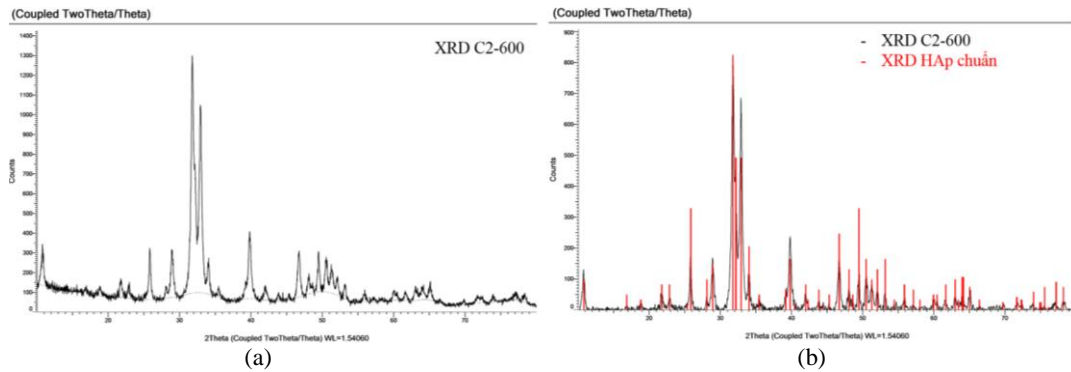
Hình 3 đến hình 6 thể hiện giản đồ nhiễu xạ tia X của các mẫu, trong đó hình 3–5 trình bày kết quả từng phổ của các mẫu ở 600°C trong 3 khoảng thời gian khác nhau 1, 2, 4 giờ và so sánh với giản đồ chuẩn của hydroxyapatite tổng hợp HAp $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (International Centre for Diffraction Data ICDD 00-009-0432). Theo đó, khi so sánh giản đồ của các mẫu ở 600°C trong các khoảng thời gian khác nhau với giản đồ chuẩn của HAp, mẫu canxi này chỉ có một pha HAp với các đỉnh được xác định rõ ràng,

hoàn toàn trùng khớp với giản đồ chuẩn và các nghiên cứu trước đây [33, 43, 44].

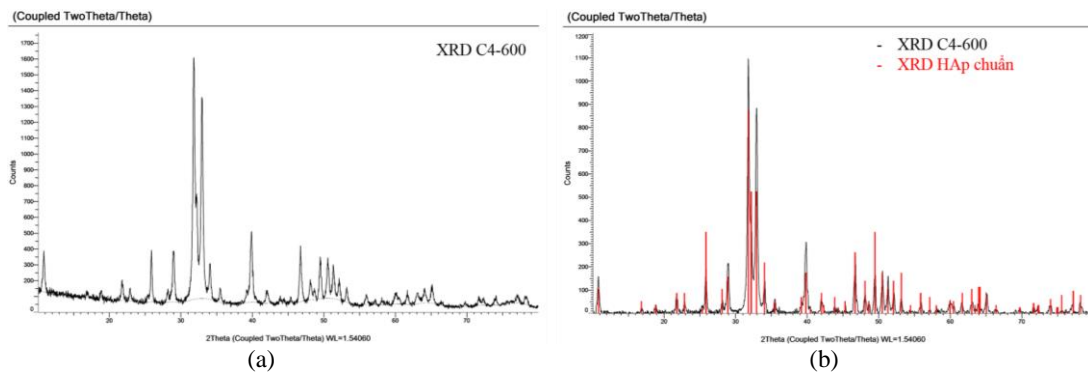
Hình 6 cho thấy được ảnh hưởng của thời gian đối với sự hình thành và phát triển cấu trúc của tinh thể HAp ở 600°C. Qua đó cho thấy, mức độ tinh thể HAp trong 2 mẫu nung ở 2 và 4 giờ cao hơn trong mẫu 1 giờ và có khuynh hướng tăng dần khi tăng thêm thời gian nung xử lý mẫu bột xương thô ban đầu; điều này thể hiện ở các đỉnh nhiễu xạ trong giản đồ XRD của mẫu C2-600 có cường độ đỉnh mạnh hơn so với mẫu C1-600 và thấp hơn C4-600.



