

KHẢO SÁT QUÁ TRÌNH TÁCH HYDROXYAPATITE (HAP) DẠNG VI TINH THỂ TỪ XƯƠNG BÒ VÀ HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA NÓ *IN VITRO*

Lê Thanh Thanh, Phan Tuấn Hào, Nguyễn Thị Ngọc Nhi
Trường Đại học Thủ Dầu Một

Các loại vật liệu có hoạt tính sinh học đang nhận được nhiều sự quan tâm trong lĩnh vực cấy ghép vật liệu nhân tạo. Vật liệu được sử dụng trong lĩnh vực này có khả năng hình thành lớp khoáng xương mới liên kết với xương tự nhiên (Okada & Furuzono, 2012; Kusrini et al., 2012). Sau một khoảng thời gian được cấy ghép ngoài việc tạo được liên kết với khung xương tự nhiên vật liệu sẽ từ từ tan ra mà không để lại bất cứ dấu vết hay bất cứ hóa chất độc hại nào. Hydroxyapatite (HAP) thu được từ nguồn gốc tự nhiên đáp ứng được những yêu cầu của một vật liệu y sinh như có cùng bản chất và thành phần hóa học như trong xương của con người, Ca/P đúng như trong xương và răng đảm bảo không bị đào thải trong quá trình được đưa vào cơ thể (Phạm Thị Sao, 2012; Sobczak et al., 2009; Liu et al., 2008). Chính vì thế mà HAP đang được sử dụng rộng rãi và tỏ ra vượt trội hơn hẳn so với những vật liệu khác trong lĩnh vực cấy ghép y học nói riêng và trong lĩnh vực y khoa nói chung. Trong nghiên cứu này, HAP được tách từ xương bò và tạo hạt dạng vi tinh thể bằng việc kết hợp các phương pháp ninh, nung, siêu âm; bột HAP thu được có độ tinh thể cao, mật độ phân bố tương đối dày đặc. Bột HAP dạng vi tinh thể được kiểm tra hoạt tính sinh học thông qua thực nghiệm *in vitro* cho thấy HAP có hoạt tính sinh học cao nhờ vào việc hình thành lớp khoáng xương mới giúp cho xương nhanh chóng được tái tạo.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Xương bò (xương ống) được rửa sạch bằng nước cất 2 lần và nước muối 0,9% và chần qua nước sôi trong 5 giờ, ninh trong nồi áp suất trong 2 giờ (4 lần) để loại bỏ tủy, gân, protein và các chất béo. Sau đó xương được sấy ở 50-60°C để loại bỏ một số chất hữu cơ đơn giản và cắt thành từng khối 1 cm³. Các khối xương được sấy ở 100°C cho đến khi hết mùi, xương sau khi sấy có màu trắng vàng và được nghiền bằng cối và chày thành bột (XB). Cân 10 g bột xương (XB) nung ở các giá trị nhiệt độ khác nhau (500°C, 600°C, 700°C, 800°C, 900°C, 1000°C) trong những khoảng thời gian (1, 2, 3, 4 giờ) sau đó được nghiền trong máy nghiền bi trong vòng 20 phút thu được bột HAP. Chuẩn bị 0,8 g bột HAP cho vào cốc và thêm vào các hệ dung môi siêu âm 12% wt, và đánh siêu âm ở các thời gian khác nhau. Sau khi kết thúc quá trình đánh siêu âm mẫu được sấy khô thu được bột HAP dạng vi tinh thể.

Mẫu bột HAP dạng vi tinh thể được ngâm trong dung dịch SBF theo tỉ lệ ngâm m_v/V_{dd} (50 mg/100 ml, 100 mg/100 ml) và thời gian ngâm (1, 5, 10 ngày); các mẫu được ngâm ở nhiệt độ 37°C tương tự như nhiệt độ cơ thể người và được lắc trên máy lắc với tốc độ lắc 50 (vòng/phút). Sau các khoảng thời gian ngâm, bột vật liệu được tách ra và rửa bằng nước cất 2 lần để loại bỏ các ion dư thừa sau đó rửa lại bằng cồn nguyên chất để loại bỏ hoàn toàn các ion tự do; và sấy khô ở 70°C.

Vật liệu HAP dạng vi tinh thể trước và sau khi ngâm trong dung dịch SBF được đặc trưng bằng các phương pháp hóa-lý hiện đại như: nhiễu xạ tia X (XRD) trên máy XRD-6100 (SHIMADZU, Japan), phổ hồng ngoại biến đổi (FTIR) trên máy FT/IR-4600 (Jasco, Japan), hiển vi điện tử quét (SEM) trên máy Jeol/JSM-6480 LV (Japan), phân tích kích thước hạt (PSA) trên máy Horiba LA-950 (Horiba, Japan), quang phổ phát xạ nguyên tử (ICP) tại trung tâm dịch vụ phân tích thí nghiệm thành phố Hồ Chí Minh.

