NGHIÊN CỨU CHẾ TẠO GỐM XỐP HYDROXYAPATIT TỪ KHUNG XỐP TỰ NHIÊN CỦA MAI MỰC BẰNG PHẢN ỨNG THUỶ NHIỆT

Vũ Duy Hiển[(1)], Đào Quốc Hương[(1)], Phan Thị Ngọc Bích[(1)], Nguyễn Văn Trung[(2)]
1- Viện Hoá học-Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2- Trường ĐH Sư phạm – ĐH Thái nguyên

1. MỞ ĐẦU

Trong cơ thể người và động vật, xương đóng trò quan trọng với nhiệm vụ nâng đỡ và bảo vệ cơ thể. Cấu tạo của xương gồm: hợp chất vô cơ, chủ yếu là hydroxyapatit (HA) với công thức hoá học là $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, nước và các dịch sinh học. Xương tồn tại ở nhiều dạng khác nhau: dạng gốm đặc khít ở bề mặt xương và răng (HA chiếm đến 90 - 98% khối lượng), dạng gốm xốp ở xương ống (HA chiếm 60 - 70%) và dạng xương non (xương sụn)…[1].

Việc nghiên cứu chế tạo các chế phẩm từ vật liệu HA ở các dạng trên thế giới đã được triển khai từ lâu và đã đạt được những thành tựu đáng kể. Cho tới nay, những ứng dụng và hiệu quả của loại vật liệu tiên tiến này đã tạo ra bước đột phá mới trong các lĩnh vực: xét nghiệm, điều trị y học cũng như làm dược phẩm và vật liệu y sinh học [2]. Các nghiên cứu tập trung vào tổng hợp HA ở các dạng bột mịn và siêu mịn, dạng khối xốp và gốm xốp, dạng màng, dạng sợi… bằng các phương pháp khác nhau và khảo sát các đặc tính của chúng để nâng cao khả năng ứng dụng trong y - sinh học [3].

Tuỳ thuộc vào mục đích ứng dụng, HA ở các dạng có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp từ các nguyên liệu khác nhau. Dựa vào điều kiện tiến hành phản ứng, có thể phân chia các phương pháp thành: phương pháp vật lý (bay bốc chân không, bay hơi plasma, hồ quang...), phương pháp hoá học (kết tủa, sol-gel, phản ứng pha rắn, thuỷ nhiệt...), phương pháp hoá cơ hoặc phương pháp điện hoá [4].

Phản ứng thủy nhiệt thường được sử dụng để chế tạo HA dạng khối xốp, đặc biệt là dạng khối xốp có cấu trúc sinh học [5]. Trong phản ứng thuỷ nhiệt, hợp chất chứa canxi thường là các chất không tan trong nước, chẳng hạn $CaCO_3$ có trong khung xương tự nhiên của động vật thân mềm, vỏ trứng, quặng $CaCO_3$ ... Năm 1974, Roy và Linnehan [6] đã tổng hợp được gốm HA từ khung xương tự nhiên của san hô bằng phản ứng thuỷ nhiệt ở nhiệt độ 270^oC với áp suất 1030 at (103 Mpa). Năm 1986, Kasperk và Ewers [7] đã tổng hợp HA bằng phản ứng thuỷ nhiệt từ tảo bị vôi hoá (calcified algae). Sivakumar và đồng nghiệp [8] năm 1996 đã tổng hợp được gốm HA từ khung xương san hô ở Ấn Độ. Đã có một số công trình công bố kết quả nghiên cứu tổng hợp gốm HA từ mai mực bằng phản ứng thuỷ nhiệt ở nhiệt độ 200^oC và áp xuất khoảng 10-15 at [9, 10].

HA xốp được chế tạo bằng phương pháp phản ứng thuỷ nhiệt nói chung vẫn giữ nguyên hình thái và cấu trúc xốp giống như khung xương tự nhiên của động vật thân mền ban đầu (san hô, mai mực, trai, ốc…). Với cấu trúc xốp sinh học như vậy, vật liệu này có khả năng tương thích sinh học với cơ thể con người tốt hơn so với gốm xốp HA tổng hợp bằng những phương pháp khác [11].