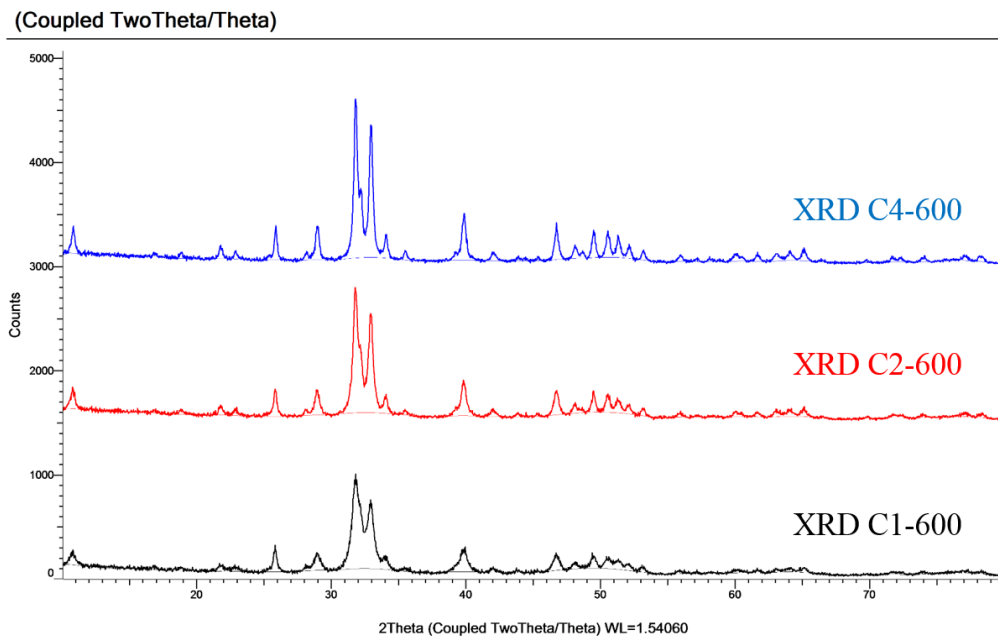
Hình 3. a) Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu canxi ở 600°C nung trong 1 giờ; b) Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu ở 600°C nung trong 1 h so sánh với giản đồ chuẩn của HAp $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$



Hình 4. a) Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu canxi ở 600°C nung trong 2 giờ; b) Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu ở 600°C nung trong 2 h so sánh với giản đồ chuẩn của HAp $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$



Hình 5. a) Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu canxi ở 600°C nung trong 4 giờ; b) Giản đồ nhiễu xạ tia X của mẫu ở 600°C nung trong 4 h so sánh với giản đồ chuẩn của HAp $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$



Hình 6. So sánh các giản đồ nhiễu xạ tia X của các mẫu nung ở 600°C trong 1, 2 và 4 giờ

