

NGHIÊN CỨU GẮN KẾT COLLAGEN DA CÁ TRA LÊN BỀ MẶT HYDROXYAPATITE TỪ XƯƠNG CÁ TRA

Hồ Quốc Phong^{1*}, Võ Ngọc Gia Ngân¹, Huỳnh Liên Hương¹, Yasuaki Takagi², Lê Thị Minh Thủy³ và Nguyễn Việt Bách¹

¹Khoa Công nghệ, Trường Đại học Cần Thơ

²Faculty of Fisheries Sciences, Hokkaido University, Japan

³Khoa Thủy sản, Trường Đại học Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Hồ Quốc Phong (email: hqphong@ctu.edu.vn)

Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 18/12/2020

Ngày nhận bài sửa: 17/02/2021

Ngày duyệt đăng: 25/06/2021

Title:

Study on grafting collagen of catfish skin on hydroxyapatite from catfish bone

Từ khóa:

Collagen, gắn kết bề mặt, hydroxyapatite, vật liệu y sinh, xương cá tra

Keywords:

Biomedical materials, catfish bone, collagen, hydroxyapatite, surface grafting

ABSTRACT

The study was conducted to graft collagen extracted from catfish skin (*Pangasiidae*) onto surface of hydroxyapatite (HA) synthesized from catfish bone in order to increase its applications in biomedical field. After extracting from catfish skin, collagen was grafted onto the HA surface by using glutaraldehyde as a bridge. HA particles were firstly grafted to 3 - amino propyl triethoxysilane (APTES) to form amine functional groups on the surface. Glutaraldehyde was then used as bonding bridge to graft HA and collagen through the reaction between amine and aldehyde. Factors affecting the grafting efficiency such as collagen concentration, time and temperature of the reaction were investigated. Experimental results showed that solution of 1 mg/mL collagen, reaction time of 3 hours and reaction temperature of 37°C are suitable conditions for grafting collagen onto surface of HA. In addition, the SEM images showed that size of HA particles was approximately 1,000 nm and covered by a layer of collagen after grafting.

TÓM TẮT

Nghiên cứu được tiến hành nhằm gắn kết collagen trích ly từ da cá tra (*Pangasiidae*) lên bề mặt hydroxyapatite (HA) tổng hợp từ xương cá tra làm tăng khả năng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh. Sau khi trích ly, collagen được gắn kết lên bề mặt HA thông qua cầu nối glutaraldehyde. Các hạt HA trước tiên gắn kết với 3 - amino propyl triethoxysilane (APTES) tạo nhóm chức amine trên bề mặt. Glutaraldehyde là cầu nối gắn kết HA và collagen thông qua phản ứng giữa nhóm chức amine và aldehyde. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự gắn kết như nồng độ collagen, pH dung dịch phản ứng, thời gian và nhiệt độ của phản ứng được tiến hành khảo sát. Kết quả thí nghiệm cho thấy nồng độ collagen 1 mg/mL, dung dịch acetic acid hòa tan collagen có pH 3, thời gian phản ứng 3 giờ và nhiệt độ phản ứng 37°C là điều kiện thích hợp để tiến hành gắn kết. Ngoài ra, kết quả chụp SEM cho thấy rằng các hạt HA được chế tạo có kích thước khoảng 1.000 nm và bị phủ một lớp collagen sau khi gắn kết.

1. GIỚI THIỆU

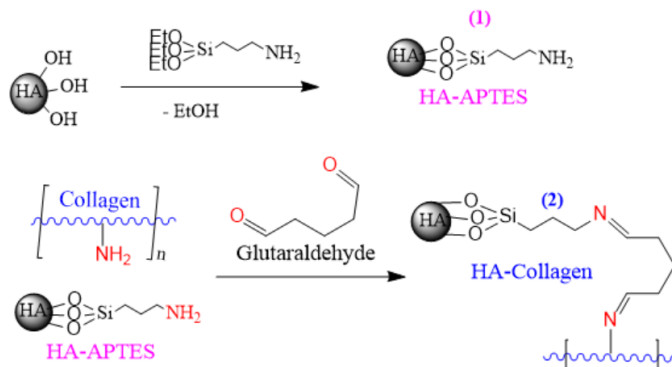
Hydroxyapatite (HA) có công thức hóa học $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, là thành phần khoáng vô cơ quan trọng, chiếm 60-70% trọng lượng xương người và động vật (Mostafa, 2005; Sobczak, Kowalski, & Wzorek, 2009). Đây là vật liệu tiềm năng có thể được sử dụng trong lĩnh vực y học do tính tương thích sinh học tốt của chúng đối với tế bào khi cấy ghép. HA có thể được tổng hợp bằng nhiều phương pháp khác nhau như sol-gel, ngưng tụ hóa học, thủy nhiệt và vi nhũ tương (Barakat et al., 2008), từ các tiền chất khác nhau như CaO, $Ca(NO_3)_2$, $CaHPO_4$, $CaCO_3$, $Ca(OH)_2$, P_2O_5 , $CaCl_2$, $CaSO_4$ và $(NH_4)_2HPO_4$ (Sadat-Shojai, Khorasani, Dinpanah-Khoshdargi, & Jamshidi, 2013). Ngoài ra, HA còn có thể điều chế từ các nguồn nguyên liệu tự nhiên như vỏ sò, vỏ trứng, san hô, và xương động vật.