Ở Việt Nam, việc nghiên cứu chế tạo gốm xốp HA có cấu trúc xốp giống khung xương của động vật thân mềm vẫn chưa được đề cập đến. Trong bài này, chúng tôi trình bày những nghiên cứu về quá trình chế tạo gốm xốp hydroxyapatit bằng phản ứng thuỷ nhiệt từ khung xốp tự nhiên của mai mực sẵn có ở Việt Nam.

2. THỰC NGHIỆM

Mai mực được cắt thành những viên nhỏ kích thước 10x10x10mm, được luộc rửa nhiều lần bằng nước cất và etanol để loại bỏ các tạp chất cơ học và các hợp chất hữu cơ. Sau khi

sấy khô ở nhiệt độ 100^{o}C, các viên mẫu được đưa vào bình phản ứng cùng với dung dịch muối $(NH_4)_2HPO_4$ bão hoà. Lượng $CaCO_3$ trong mai mực và muối $(NH_4)_2HPO_4$ được tính sao cho tỷ lệ Ca/P là 1,7, bổ sung một lượng nhỏ dung dịch NH_4OH để đảm bảo môi trường phản ứng có pH 9 - 10.

Phản ứng thuỷ nhiệt được tiến hành ở nhiệt độ 160 -180^{o}C, trong môi trường khí nitơ có áp suất 12 at, thời gian phản ứng thay đổi từ 4 đến 32 giờ.

Để khảo sát ảnh hưởng của áp suất đến phản ứng, phản ứng thuỷ nhiệt được thực hiện ở áp xuất thay đổi từ 4 đến 14 at với thời gian tối ưu đã được xác định.

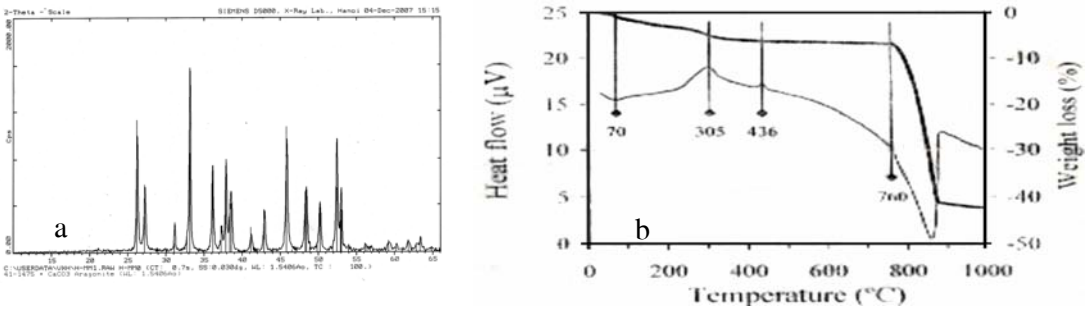
Tiếp theo, mẫu được rửa kỹ bằng nước cất, sấy khô và xác định các đặc trưng bằng các phương pháp: nhiễu xạ tia X (XRD), hiển vi điện tử quét (SEM), hấp thụ hồng ngoại (FTIR) và phân tích nhiệt (TGA).

Các mẫu tiếp tục được thiêu kết đến nhiệt độ 1000^{o}C trong 1 giờ để tạo gốm. Sản phẩm gốm HA cũng được xác định các đặc trưng bằng những phương pháp trên.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

- **Một số đặc trưng của mai mực tự nhiên**

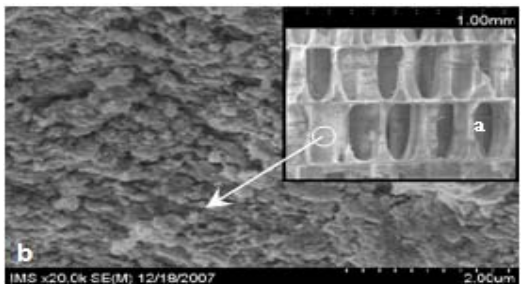
Khung xương của mai mực chứa đến 95 - 99% khối lượng là $CaCO_3$. Đặc trưng XRD (hình 1a) của mai mực cho thấy $CaCO_3$ tồn tại ở dạng thù hình aragonit. Đây là dạng kém bền nhất trong ba dạng thù hình của $CaCO_3$, do vậy chúng dễ chuyển hoá thành hợp chất HA hơn hai dạng còn lại (canxit, vaterit) trong phản ứng thuỷ nhiệt.