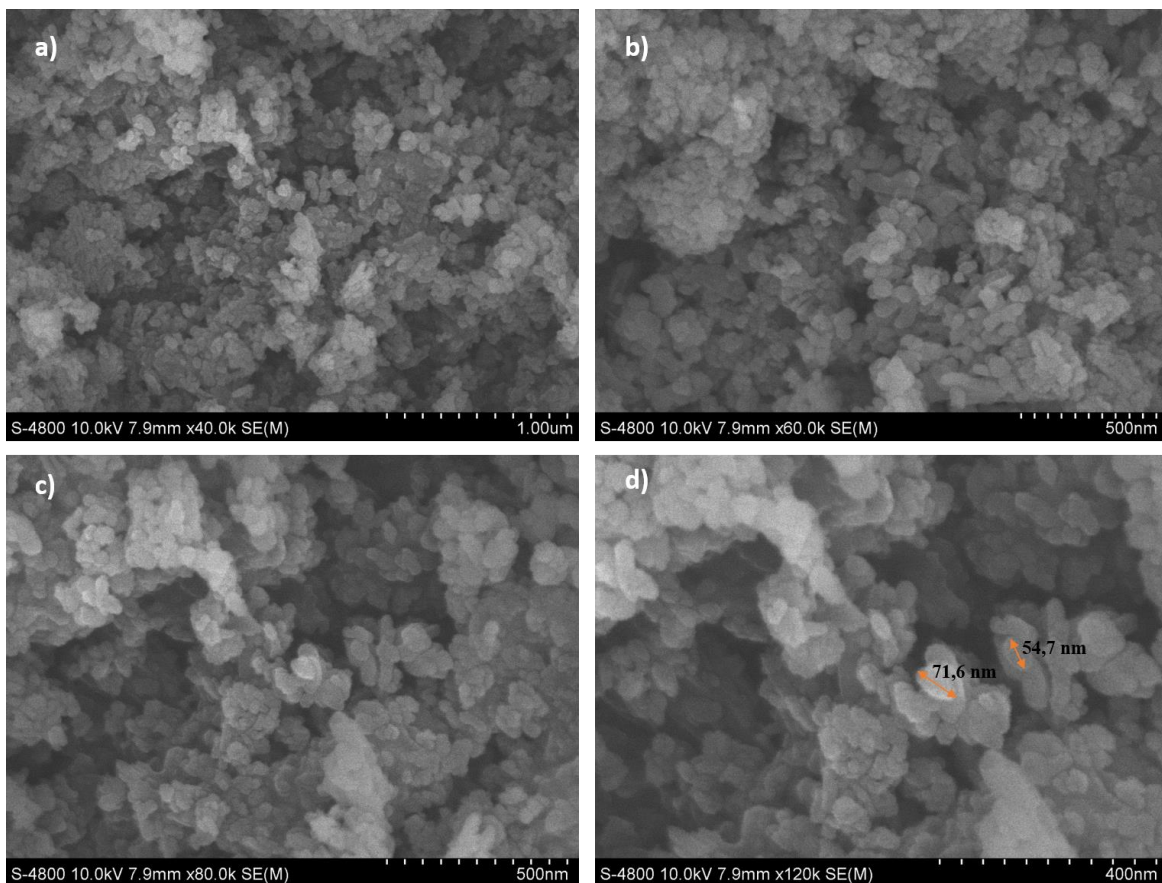
Kích thước tinh thể dưới kính hiển vi điện tử quét trong các khoảng thời gian khác nhau

Hình 7 là hình ảnh kính hiển vi điện tử quét của HAp hình thành ở 600°C trong 1 giờ. Hình ảnh SEM ở các vị trí khác nhau và độ phóng đại khác nhau cho thấy các hạt tinh thể hydroxyapatite HAp có hình dạng cầu oval khá giống nhau, phân bố với kích thước tương đối đồng đều (30–70 nm). Kích thước trung bình của các tinh thể là $49,71 \pm 21,15$ nm (dựa vào phần mềm ImageJ trên đường kính và chiều dài tinh thể).