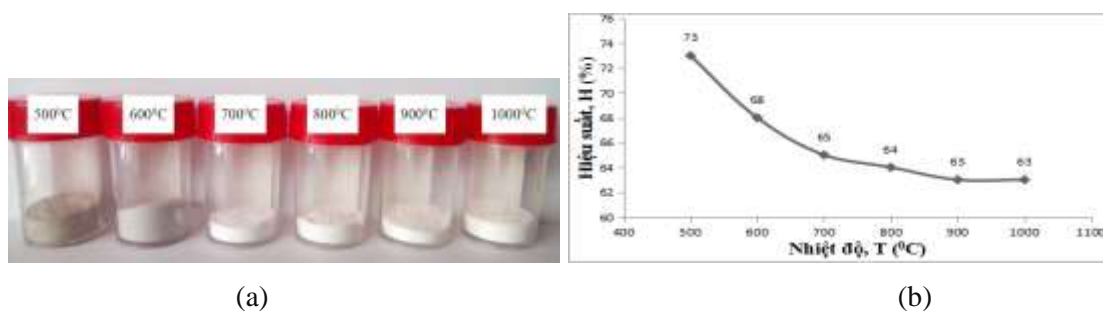
II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian nung đến hydroxyapatite (HAp) tách từ xương bò

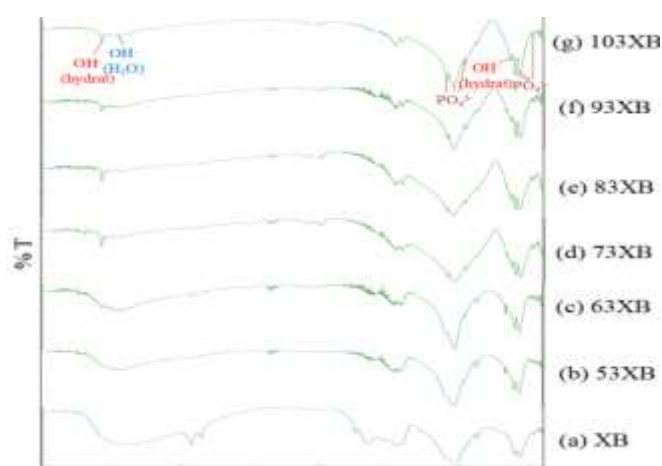
Ảnh hưởng của nhiệt độ nung

Hình 1.a cho thấy mẫu bột xương sau khi nung ở nhiệt độ 500°C, 600°C có màu sẫm, tuy nhiên khi nung ở 700°C-1000°C bột xương có màu sáng hơn (chủ yếu là màu trắng). Kết quả này tương tự như nghiên cứu trước đây của Kusrini & Sontang, (2012) cho rằng màu sắc của bột xương thay đổi theo nhiệt độ nung chứng tỏ các hợp chất hữu cơ đã bị phân hủy hoàn toàn khi nung ở nhiệt độ cao (như collagen và protein). Cùng với đó sự thay đổi về hiệu suất chính là sự phân hủy của các chất hữu cơ (hình 1.b).

Mẫu bột xương trước khi nung và sau khi nung ở nhiệt độ 500°C, 600°C (hình 2.a đến c) không thể hiện rõ dải phổ đặc trưng của các nhóm PO_4^{3-} và nhóm OH^- có trong tinh thể HAp thông qua phổ FTIR. Nhiệt độ nung 700-1000°C (hình 2.d đến g) nhóm PO_4^{3-} được quan sát thấy ở các đỉnh tại 1087-1091, 1040-1045, 957, 596-601, 565-570, 472 cm^{-1} ; dao động kéo dài của nhóm OH^- trong tinh thể hydrat ở đỉnh 3571 cm^{-1} và dao động uốn của nhóm OH^- trong tinh thể hydrat tại đỉnh 632 cm^{-1} ; dao động kéo dài của nhóm OH^- trong H_2O hấp thụ ở đỉnh 3447 cm^{-1} ; ngoài ra các dao động của nhóm CO_3^{2-} ở tại các đỉnh 1458-1464, 1412-1417 cm^{-1} .