Hình 1: Đặc trưng XRD (a) và đặc trưng nhiệt DTA/ TGA (b) của mai mực

Trên giản đồ DTA và TGA (hình 1b) của mai mực trong khoảng nhiệt độ đến 1000^{o}C, với tốc độ gia nhiệt 10^{o}C/phút có tồn tại đỉnh toả nhiệt ở 305^{o}C ứng với quá trình cháy của các chất hữu cơ, khối lượng có thể giảm đến 5%. Đỉnh toả nhiệt yếu ở 436^{o}C ứng với quá trình chuyển pha từ dạng thù hình aragonit kém bền sang dạng canxit bền hơn và không có sự thay đổi khối lượng. Trong khoảng nhiệt độ từ 760 - 860^{o}C khối lượng mẫu giảm 44% ứng với quá trình phân huỷ của $CaCO_3$ thành CaO [9].

Ảnh SEM của mai mực cho thấy chúng có dạng khung xốp với cấu trúc lớp và liên kết theo kiểu giàn giáo. Các lớp cách nhau khoảng 0,3mm và độ rộng của các lỗ xốp từ 0,1 đến 0,2mm (hình 2a). Khung xốp được cấu tạo bởi các hạt aragonit liên kết rời rạc, cỡ hạt không đồng đều và kết tập thành từng đám (hình 2b).



Hình 2: Ảnh SEM của mai mực với độ phóng đại khác nhau

- **Phản ứng thuỷ nhiệt**

Phản ứng thuỷ nhiệt diễn ra theo phương trình:

$$10CaCO_3 + 6\,(NH_4)_2HPO_4 + 2H_2O \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 6(NH_4)_2CO_3 + 4H_2CO_3$$

Phản ứng trên là phản ứng dị thể giữa hai pha rắn ($CaCO_3$) - lỏng (dung dịch bão hoà $(NH_4)_2HPO_4$), do vậy cần thực hiện trong điều kiện nhiệt độ và áp xuất tương đối cao, nhằm tăng sự tiếp xúc giữa hai pha đồng thời cung cấp năng lượng cần thiết để phản ứng xảy ra dễ dàng hơn. Mặt khác, phản ứng trên diễn ra ở trong môi trường nước có NH_4OH do vậy cần duy trì nhiệt độ phản ứng dưới 200^oC để tránh cho nước và NH_3 bay hơi, làm giảm lượng nước cần thiết và pH của phản ứng. Hơn nữa ở nhiệt độ cao, $CaCO_3$ dạng aragonit kém bền sẽ chuyển thành dạng canxit bền vững hơn, gây khó khăn cho phản ứng thuỷ nhiệt.

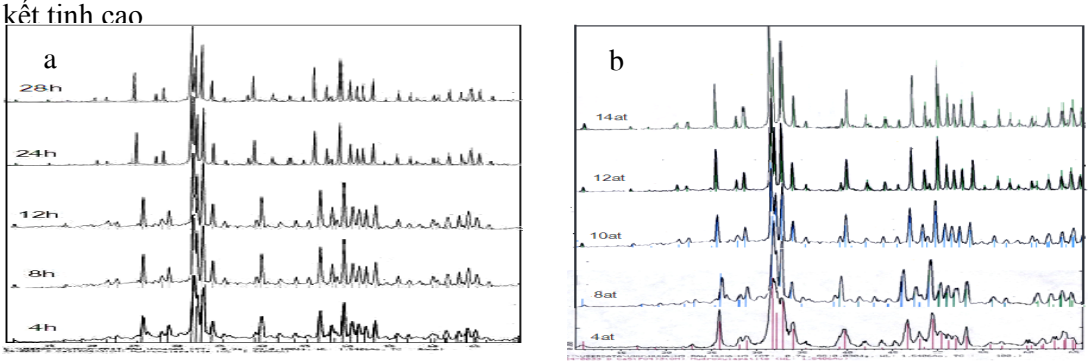
- **Một số đặc trưng của HA xốp**

Đặc trưng XRD:

Hình 3a là giản đồ XRD của mẫu HA xốp tổng hợp bằng phản ứng thuỷ nhiệt ở nhiệt độ 160 - 180^oC, áp suất 12 atm với thời gian phản ứng là 4, 8, 12, 24, 28 và 32 giờ.