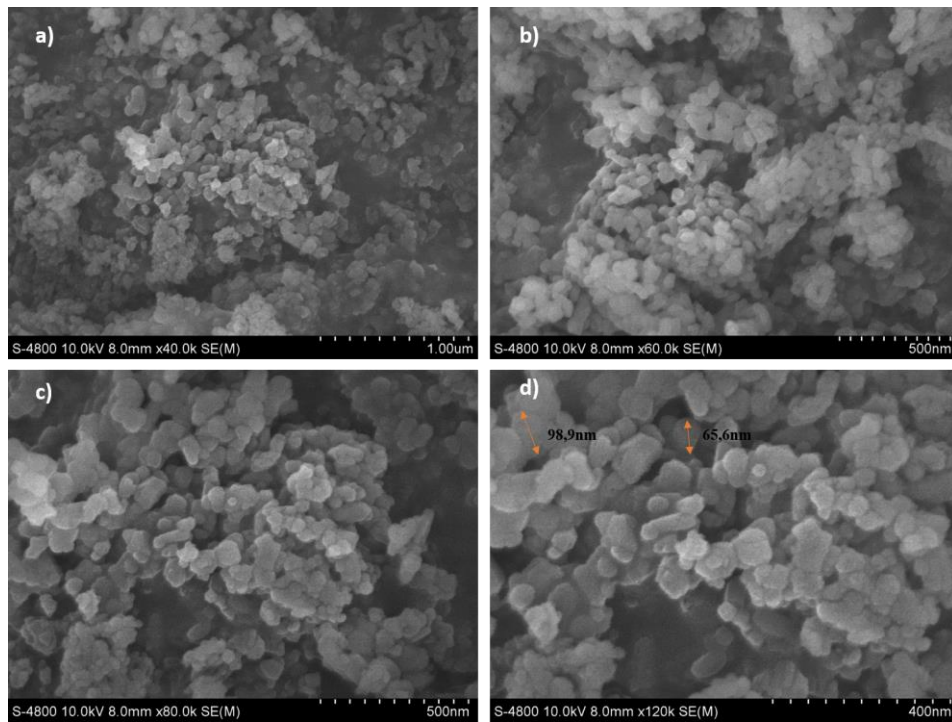
Hình 8 và hình 9 thể hiện ảnh chụp của các mẫu HAp ở 600°C trong 2 và 4 giờ với các độ phóng đại khác nhau; ở đây quan sát thấy các tinh thể canxi thể hiện xu hướng kết dính

nhau và có nhiều hình dạng có cấu trúc hỗn độn, chủ yếu là hình chữ nhật và hình que. Kết quả này cho thấy thời gian nung có ảnh hưởng rất lớn đến hình dạng và kích thước của HAp. Khi nung với thời gian 2 giờ, các hạt nano HAp có kích thước trung bình $56,30 \pm 17,17$ nm. Khi nung lâu hơn nữa (4 giờ) thì các hạt nano HAp thu được lại có sự kết dính với nhau dẫn đến mẫu canxi có kích thước lớn hơn ($64,33 \pm 24,36$ nm) và không đồng đều về kích thước.

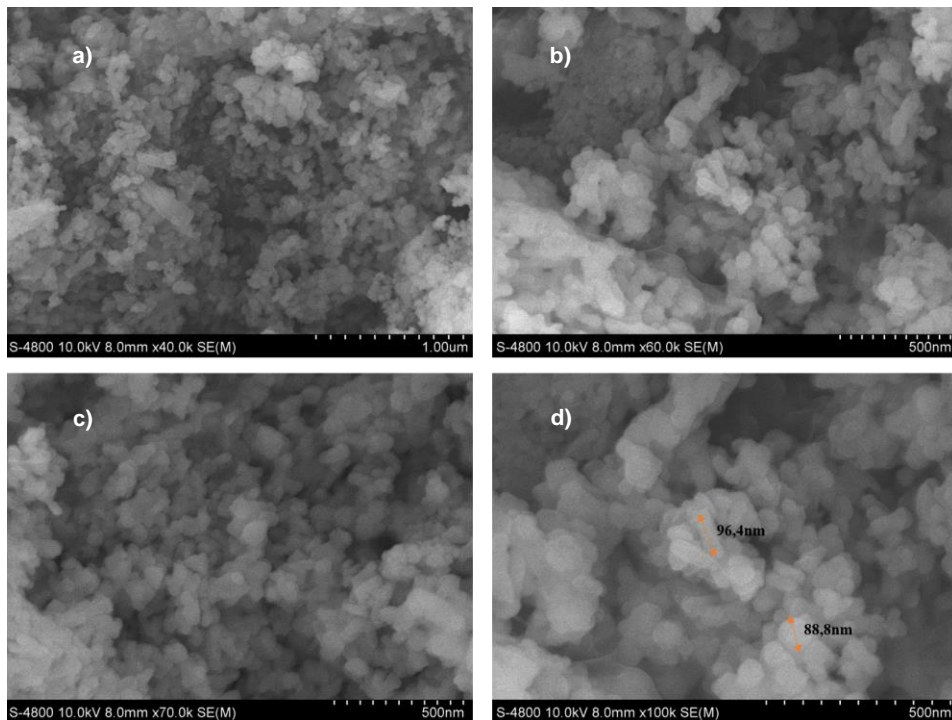
Kết quả này cũng hoàn toàn tương đồng với kết quả XRD thu được của các mẫu ở trên, thể hiện mức độ tinh thể tăng theo thời gian nung dẫn đến kích thước hạt canxi nano hình thành lớn hơn.