HA là một loại khoáng vô cơ nên có nhiệt độ nóng chảy rất cao và bề mặt khá trơ nên việc tạo hình và ứng dụng chúng là một thử thách đối với các nhà nghiên cứu. HA có thể dùng để chế tạo bioceramic và tiến hành ở nhiệt độ rất cao (1.300–1.400°C), ở đó quá trình thiêu kết thể xảy ra làm cho vật liệu rắn chắc. Tuy nhiên, bên cạnh đó khối vật liệu trở nên giòn dễ vỡ và hoạt tính sinh học ít nhiều bị thay đổi. Ngoài ra, HA có thể được sử dụng như là thành phần cốt liệu để đưa vào các loại polymer tổng hợp nhằm để tăng cường cơ tính và khả năng tương hợp sinh học của chúng khi chế tạo thành các vật liệu sử dụng trong lĩnh vực y sinh. Do bề mặt của HA khá trơ nên sự liên kết giữa HA và polymer rất kém dẫn đến không làm tăng cơ tính của polymer thậm chí còn làm giảm khi đưa HA vào nền polymer.

Chính vì thế, bề mặt HA cần được hoạt hóa hay gắn kết một số nhóm chức nhằm tăng cường khả năng liên kết của chúng với polymer. Collagen là

polymer tự nhiên được xem như hợp chất tiềm năng có thể kết hợp lên bề mặt HA nhằm làm tăng khả năng liên kết với polymer và đồng thời làm tăng cường tương thích sinh học so với các thành phần riêng lẻ từ đó làm tăng tính ứng dụng của HA (Yoshimura & Byrappa, 1994). Sự gắn kết giữa HA và collagen được thực hiện qua một số phương pháp như tạo mầm tinh thể HA trên sợi collagen (Traub, Arad, & Weiner, 1989; L. Zhang et al., 2010), đồng kết tủa (Kikuchi et al., 2004; Sato, Kumagai, & Tanaka, 2000) và liên kết ngang (cross-linking) (Zeeman, Feijen, & Dijkstra, 1998). Tuy nhiên, phương pháp tạo mầm tinh thể và đồng kết tủa không thể vừa gắn kết với collagen và vừa cho HA có độ tinh khiết cao. Vì thế, phương pháp liên kết ngang đã được sử dụng và đây là phương pháp sử dụng để gắn kết các phân tử như protein hay các hoạt chất lên bề mặt các vật liệu trơ như nano- Fe_2O_3 ứng dụng trong dẫn truyền thuốc (Chen et al., 2012).

Tương tự, Fe_2O_3 , bề mặt của HA tương đối trơ về mặt hóa học đối với các hợp chất có hoạt tính sinh học chẳng hạn collagen vì thế không thể gắn kết trực tiếp collagen lên bề mặt HA. Do đó để gắn kết collagen lên bề mặt HA, nghiên cứu tiến hành theo các bước được mô tả như Hình 1. Bước đầu, bề mặt HA được phản ứng gắn kết APTES, tạo sản phẩm HA-APTES mang nhóm chức amine trên bề mặt. Tiếp theo, phân tử glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$) mang hai nhóm chức CHO ở hai đầu, có nhiệm vụ là cầu liên kết phân tử collagen lên bề mặt HA-APTES thông qua phản ứng giữa các nhóm CHO và amin. Sự gắn kết của APTES lên bề mặt của HA và collagen lên bề mặt của HA-APTES được đánh giá bằng phương pháp phân tích phổ hồng ngoại FT-IR và hình thái bề mặt của HA trước và sau khi gắn kết được đánh giá bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM).