Trên tất cả các giản đồ này xuất hiện đầy đủ các vạch nhiễu xạ đặc trưng của HA (JPCDS#24-0033) [12], không thấy sự có mặt của các pha khác. Các vạch đặc trưng của HA xuất hiện rõ nét hơn khi thời gian phản ứng tăng lên. Điều này cho thấy tinh thể của HA kết tinh tốt hơn theo thời gian và sau 24 giờ các vạch đặc trưng đã tách biệt hoàn toàn. Đặc trưng XRD của HA nhận được với thời gian phản ứng 24 giờ và 28 giờ không thấy có sự khác biệt nhiều. Như vậy, có thể kết luận thời gian thích hợp để phản ứng thuỷ nhiệt diễn ra hoàn toàn là 24 giờ, sản phẩm HA đơn pha. Đặc trưng XRD của mẫu này về cơ bản phù hợp với mẫu chuẩn của NIST [12].

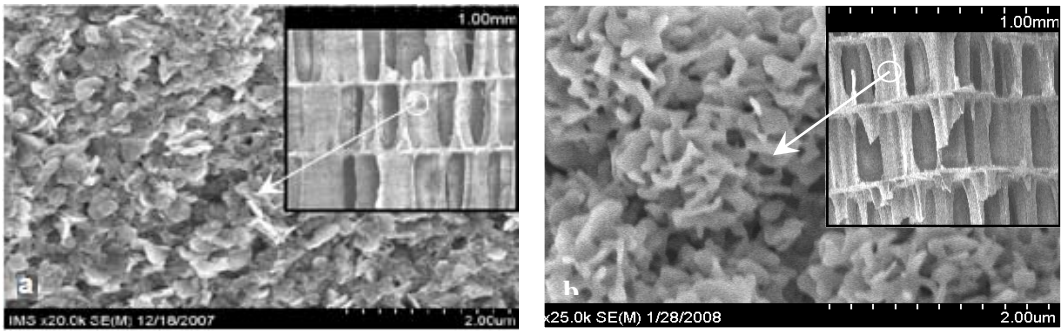
Hình 3b là giản đồ XRD của mẫu HA xốp tổng hợp bằng phản ứng thuỷ nhiệt ở nhiệt độ 160 - 180^oC, thời gian phản ứng là 24 giờ với áp suất thay đổi: 4, 8, 10, 12 và 14 at . Các vạch đặc trưng của HA xuất hiện đầy đủ và rõ nét hơn khi áp suất tăng từ 4 đến 12 at. Nguyên nhân là khi thực hiện phản ứng ở áp suất thấp (4 - 10 at), năng lượng cần thiết để các ion PO_4^{3-} và OH^- trong dung dịch bão khuếch tán qua lớp biên lỏng - rắn thấp hơn so với trường hợp áp suất cao (12 - 14 at). Mặt khác ở áp suất thấp với nhiệt độ phản ứng 160 - 180^oC nước sẽ bị bay hơi, làm cho $(NH_4)_2HPO_4$ kết tinh thành pha rắn, dẫn đến các ion PO_4^{3-} khó khuếch tán vào sâu bên trong khối xốp $CaCO_3$. Khi áp suất tăng đến 12 - 14 at, các ion PO_4^{3-} và OH^- dễ dàng khuếch tán qua lớp biên lỏng - rắn để phản ứng với Ca^{2+}, tạo HA. Đồng thời ở nhiệt độ 160 - 180^oC, áp suất hơi bão hoà của hơi nước nhỏ hơn 12 at do đó nước không bị bay hơi, dẫn đến phản ứng thuỷ nhiệt xảy ra hoàn toàn, tinh thể của HA kết tinh tốt hơn so với ở áp suất thấp. Đặc trưng XRD của HA nhận được với áp suất phản ứng 12 và 14 at không có sự khác biệt nhiều. Như vậy với áp suất khoảng 12 - 14 at là điều thích hợp để phản ứng thuỷ nhiệt sảy ra hoàn toàn, tạo ra sản phẩm HA có độ kết tinh cao