Hình 7. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của HAp ở 600°C trong 1 giờ ở các độ phóng đại khác nhau: a) 7,9 mm × 40,0k; b) 7,9 mm × 60,0k; c) 7,9 mm × 80,0k; d) 7,9 mm × 120k



Hình 8. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của HAP ở 600°C trong 2 giờ ở các độ phóng đại khác nhau: a) 8,0 mm × 40,0k; b) 8,0 mm × 60,0k; c) 8,0 mm × 80,0 k; d) 8,0 mm × 120k



Hình 9. Hình ảnh chụp bằng kính hiển vi điện tử quét của HAP ở 600°C trong 4 giờ ở các độ phóng đại khác nhau: a) 8,0 mm × 40,0k; b) 8,0 mm × 60,0k; c) 8,0 mm × 70,0k; d) 8,0 mm × 100k

Hàm lượng các nguyên tố

Bảng 2 thể hiện kết quả hàm lượng các kim loại nặng As, Pb, Hg, Cd (mg/kg) và hàm lượng nguyên tố canxi và phospho (%) trong các mẫu HAp hình thành ở 600°C trong 1, 2, 4 giờ 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 1,839–1,847 và giá trị mol này cao hơn tỉ lệ mol Ca/P của HAp và xương người (1,67). Kết quả này là do sự xuất hiện của các ion carbonate thay thế phosphate, cho thấy sự hiện diện của

hydroxyapatite loại B. Loại HAp này là một dạng của apatite sinh học [45]. Các tác giả khác cũng đã quan sát thấy tỷ lệ Ca/P cao hơn trong HAp sinh học thu nhận từ xương cá kiếm (*Xiphia gladius*), cá ngừ (*Thunnus thynnus*) [33] và xương bò [46]. Sự thay thế các ion carbonate cho phosphate rất quan trọng, vì HAp có carbonate có thể gắn kết dễ dàng với tế bào sống và có khả năng hòa tan cao hơn HAp có chỉ số Ca/P 1,67 [47, 48]. Thêm vào đó, sự hiện diện ion carbonate của HAp loại B trong xương cá chêm đã được xác nhận bởi phổ FTIR.

Bảng 2. Hàm lượng các kim loại nặng As, Pb, Hg, Cd (mg/kg) và hàm lượng nguyên tố canxi và phospho (%) trong các mẫu HAp hình thành ở 600°C trong 1, 2, 4 giờ

Mẫu	Hàm lượng						Tỉ lệ mol Ca/P
	As (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Hg (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Ca (%)	P (%)	
C1-600	0,16	0,08	kph	kph	37,5	15,8	1,839
C2-600	0,18	0,20	kph	kph	38,2	16,1	1,839
C4-600	0,17	0,27	kph	kph	38,6	16,2	1,847

Ghi chú: kph: Không phát hiện; Ngưỡng phát hiện của phương pháp cho Cd là 0,02 mg/kg; Ngưỡng phát hiện của phương pháp cho Hg là 0,01 mg/kg.