Hình 1. Sơ đồ mô tả gắn kết collagen lên bề mặt HA

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Hóa chất

Xương và da cá tra (*Pangasius hypophthalmus*) được cung cấp từ nhà máy chế biến thủy sản thuộc khu công nghiệp Trà Nóc. Các hóa chất như NaOH, H₃PO₄, NH₃, HCl, NaCl, Glutaraldehyde (GA), Phosphate-buffered saline (PBS), (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES), Cồn và enzyme pepsin được cung cấp bởi công ty Merck (Việt Nam).

2.2. Điều chế hydroxyapatite từ xương cá tra

Xương cá tra sau khi thu mua sẽ được rửa sạch và hầm trong 4-6 giờ để loại bỏ thịt và mỡ. Mẫu xương sau đó được xử lý trong dung dịch NaOH 0.1 M trong 24 giờ để loại bỏ béo, protein trên xương. Mẫu được tiếp tục rửa với nước, sấy khô ở 100°C và nung 900°C trong 6 giờ để loại bỏ hết tạp chất hữu cơ còn lại trong xương. Mẫu xương cá sau khi nung được nghiền tạo thành bột với kích thước khoảng 5-10 μm sử dụng máy nghiền bi siêu tốc. Bột xương cá (BXC) phản ứng với dung dịch H₃PO₄ 60 mM với tỉ lệ 1/10 (g/mL), nhiệt độ phản ứng 90°C, pH 11 (NH₃ được sử dụng để điều chỉnh pH) và khuấy đều trong 2 giờ. Hỗn hợp sau đó được đưa về nhiệt độ phòng và giữ ổn định 24 giờ, lọc và sấy khô ở nhiệt độ 100°C. Mẫu được tiếp tục nung ở nhiệt độ 1000°C nhằm ổn định cấu trúc sản phẩm HA.

2.3. Trích ly collagen từ da cá tra

Collagen được trích ly từ da cá tra bằng enzyme pepsin (Singh, Benjakul, Maqsood, & Kishimura, 2011). Giai đoạn xử lý sơ bộ: mẫu da cá tra nguyên liệu sau khi thu mua từ nhà máy được rửa sạch với nước cất, cắt nhỏ kích thước khoảng 2 cm × 2 cm và xử lý trong dung dịch NaOH 0,1 M với tỉ lệ da cá/ dd NaOH = 1:10 g/mL trong 6 giờ, tốc độ khuấy 300 vòng/phút. Dung dịch NaOH được thay mỗi 2 giờ nhằm tăng khả năng loại khoáng và béo. Sau 6 giờ, mẫu được lấy ra và rửa sạch với nước cất cho đến pH trung tính và tiếp tục được khuấy với ethanol 99,5% tỉ lệ 1:10 g/mL trong 24 giờ, tốc độ 300 vòng/phút.

Sau khi xử lý sơ bộ, mẫu sẽ được cắt nhỏ với kích thước khoảng 0,5 cm × 0,5 cm và trích ly trong dung dịch HCl pH 2 chứa 0,1% pepsin với tỉ lệ da cá/ dd HCl = 1:40 g/mL, thời gian 48 giờ và tốc độ khuấy 300 vòng/phút. Sau khi lọc bỏ bã bằng màng vải, dung dịch được kết tủa bằng NaCl 1 M và lọc ở 10°C thu lấy phân kết tủa. Để loại bỏ NaCl, kết tủa được hòa tan bằng dung dịch HCl pH 2 với tỉ lệ 1:20 g/mL, cho vào ống thẩm tách và tiến hành thẩm tách với nước cất trong 24 giờ, tốc độ 400 vòng/phút.

Thay nước cất 6 lần, mỗi lần cách nhau 4 giờ để tăng hiệu quả thẩm tách. Sau 24 giờ thẩm tách sẽ thu được dung dịch collagen. Mẫu collagen thu được sau khi sấy bằng phương pháp sấy đông khô. Trong đó, lưu ý các giai đoạn xử lý và trích ly phải được thực hiện ở nhiệt độ thấp 4°C nhằm tránh sự biến tính của nguyên liệu.