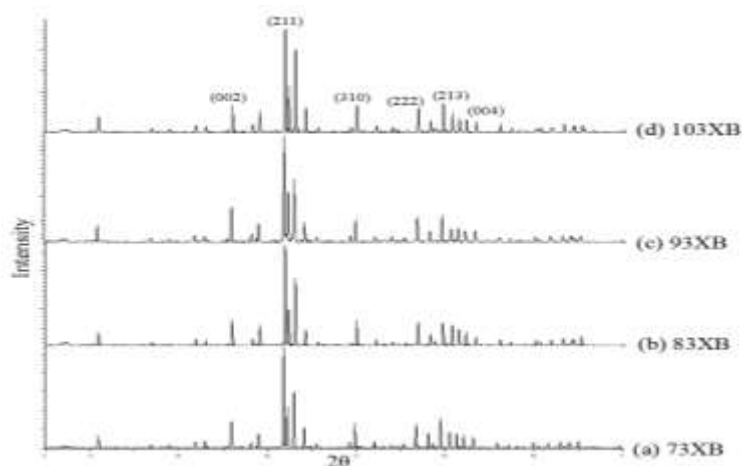


Hình 1: Mẫu bột xương bò nung ở các nhiệt độ khác nhau: 500°C, 600°C, 700°C, 800°C, 900°C, 1000°C thời gian tương ứng là 3 giờ (a - Màu sắc, b - Hiệu suất)



Hình 2: Phổ FTIR của mẫu bột xương bò trước (a) và sau khi nung ở các nhiệt độ khác nhau: (b) 500°C, (c) 600°C, (d) 700°C, (e) 800°C, (f) 900°C, (g) 1000°C thời gian tương ứng là 3 giờ

Kết quả nhiễu xạ tia X (XRD) trong hình 3 biểu diễn các pic nhiễu xạ ở các mặt (002), (211), (310), (222), (213), (004) là các pic nhiễu xạ đặc trưng của tinh thể HAp. Pic cao nhất ở mặt (211) có độ nhọn và độ rộng pic hẹp chứng tỏ HAp có độ tinh khiết cao. Hình 3.c có đầy đủ các pic đặc trưng và cường độ cũng như độ nhọn, độ rộng pic hẹp chứng tỏ rằng đã thu được HAp với độ tinh khiết cao ở nhiệt độ nung 900°C trong 3 giờ.

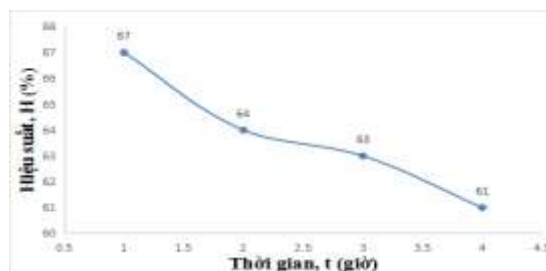


Hình 3: Nhiễu xạ tia X (XRD) của bột xương bò nung ở nhiệt độ khác nhau: (a) 700°C, (b) 800°C, (c) 900°C, (d) 1000°C thời gian tương ứng là 3 giờ

Ảnh hưởng của thời gian nung



(a)

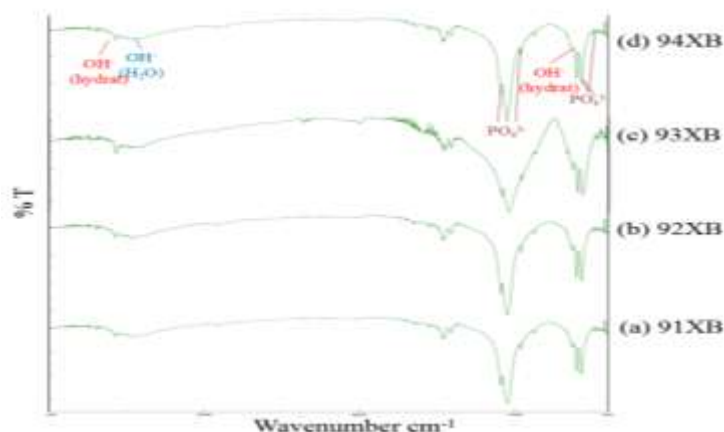


(b)