Hình 3: Đặc trưng XRD của HA tổng hợp từ mai mực với thời gian và áp xuất khác nhau

Trong phản ứng thuỷ nhiệt đã nêu trên, nước đóng một vai trò quan trọng. Nước vừa là chất tham gia vừa là sản phẩm phản ứng, đồng thời là dung môi hoà tan, giúp cho $(NH_4)_2HPO_4$ khuếch tán sâu vào bên trong, làm cho phản ứng dị thể xảy ra hoàn toàn. Thực nghiệm cho thấy, nếu không có nước, thì phản ứng tạo HA không xảy ra.

Đặc trưng SEM:



Hình 3: Ảnh SEM của HA xốp trước(a) và sau khi thiêu kết (b)

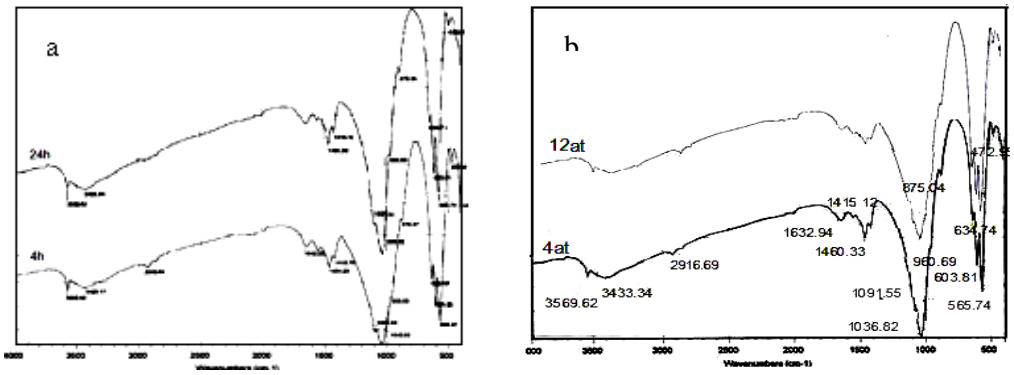
Ảnh SEM (hình 3a) cho thấy HA tạo thành từ phản ứng thuỷ nhiệt vẫn giữ được dạng khung xốp với cấu trúc lớp. Khoảng giữa các lớp, hình thái và kích thước các lỗ xốp vẫn không thay đổi so với mai mực ban đầu. Khung xốp được tạo thành từ các hạt HA hình vảy, kích thước trung bình nằm trong khoảng 0.2 µm đến 300 µm. Các vảy này xắp sếp không có trật tự, giữa chúng vẫn tồn tại các biên. Điều này chứng tỏ sản phẩm hình thành ở dạng khối xốp và chưa tạo thành gốm, do vậy chúng rất không bền khi bị nén ép.

Hình 3b cho thấy, sau khi thiêu kết ở 1000^{o}C trong 1 giờ, cấu trúc khung xốp của HA vẫn được giữ nguyên. Biên giữa các vảy HA không tồn tại nữa, chúng đã được liên kết với nhau ở dạng gốm, các lỗ xốp liên thông ba chiều với nhau, kích thước lỗ xốp khoảng 100 - 200 µm.

Đặc trưng hồng ngoại (FTIR):

Hình 4a là phổ hồng ngoại của mẫu HA cho thấy không có sự khác nhau rõ rệt trên phổ hồng ngoại của mẫu HA tổng hợp được từ mai mực sau 4 giờ và 24 giờ. Phổ FTIR của các mẫu HA nhận được với thời gian 8, 12 và 26 giờ cũng cho kết quả tương tự.

Hình 4b, là phổ FTIR của mẫu HA nhận được từ phản ứng với áp suất 4 và 12 at trong thời gian 24 giờ cũng không có sự khác biệt nhiều. Vân hấp thụ ở vùng 3570, 635 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm OH^- và vùng 1092, 1037, 960, 566 - 604, 472 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm PO_4^{3-}.