Trong khi đó, các chỉ số kim loại nặng trong các mẫu này hoàn toàn đáp ứng Quy chuẩn Việt Nam về giới hạn ô nhiễm hàm lượng kim loại nặng trong thực phẩm bổ sung (QCVN 8-2/2011). Quy chuẩn này quy định mức giới hạn an toàn cho phép đối với các kim loại nặng ô nhiễm trong thực phẩm nói chung, thực phẩm bổ sung nói riêng và các yêu cầu quản lý có liên quan. Cụ thể, không phát hiện được Cd và Hg trong cả ba mẫu (yêu cầu Cd ≤ 1 mg/kg và Hg ≤ 0,1 mg/kg theo quy chuẩn); hàm lượng Pb ở các mẫu chỉ từ 0,08–0,27 mg/kg (yêu cầu Pb ≤ 3 mg/kg theo quy chuẩn). Về As, hàm lượng từ 0,16–0,18 mg/kg hiện diện trong các mẫu hoàn toàn nằm trong giới hạn an toàn nhỏ hơn 5 mg/kg (yêu cầu đối với thực phẩm chức năng Quyết định số 46/2007/QĐ-BYT).

Kết quả về chỉ số mol Ca/P và giá trị an toàn trong giới hạn của các kim loại nặng như As, Pb, Hg, Cd cho phép bột nano HAp có thể được sử dụng như nguyên liệu đầu vào trong thực phẩm bổ sung và thực phẩm chức năng. Sản phẩm cần có thêm các bước đánh giá độ an toàn thông qua độc tính cấp và độc tính bán trường diễn để có thể tiếp tục đưa ra quy trình

sản xuất ứng dụng trong y học và thực phẩm chức năng.

KẾT LUẬN

Nano hydroxyapatite đã được chiết xuất thành công từ xương cá chêm *Lates calcarifer* thông qua phương pháp gia nhiệt. Bột nano HAp thu được hoàn toàn đơn pha khi nung ở 600°C trong 1, 2 và 4 giờ, kích thước hạt nhỏ nhất khi nung với thời gian ít nhất 1 h (trung bình 50 nm) và gia tăng lên 56–64 nm khi nung lâu hơn. Hơn nữa, tỉ lệ Ca/P dao động từ 1,839–1,847 chứng tỏ bột canxi này là hydroxyapatite dạng B sinh học. Thêm vào đó, hàm lượng kim loại nặng của bột canxi hoàn toàn trong giới hạn cho phép của các quy chuẩn Việt Nam về thực phẩm. Đó là những tính chất hóa lý tốt để ứng dụng sản phẩm trong y học và thực phẩm.