2.4. Gắn kết collagen lên bề mặt hydroxyapatite

Collagen được gắn kết lên bề mặt HA theo phương pháp hai giai đoạn (Sionkowska & Kozłowska, 2013): (i) gắn kết APTES lên bề mặt HA thu được HA-APTES và (ii) gắn kết collagen lên bề mặt HA-APTES thu HA-collagen (Hình 1). Giai đoạn i, HA nồng độ 1/25 (g/mL) trong ethanol tinh khiết được đánh siêu âm 5 phút và huyền phù sau đó được đặt trong bể đun nhiệt 70°C và khuấy tốc độ 300 v/p. Dung dịch huyền phù HA phản ứng với APTES ở nồng độ 0,2 M, hàm lượng nước 0,75%, thời gian 12 giờ, ở nhiệt độ 70°C. Sau phản ứng, hỗn hợp được lọc chân không và rửa 3 lần với nước cất và ethanol nhằm loại bỏ phần APTES còn thừa và sau đó được sấy ở 60°C trong khoảng 24 giờ thu được HA-APTES.

Giai đoạn (ii) gắn collagen, HA-APTES được phân tán vào dung dịch phosphate buffer saline (PBS) tỉ lệ 1:25 (g/mL) và phản ứng với glutaraldehyde (GA) ở nồng độ 0,25 M, thời gian 1 giờ, ở nhiệt độ 30°C. Hỗn hợp được lọc rửa 3 lần với PBS để loại bỏ phần GA còn thừa và sấy khoảng 1 giờ thu được hạt HA-APTES-GA. Để gắn kết collagen, hạt HA-APTES-GA sau đó được phân tán vào trong dung dịch collagen được hòa tan trong acetic acid, khuấy đều với tốc độ 300 rpm. Collagen sẽ phản ứng gắn kết lên bề mặt HA thông qua nối GA tạo thành HA-collagen (Hình 1). Các thí nghiệm được tiến hành theo phương pháp luân phiên từng biến. Các yếu tố ảnh hưởng đến sự gắn kết được khảo sát gồm nồng độ collagen thay đổi từ 0,25-1 mg/mL, thời gian phản ứng (30-120 phút), pH acetic acid (2-4), nhiệt độ phản ứng (4-37°C). Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần để đảm bảo độ lặp lại của kết quả.

2.5. Phương pháp phân tích

2.5.1. Phương pháp nhiễu xạ tia X

Thành phần pha của sản phẩm được xác định bằng phương pháp nhiễu xạ tia X (XRD), dòng máy D8 Advance của hãng Bruker (CHLB Đức), với góc quét 2θ WL = 1.54060 quét từ 10 - 60°, bước đo 0.01 độ/phút. Thiết bị hoạt động ở hiệu điện thế U = 40 kV và cường độ dòng điện I = 30 A. Kích thước tinh thể trung bình được xác định bằng công thức

Scherrer dựa vào giản đồ XRD. Cấu trúc của mẫu HA tổng hợp được đánh giá khi so với thẻ chuẩn ICDD (International Centre for Diffraction Data) (01-080-6199) và thẻ chuẩn JCPDS 9-0432 (Y. Zhang, Lu, & Yang, 2012). Trong đó, các peak đặc trưng của HA tương ứng với các mặt tinh thể có chỉ số Miller (211), (002), (112), (300), (202) và (301) sẽ được quan tâm so sánh.

2.5.2. Phân tích kính hiển vi điện tử quét

Hình thái và kích thước hạt của sản phẩm HA được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét (SEM). Phương pháp được thực hiện trên dòng máy HITACHI S-4800 (Nhật Bản). Thông số thiết bị vận hành ở mức điện áp gia tốc U từ 0.5 - 30 kV, độ phân giải $\delta = 1$ nm và độ phóng đại từ X25 - X800000 lần.