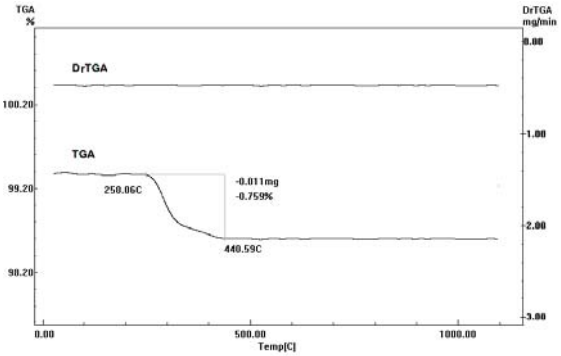
Hình 4: Phổ hồng ngoại của HA tổng hợp sau 4 giờ và 24 giờ

Vân hấp thụ của H_2O tự do nằm ở vùng 3433 cm^{-1} và 1633 cm^{-1}. Ngoài ra, trên phổ còn có các vân hấp thụ ở vùng 2916 cm^{-1} với cường độ yếu, đặc trưng cho nhóm CH_2 của một lượng rất nhỏ các tạp chất hữu cơ có thể vẫn tồn tại trong mẫu. Các vân hấp thụ ở vùng 1460 cm^{-1} và 1415 cm^{-1} đặc trưng cho gốc cacbonat CO_3^{2-}. Trên giản đồ XRD không thấy xuất hiện các vạch đặc trưng cho $CaCO_3$, do vậy các vân hấp thụ đặc trưng cho CO_3^{2-} này có thể là của axít H_2CO_3 được tạo thành do hơi nước và CO_2 bị hấp thụ vào khối xốp.

Đặc trưng FTIR của mẫu tổng hợp về cơ bản phù hợp với phổ của mẫu chuẩn NIST [12].

Đặc trưng nhiệt (TGA):

Hình 5 là đặc trưng nhiệt TGA của mẫu HA xốp sau phản ứng thuỷ nhiệt, được đo đến 1100^oC với tốc độ gia nhiệt 10^oC/phút. Khối lượng của mẫu giảm không đáng kể (0,76%), diễn ra trong khoảng nhiệt độ từ 250^oC đến 440^oC, gắn với sự bay hơi của CO_2 và nước cùng với sự phân huỷ của các tạp chất hữu cơ. Giản đồ TGA của các mẫu tổng hợp với thời gian và áp suất phản ứng khác nhau đều cho kết quả tương tự.



Hình 5: giản đồ TGA của mẫu HA xốp

Trong khoảng nhiệt độ từ 440^oC đến 1100^oC không xảy ra việc giảm khối lượng mẫu. Điều này cho thấy, mẫu HA xốp nhận được bền ở 1100^oC vì nếu HA bị phân huỷ thành $Ca_3(PO_4)_2$, CaO và H_2O dẫn đến khối lượng mẫu sẽ bị giảm do H_2O bay hơi.

- **Độ xốp và độ bền của vật liệu HA**

Bảng số liệu về độ bền nén và độ xốp của vật liệu HA chế tạo từ mai mực:

Mẫu	Tỷ trọng lý thuyết ρ_{LT} (g/cm^3)	Tỷ trọng biểu kiến ρ_{BK} (g/cm^3)	Độ xốp tổng P_t (%)	Độ bền nén (MPa)
MM_0	2,830	0,151	94,6	12,3
MM_{180}	3,156	0,130	95,4	4,5
MM_{1000}	3,156	0,177	94,4	15,0

Bảng trên cho thấy độ xốp của khung xương mai mực ban đầu, HA xốp và gốm HA ít thay đổi trong quá trình chế tạo, dao động trong khoảng ~ 95%. Tromg đó MM_0 là ký hiệu mẫu mai mực ban đầu, MM_{180} và MM_{1000} tương ứng với mẫu HA xốp nhận được sau phản ứng thuỷ nhiệt (ở 180^oC) và sau khi nung thiêu kết (ở 1000^oC). Sau phản ứng thuỷ nhiệt, độ bền nén của mai mực giảm từ 15Mpa xuống còn 4,5MPa, do các hạt HA không liên kết với nhau. Sau khi nhúng tẩm khung xốp HA bằng chất kết dính cùng với 5% β-$Ca_3(PO_4)_2$ và thiêu kết ở 1000^oC, các hạt HA liên kết với nhau tạo thành gốm. Do vậy độ bền của nó tăng từ 4,5Mpa lên đến 12,3Mpa.