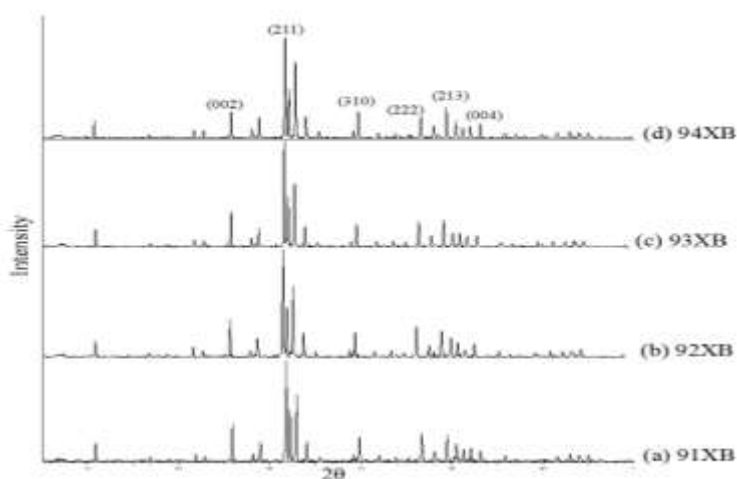
Hình 4: Mẫu bột xương bò nung ở các thời gian khác nhau: 1 giờ, 2 giờ, 3 giờ, 4 giờ nhiệt độ tương ứng là 900°C (a - Màu sắc, b - Hiệu suất)

Hình 4 trình bày màu sắc và hiệu suất của mẫu bột xương ở nhiệt độ nung 900°C trong những khoảng thời gian khác nhau: 1, 2, 3, 4 giờ màu của vật liệu thu được chủ yếu là màu trắng và hiệu suất giảm dần theo thời gian. Chứng tỏ các hợp chất hữu cơ (như collagen và protein) có trong xương đã bị phân hủy hoàn toàn, như vậy ở nhiệt độ nung 900°C các tinh thể HAp thu được với hàm lượng cao nhất.

Hình 5 trình bày phổ FTIR của mẫu bột xương nung ở 900°C trong các thời gian 1, 2, 3, 4 giờ thể hiện đầy đủ các dải phổ đặc trưng của nhóm PO_4^{3-} và nhóm OH có trong tinh thể HAp. Các dải phổ đặc trưng: nhóm PO_4^{3-} được quan sát thấy ở các đỉnh tại 1087-1091 cm^{-1} , 1040-1045 cm^{-1} , 957 cm^{-1} , 596-601 cm^{-1} , 565-570, 472 cm^{-1} ; nhóm OH tại các đỉnh 3571 cm^{-1} , 3447 cm^{-1} , 632 cm^{-1} và của nhóm CO_3^{2-} ở tại các đỉnh 1458-1464 cm^{-1} , 1412-1417 cm^{-1} .



Hình 5: Phổ FTIR của các mẫu bột xương bò nung ở thời gian khác nhau: (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ, (d) 4 giờ nhiệt độ tương ứng là 900°C



Hình 6: Nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu bột xương bò nung ở thời gian khác nhau: (a) 1 giờ, (b) 2 giờ, (c) 3 giờ, (d) 4 giờ nhiệt độ tương ứng là 900°C

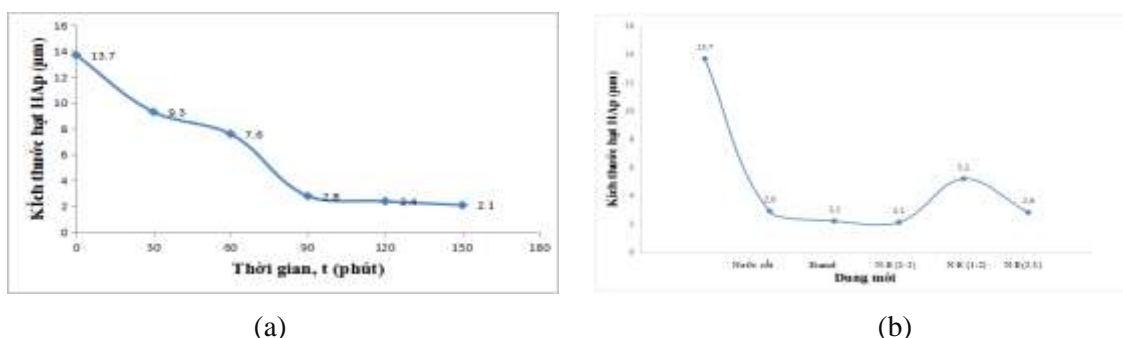
Kết quả nhiễu xạ tia X (XRD) trong hình 6 biểu diễn các pic nhiễu xạ ở các mặt (002), (211), (310), (222), (213), (004) là các pic nhiễu xạ đặc trưng của tinh thể HAp. Pic cao nhất ở mặt (211) có độ nhọn và độ rộng pic hẹp chứng tỏ HAp có độ tinh khiết cao. Hình 6.c có đầy đủ các pic đặc trưng và cường độ cũng như độ nhọn, độ rộng pic hẹp kết quả này giống với mẫu bột xương nung ở 900°C trong 3 giờ trong điều kiện khảo sát nhiệt độ nung như đã đề cập ở trên.