Lời cảm ơn: Chúng tôi xin cảm ơn ông Đoàn Văn Thân, phòng Kỹ thuật nuôi Bảo tàng, Viện Hải dương học đã giúp đỡ trong quá trình tiền xử lý phế phẩm xương cá chêm. Bài báo sử dụng số liệu của đề tài mã số ĐT-2019-40699-ĐL1 do Sở Khoa học và Công nghệ Khánh Hòa cung cấp kinh phí.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] 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. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2011.01.018>.
- [2] 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)*.
- [3] 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. <https://doi.org/10.1039/B401154F>.
- [4] 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31360>.
- [5] 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. <https://doi.org/10.1007/s00701-006-1078-9>.
- [6] 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. Doi: 10.3233/BME-1994-4404.
- [7] 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).
- [8] Venkatesan, J., and Kim, S. K., 2010. Effect of temperature on isolation and characterization of hydroxyapatite from tuna (*Thunnus obesus*) bone. *Materials*, 3(10), 4761–4772. <https://doi.org/10.3390/ma3104761>.
- [9] 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. <https://doi.org/10.1007/BF00353102>.
- [10] Roy, D. M., and Linnehan, S. K., 1974. Hydroxyapatite formed from coral skeletal carbonate by hydrothermal exchange. *Nature*, 247(5438), 220–222. Doi: 10.1038/247220a0.
- [11] White, E., and Shors, E. C., 1986. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dental Clinics of North America*, 30(1), 49–67.
- [12] Vu Duy Hien, Dao Quoc Huong, Phan Thi Ngoc Bich., 2010. Study of the formation of porous hydroxyapatite ceramics from corals via hydrothermal process. *Vietnam Journal of Chemistry*, 48(5), 591–596.
- [13] 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. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.06.018>.
- [14] 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. <https://doi.org/10.1039/B510122K>.
- [15] 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. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30566>.
- [16] 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. <https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2011.04404.x>.
- [17] Venkatesan, J., Rekha, P. D., Anil, S., Bhatnagar, I., Sudha, P. N., Dechsakulwatana, C., ... and Shim, M. S., 2018. Hydroxyapatite from cuttlefish bone: Isolation, characterizations, and applications. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 23(4), 383–393. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0169-9>.
- [18] Faksawat, K., Sujinnapram, S., Limsuwan, P., Hoonnivathana, E., and Naemchanthara, K., 2015. Preparation and characteristic of hydroxyapatite synthesized from cuttlefish bone by precipitation method. In *Advanced Materials Research* (Vol. 1125, pp. 421–425). *Trans Tech Publications Ltd*. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMR.1125.421>.
- [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. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2005.12.011>.
- [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. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.08.007>.
- [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. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.07.029>.
- [22] Pal, A., Maity, S., Chabri, S., Bera, S., Chowdhury, A. R., Das, M., and Sinha, A., 2017. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from Mercenaria clam shells and phosphoric acid. *Biomedical Physics & Engineering Express*, 3(1), 015010.
- [23] Razali, N. M., Pramanik, S., Osman, N. A., Radzi, Z., and Pinguan-Murphy, B., 2016. Conversion of calcite from cockle shells to bioactive nanorod hydroxyapatite for biomedical applications. *J. Ceram. Process. Res*, 17, 699–706.
- [24] Goloshchapov, D. L., Kashkarov, V. M., Rumyantseva, N. A., Seregin, P. V., Lenshin, A. S., Agapov, B. L., and Domashevskaya, E. P., 2013. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell. *Ceramics International*, 39(4), 4539–4549. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.11.050>.
- [25] Gutiérrez-Prieto, S. J., Fonseca, L. F., Sequeda-Castañeda, L. G., Díaz, K. J., Castañeda, L. Y., Leyva-Rojas, J. A., ... and Acosta, A. P., 2019. Elaboration and Biocompatibility of an Eggshell-Derived Hydroxyapatite Material Modified with Si/PLGA for Bone Regeneration in Dentistry. *International Journal of Dentistry*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5949232>.
- [26] 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. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(03\)00053-4](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(03)00053-4).
- [27] 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. <https://doi.org/10.1179/174367613X13789812714425>.
- [28] Pon-On, W., Suntornsaratoon, P., Charoenphandhu, N., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., and Tang, I. M., 2016.