KẾT LUẬN

Đã tổng hợp được hydroxyapatit đơn pha dạng khối xốp, bằng phương pháp phản ứng thuỷ nhiệt từ khung xốp tự nhiên của mai mực. Các đặc trưng XRD và FTIR của mẫu HA tổng hợp được cơ bản phù hợp với mẫu chuẩn của NIST.

Điều kiện thích hợp cho phản ứng thuỷ nhiệt là: nhiệt độ 180^{o}C, áp suất 12 atm và thời gian phản ứng 24 giờ. Nhiệt độ thiêu kết tạo gốm là 1000^{o}C, với thời gian 1 giờ.

Cấu trúc dạng khung xốp của sản phẩm HA sau phản ứng thuỷ nhiệt và sau khi thiêu kết vẫn giữ nguyên như khung xốp của mai mực tự nhiên và được cấu tạo bởi các hạt HA kích thước 0.2 – 0.3 μm liên kết với nhau tạo thành gốm. Giữa các hạt tồn tại các lỗ xốp liên thông ba chiều, kích thước lỗ xốp khoảng 0.1 – 0.2 μm.

Gốm HA có độ xốp tổng cỡ khoảng 95%, độ bền nén khoảng 12Mpa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. G. Verde-Carvallo, A. Guarino, G. González, *Mineralization of Hydroxyapatite over Collagen Type I,* European Cells and Materials Vol. 7. Suppl. 2, 2004, p.58-59 ISSN 1473-2262
2. H. S. Liu,T. S. Chin, L. S. Lai, S. Y. Chiu, K. H. Chung, C. S. Chang & M. T. Lui, *Hydroxyapatite synthesized by a simplified hydrothermal method*, Ceramics International 23 (1997), p. 19-25
3. Kazue Yamagishi, Kazuo Onuma, Takashi Suzuki, Fumio Okada, Junji Tagami, Masayuki Otsuki, Pisol Senawangse, *A synthetic enamel for rapid tooth repair*, Nature, Vol. 433 (2005), p. 819
4. D. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz and M. Epple, *Biomaterials*, 25 (2004) 3335
5. R. Murugan and S. Ramakrishna, *Development of Cell-Responsive Nanophase Hydroxyapatite for Tissue Engineering*, American Journal of Biochemistry and Biotechnology 3 (3): p. 118-124, 2007, ISSN 1553-3468
6. D. M . Roy and S. K. Linnehan, Nature, 247 (1974) 220
7. Ch. Kasperk, R. Evers. Zahnaertzl, *Implant*, 2 (1986) 234
8. M.S Sivakumar, T. S Sampath, K.L Kuwar, K.Shanta, Rao Panduraga, *Biomaterials*, 17 (1996) p.1709
9. S. Orlić, H. Ivanković, and E.Tkalčec, *Preparation of higly porous hydroxyapatite ceramics from cuttlefish bone*, University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology, Zagreb, Croatia
10. C. R. Kothapalli, M. T. Shaw and M. Wei, *Biodegradable HA-PLA 3-D porous scaffolds: Effect of nano-sized filler content on scaffold properties*, Acta Biomaterialia, (2005) 1, p. 653-662
11. H. G. Rocha, A. F. Lemos, S. Kannan, S. Agathopoulos and J. M. F. Ferreira, *Hydroxyapatite scaffolds hydrothermally grown from aragonitic cuttlefish Bones*, Received 19th July 2005, Accepted 22nd September 2005
12. Certificate of Analysis, *Standard Reference Material 2910,* National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA (1997)

Abstract: *The hydrothermal method was used for prepararing porous hydroxyapatite scaffolds grown directly from Cuttlefish bones. Porous hydroxyapatite obtained before and after sintering at 1000^{o}C were characterized by techniques including Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), Scanning electron microscopy (SEM) and thermogravimetric analysis (TGA).Total porosity was caculated. They have porous scaffold structure like as scaffold of natural Cuttlefish bones.*

Key words: porous hydroxyapatite scaffold, hydrothermal method, Cuttlefish bone, XRD, SEM, FTIR, TGA.