Sau quá trình ninh và tiến trình xử lý nhiệt HAp thu được có hàm lượng cao từ xương bò, và tìm ra được điều kiện tối ưu nhất ở nhiệt độ nung 900°C trong thời gian 3 giờ (ký hiệu: 93XB). Mẫu tối ưu nhất được xác định hàm lượng calcium và phosphate bằng quang phổ phát xạ nguyên tử (ICP), hàm lượng calcium được xác định lần lượt là 42%, hàm lượng phosphate là 18,2% và kết quả phân tích kích thước hạt (PSA) là 13,7 μm . Từ kết quả này mẫu bột HAp được tiến hành tạo hạt dạng vi tinh thể bằng phương pháp siêu âm.

2. Tổng hợp hydroxyapatite (HAp) dạng vi tinh thể

Mẫu bột HAp tốt nhất thu được ở điều kiện khảo sát ở trên được tạo hạt dạng vi tinh thể nhờ vào quá trình đánh sóng siêu âm ở các hệ dung môi khác nhau (hình 7). Mẫu bột 93XB khi tiến

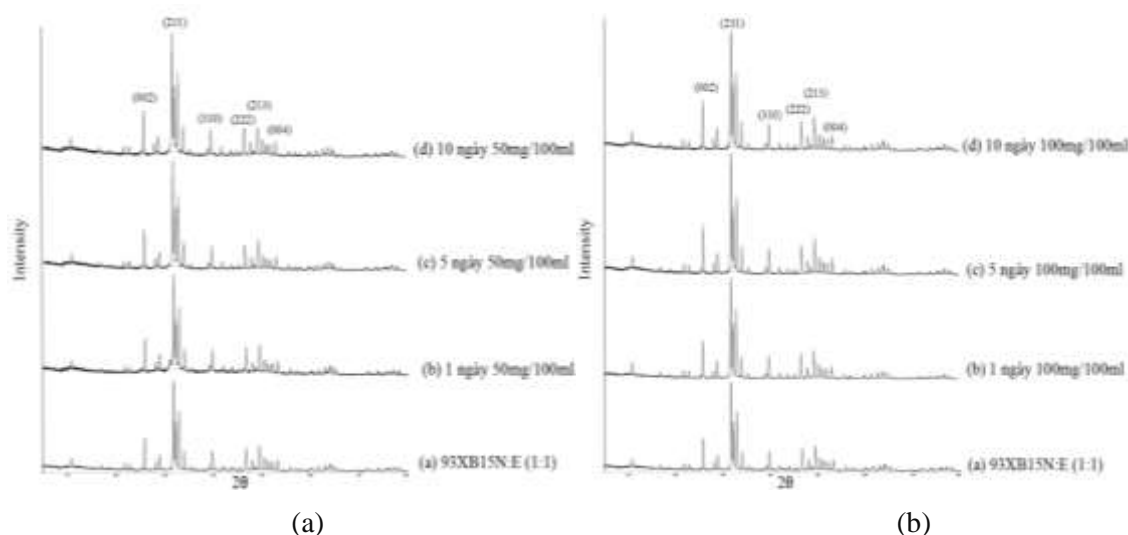
hành đánh siêu âm với hệ hai dung môi là nước cất 2 lần và ethanol ở tỉ lệ (1:1) trong thời gian 150 phút thu được kích thước hạt trung bình nhỏ nhất (2,1 μm). Kết quả này tương tự với các nghiên cứu trước đây của Kordylla et al. (2008), Poinern et al. (2009) cho rằng khi tiến hành tăng thời gian đánh siêu âm đồng thời cũng tăng sự tiếp xúc của các hạt bằng sóng siêu âm, sau đó các hạt này còn tiếp xúc với các hạt bong bóng nhỏ gây ra bởi những lỗ rỗng trong hạt chính vì thế làm cho kích thước hạt thu được nhỏ hơn kích thước ban đầu (các hạt bong bóng nhỏ được hình thành là do sóng siêu âm tạo ra các luồng vi sóng và sự xung kích). Hệ dung môi cũng góp phần tác động vào việc hình thành và phân bố kích thước hạt, hệ càng phân cực thì càng có khả năng tạo hạt kích thước nhỏ hơn.