- Hydroxyapatite from fish scale for potential use as bone scaffold or regenerative material. *Materials Science and Engineering: C*, 62, 183–189. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.051>.
- [29] Zainol, I., Adenan, N. H., Rahim, N. A., and Jaafar, C. A., 2019. Extraction of natural hydroxyapatite from tilapia fish scales using alkaline treatment. *Materials Today: Proceedings*, 16, 1942–1948. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.06.072>.
- [30] Barua, E., Deb, P., Lala, S. D., and Deoghare, A. B., 2019. Extraction of Hydroxyapatite from Bovine Bone for Sustainable Development. In *Biomaterials in Orthopaedics and Bone Regeneration* (pp. 147–158). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-9977-0_10.
- [31] Ayatollahi, M. R., Yahya, M. Y., Shirazi, H. A., and Hassan, S. A., 2015. Mechanical and tribological properties of hydroxyapatite nanoparticles extracted from natural bovine bone and the bone cement developed by nano-sized bovine hydroxyapatite filler. *Ceramics International*, 41(9), 10818–10827. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.05.021>.
- [32] 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. <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.2002.tb00268.x>.
- [33] 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. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.11.021>.
- [34] 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. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.08.014>.
- [35] Nguyen Van Hoa, Nguyen Cong Minh, Pham Anh Dat. 2018. Preparation and characterization of nanohydroxyapatite from fish bones: (2) use of enzyme for pre-treatment. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 2, 39–45.
- [36] Dao Quoc Huong, Pham Thi Sao, 2011. Synthesis of porous hydroxyapatite ceramics from limestone via hydrothermal process. *Vietnam Journal of Science and Technology*, 49(2), 93–99.
- [37] Venkatesan, J., Lowe, B., Manivasagan, P., Kang, K. H., Chalisserry, E. P., Anil, S., ... and Kim, S. K., 2015. Isolation and characterization of nano-hydroxyapatite from salmon fish bone. *Materials*, 8(8), 5426–5439. <https://doi.org/10.3390/ma8085253>.
- [38] Dabiri, S. M. H., Rezaie, A. A., Moghimi, M., and Rezaie, H., 2018. Extraction of Hydroxyapatite from Fish Bones and Its Application in Nickel Adsorption. *BioNanoScience*, 8(3), 823–834. <https://doi.org/10.1007/s12668-018-0547-y>.
- [39] Mustafa, N., Ibrahim, M. H. I., Asmawi, R., and Amin, A. M., 2015. Hydroxyapatite extracted from waste fish bones and scales via calcination method. In *Applied Mechanics and Materials* (Vol. 773, pp. 287–290). Trans Tech Publications Ltd. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AMM.773-774.287>.
- [40] Le Ho Khanh Hy, Pham Xuan Ky, Dao Viet Ha, Nguyen Thu Hong, Phan Bao Vy, Doan Thi Thiet, Nguyen Phuong Anh, 2018. Certain properties of calcium hydroxyapatite from skipjack tuna bone (*Katsuwonus pelamis*). *Vietnam Journal of Marine Science and Technology*, 18(4A), 151–163. <https://doi.org/10.15625/8159-3097/18/4A/13643>.
- [41] 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. <https://doi.org/10.1063/1.2369647>.

- [42] 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. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900004>.
- [43] 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. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2004.11.078>.
- [44] Berzina-Cimdina, L., and Borodajenko, N., 2012. Research of calcium phosphates using Fourier transform infrared spectroscopy. *Infrared Spectroscopy-Materials Science, Engineering and Technology*, 12(7), 251–263.
- [45] Antonakos, A., Liarokapis, E., and Leventouri, T., 2007. Micro-Raman and FTIR studies of synthetic and natural apatites. *Biomaterials*, 28(19), 3043–3054. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.02.028>.
- [46] Joschek, S., Nies, B., Krotz, R., and Göpferich, A., 2000. Chemical and physicochemical characterization of porous hydroxyapatite ceramics made of natural bone. *Biomaterials*, 21(16), 1645–1658. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00036-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00036-3).
- [47] Redey, S. A., Razzouk, S., Rey, C., Bernache-Assollant, D., Leroy, G., Nardin, M., and Cournot, G., 1999. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials*, 45(2), 140–147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199905\)45:2<140::AID-JBM9>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199905)45:2<140::AID-JBM9>3.0.CO;2-I).
- [48] Safarzadeh, M., Ramesh, S., Tan, C. Y., Chandran, H., Ching, Y. C., Noor, A. F. M., ... and Teng, W. D., 2020. Sintering behaviour of carbonated hydroxyapatite prepared at different carbonate and phosphate ratios. *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, 59(2), 73–80. <https://doi.org/10.1016/j.bsecv.2019.08.001>.