Hình 7: Kích thước hạt trung bình của mẫu bột 93XB trước và sau khi đánh siêu âm (a - Thời gian siêu âm (30, 60, 90, 120, 150 phút), b - Dung môi siêu âm (nước cất 2 lần, ethanol, nước cất 2 lần:ethanol tỉ lệ 1:1, 1:2, 2:1))

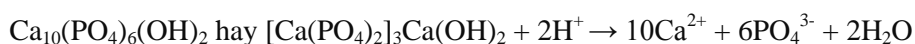
Từ các kết quả trên cho thấy rằng sau khi tiến hành đánh siêu âm kích thước hạt trung bình thu được giảm đáng kể. Đối với mẫu 93XB khi tiến hành đánh siêu âm trong hệ dung môi nước cất 2 lần:ethanol tỉ lệ (1:1) ở thời gian 150 phút có kích thước dạng vi tinh thể (2,1 μm), ký hiệu: 93XB15N:E (1:1).

3. Động học của sự hình thành khoáng xương của vật liệu HAP sau thực nghiệm *in vitro*



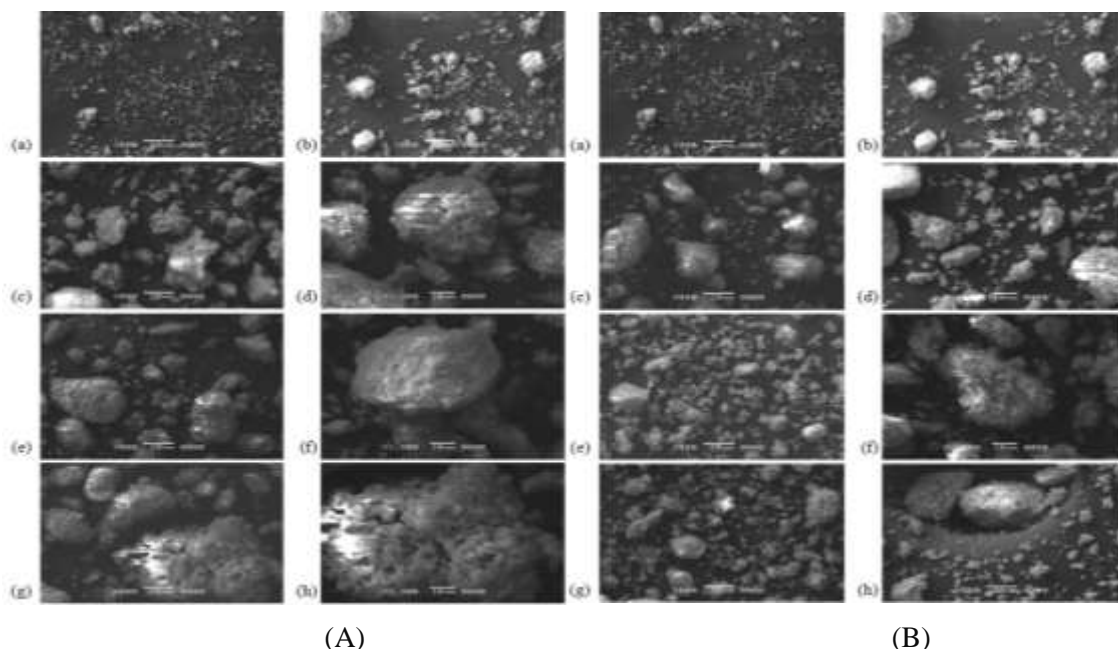
Hình 8: Nhiễu xạ tia X (XRD) của bột 93XB15N:E (1:1) trước và sau khi ngâm 1 ngày, 5 ngày, 10 ngày trong dung dịch SBF (a - Tỉ lệ ngâm 50 mg/100 ml, b - Tỉ lệ ngâm 100 mg/100 ml)

Hình 8 trình bày kết quả nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu HAp được ngâm trong dung dịch SBF với tỉ lệ ngâm 50 mg/100 ml và 100 mg/100 ml với thời gian 1, 5, 10 ngày. Sau khi ngâm trong dung dịch SBF số lượng các pic vẫn giữ nguyên như cũ, tuy nhiên cường độ và các quãng nhiễu xạ đã trở nên thay đổi. Với thời gian ngâm 1, 5, 10 ngày nhận thấy có sự lớn dần của các pic cùng với đó là xuất hiện thêm các quãng nhiễu xạ làm cho các pic trở nên tù hơn (hình 8.a). Trong môi trường ngâm 50 mg/100 ml lượng HAp tương tác một lượng lớn dung dịch SBF dẫn đến sự tương tác hóa học mạnh giữa HAp và SBF làm phá vỡ cấu trúc HAp, và cũng nhanh chóng tái tạo lại tinh thể và kéo theo sự hình thành của HAp mới. Dựa vào các tài liệu của Kokubo et al. (1992), (2006) mô tả hoạt tính sinh học của vật liệu HAp trong dung dịch SBF được bằng phản ứng phân hủy như sau:



Sau đó có sự kết tinh lại của các ion để tạo thành một lớp khoáng xương HAp mới trên bề mặt vật liệu HAp cũ.

Kết quả nhiễu xạ tia X (XRD) của mẫu ngâm ở tỉ lệ 100 mg/100 ml (hình 8.b) nhận thấy sự khác biệt quan trọng so với kết quả ngâm ở tỉ lệ 50 mg/100 ml. Điều này thể hiện sự ảnh hưởng của tỉ lệ ngâm đối với hoạt tính sinh học của vật liệu. Sau khi ngâm 1, 5, 10 ngày số lượng các pic vẫn giữ nguyên như cũ và không xuất hiện thêm các pic lạ nào, cường độ các pic cũng cao hơn so với mẫu bột trước khi được ngâm. Ngoài ra không có sự xuất hiện thêm các quãng nhiễu xạ và các pic cũng không trở nên tù hơn so với khi ngâm ở tỉ lệ 50 mg/100 ml. Khi ngâm 100 mg/100 ml do tỉ lệ tương đối cân bằng về mặt hóa học nên việc phá hủy cấu trúc tinh thể HAp xảy ra chậm hơn và dẫn đến việc hình thành lớp HAp mới cũng ít hơn so với khi ngâm ở tỉ lệ 50 mg/100 ml. Từ các kết quả trình bày trong hình 8 cho thấy vật liệu cấy ghép không biến đổi thành vật liệu khác vì nếu biến đổi thành vật liệu khác lại không giống cấu trúc của xương và khi đó vật liệu sẽ bị đào thải ngay. Lớp khoáng mới hình thành chính là cầu nối gắn liền miếng ghép xương vào xương tự nhiên, qua đó xương hỏng được tu sửa và tái tạo lại.



Hình 9: Ảnh SEM của bột 93XB15N:E (1:1) trước và sau khi ngâm 1 ngày, 5 ngày, 10 ngày trong dung dịch SBF (A - Tỉ lệ ngâm 50 mg/100 ml, B - Tỉ lệ ngâm 100 mg/100 ml)

Hình 9.A trình bày ảnh SEM của bột vật liệu sau 1 ngày, 5 ngày, 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF. Sau khi tiến hành ngâm trong dung dịch SBF ở những khoảng thời gian khác nhau ta thấy bề mặt của vật liệu hoàn toàn được bao phủ bởi các hạt tinh thể. Sau 1 ngày ngâm, ta thấy trên bề mặt của bột 93XB đánh siêu âm ở thời gian 150 phút trong hệ dung môi nước cất 2 lần:ethanol (1:1) bắt đầu xuất hiện các vết lốm đốm (hình 9.A.c và d), đó là do một lớp tinh thể HAp mới được hình thành trên nền HAp cũ. Sau 5 ngày và 10 ngày lớp tinh thể này phát triển mạnh hơn (hình 9.A.e đến h). Ta không còn thấy các vết lốm đốm nữa mà thay vào đó là trên bề mặt của những hạt tinh thể HAp đã được phủ một lớp HAp mới hoàn toàn.

Hình 9.B trình bày ảnh SEM của bột vật liệu sau 1 ngày, 5 ngày, 10 ngày ngâm trong dung dịch SBF. Sau 1 ngày ngâm, ta thấy trên bề mặt của bột 93XB đánh siêu âm ở thời gian 150 phút trong hệ dung môi nước cất 2 lần:ethanol (1:1) bắt đầu xuất hiện một lớp khoáng bám trên bề mặt vật liệu cũ (hình 9.B.c và d), đó là do một lớp tinh thể HAp mới được hình thành trên nền HAp cũ. Sau 5 ngày, 10 ngày lớp tinh thể này phát triển mạnh hơn chứng tỏ rằng lớp tinh thể HAp mới ngày càng phát triển trên nền HAp cũ (hình 9.B. e đến h).

III. KẾT LUẬN

Hydroxyapatite (HAp) được tách từ xương bò và tạo hạt dạng vi tinh thể khi sử dụng kết hợp các phương pháp ninh, nung, siêu âm. HAp đã được tách thành công khi nung xương bò ở 900°C trong 3 giờ và thu được HAp dạng vi tinh thể với kích thước hạt trung bình (2,1 µm) khi đánh siêu âm trong hệ dung môi nước cất 2 lần : ethanol tỉ lệ (1:1) ở thời gian 150 phút.

HAp tổng hợp được ngâm trong dung dịch giả dịch thể người (Simulated Body Fluid, SBF) cho thấy vật liệu có hoạt tính sinh học cao thông qua việc hình thành một lớp khoáng xương mới trên bề mặt của chúng.

Sự hình thành lớp khoáng mới tùy thuộc vào tỉ lệ giữa vật liệu và dung dịch SBF.

Cơ chế của quá trình hình thành lớp khoáng mới là sự phá hủy HAp cũ bởi dung dịch SBF sau đó sự kết tinh lại của các ion hình thành nên lớp khoáng mới trên nền vật liệu cũ. Lớp khoáng này chính là cầu nối gắn kết vật liệu nhân tạo và xương tự nhiên trong phẫu thuật chỉnh hình xương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Kusrini E., Pudjiastuti A. R., Astutiningsih S., Harjanto S.**, 2012. Preparation of Hydroxyapatite from Bovine bone by Combination Methods of Ultrasonic and Spray Drying. *Bio-Chemical and Environmental Sciences*, December 14-15: 47-51.
2. **Liu H., Yazici H., Ergun C., Webster T. J., Bermek H.**, 2008. An in vitro evaluation of the Ca/P ratio for the cytocompatibility of nano-to-micron particulate calcium phosphates for bone regeneration. *Acta Biomaterialia*, 4: 1472-1479.
3. **Okada M. & Furuzono T.**, 2012. Hydroxylapatite nanoparticles: fabrication methods and medical applications. *Sci. Technol. Adv. Mater*, 13: 1-14.
4. **Phạm Thị Sao**, 2012. *Nghiên cứu chế tạo hydroxyapatit dạng gôm xốp từ vỏ trứng và đá vôi*. Luận văn ThS Chuyên ngành: Hóa vô cơ, Đại học Khoa học Tự nhiên, Hà Nội, Việt Nam.
5. **Sobczak A., Kowalski Z., Wzorek Z.**, 2009. Preparation of hydroxyapatite from animal bones. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 11(4): 23-28.

6. **Kusrini E. & Sontang M.**, 2012. Characterization of x-ray diffraction and electron spin resonance: Effects of sintering time and temperature on bovine hydroxyapatite. *Radiation Physics and Chemistry*, 81: 118-125.
7. **Kordylla A., Koch S., Tumakaka F., Schembecker G.**, 2008. Towards an optimized crystallization with ultrasound: Effect of solvent properties and ultrasonic process parameters. *Journal of Crystal Growth*, 310: 4177-4184.
8. **Poinern G. E., Brundavanam R. K., Mondinos N., Jiang Z.T.**, 2009. Synthesis and characterisation of nanohydroxyapatite using an ultrasound assisted method. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 469-474.
9. **Ohtsuki C., Kokubo T., Yamamuro T.**, 1992. Mechanism of apatite formation on CaO-SiO₂-P₂O₅ glasses in a simulated body fluid. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 143: 84-92.
10. **Kokubo T. & Takadama H.**, 2006. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity. *Journal of Biomaterials*, 27: 2907-2915.

STUDY ON THE SEPARATION AND THE IN-VITRO BIOACTIVITY OF MICROCRYSTALLINE HYDROXYAPATITE (HAp) FROM BOVINE BONE

Thanh Thanh Le, Tuan Hao Phan, Thi Ngoc Nhi Nguyen

SUMMARY

In the food industry, bovine bones are known as a bio-waste. Therefore, the use of bovine bone as a source of hydroxyapatite (HAp) results in economic and environmental benefit. Microcrystalline HAp form was separated from bovine bone using a combination of methods including simmer, calcination and ultrasonic. Influence of factors, such as calcination temperature, calcination time, ultrasonic time, ultrasonic solvent, were also surveyed. HAp was soaked in Simulated Body Fluid (SBF) to test the *in vitro* biological activity in the formation of new bone mineral layer. Characteristics of microcrystalline HAp were determined by X-ray diffraction (XRD), infrared spectrum transform (FTIR), microscopy scanning electron (SEM), analysis of particle size (PSA) and atomic emission spectra (ICP). Preparation of HAp was done by heating bovine bone at 900°C for 3 hours, and microcrystalline HAp was obtained by ultrasonic method using ethanol in distilled water solution (1:1) for 150 min. The HAp had high bioactivity via *in vitro* experiments.