2.5.3. Phân tích phổ hồng ngoại FTIR

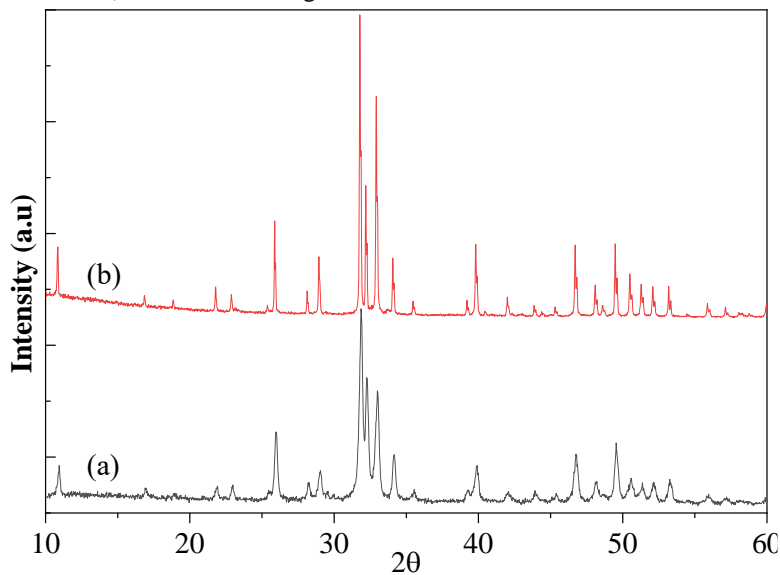
Hiệu quả gắn kết được đánh giá thông qua sự xuất hiện các nhóm chức trên HA, HA-APTES và HA-collagen được xác định bằng phổ hồng ngoại (FTIR, Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR Spectrometer, United States) với bước sóng từ

4000–400 cm^{-1} , độ phân giải 4 cm^{-1} . Mẫu được trộn KBr với tỉ lệ 1%, ép thành film mỏng sau đó tiến hành đo và phổ phân tích được xử lý bằng phần mềm OMNIC theo máy. Các peak đặc trưng và cường độ peak được so sánh đánh giá hiệu quả gắn kết của APTES, GA và collagen với HA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Điều chế hydroxyapatite từ xương cá

Xương cá tra sau khi xử lý nhiệt được nghiền tạo thành bột xương cá (BXC) và chuyển hóa thành hydroxyapatite (HA) theo phương pháp đã được đề cập. Kết quả phân tích XRD (Hình 2) cho thấy rằng phổ nhiễu xạ của mẫu HA xuất hiện các peak đặc trưng tại góc $2\theta = (25.9; 28; 28.9; 31.9; 32.2; 32.9; 34.1; 39.8; 46.7; 48.1; 49.5; 50.6; 51.3; 52.1; 53.2)$. Khi so sánh phổ nhiễu xạ của mẫu HA với thẻ chuẩn ICDD (International Centre for Diffraction Data) (01-080-6199) hay JCPDS 9-0432 (Y. Zhang et al., 2012) và phổ nhiễu xạ của mẫu HA cung cấp bởi hãng Merck cho thấy rằng có độ tương đồng rất cao vì vậy có thể nói rằng đã chế thành công HA từ xương cá.

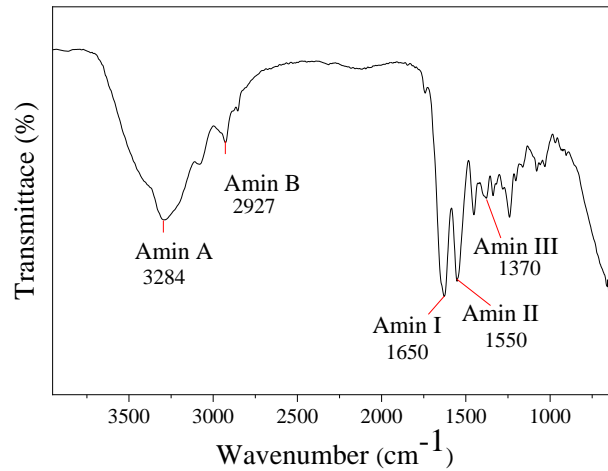


Hình 2. Phổ nhiễu xạ tia X (XRD) mẫu: (a) HA cung cấp từ hãng Merck và (b) HA tổng hợp từ xương cá tra

3.2. Trích ly collagen từ da cá tra

Da cá sau khi xử lý sơ bộ và trích ly trong dung dịch HCl pH 2 chứa 0,1 % pepsin với tỉ lệ 1:40 g/mL, thời gian 48 giờ và tốc độ khuấy 300 vòng/phút theo quy trình đã được đề cập. Mẫu collagen sau khi trích ly được tiến hành phân tích

phổ hồng ngoại (FTIR). Kết quả phân tích (Hình 3) cho thấy mẫu phổ hồng ngoại của mẫu collagen tồn tại các peak đặc trưng tại bước sóng hấp thụ 3284, 2927, 1650, 1550 và 1370 cm^{-1} tương ứng với các dao động của amine A, amine B, amine bậc I, II, III (Singh et al., 2011).

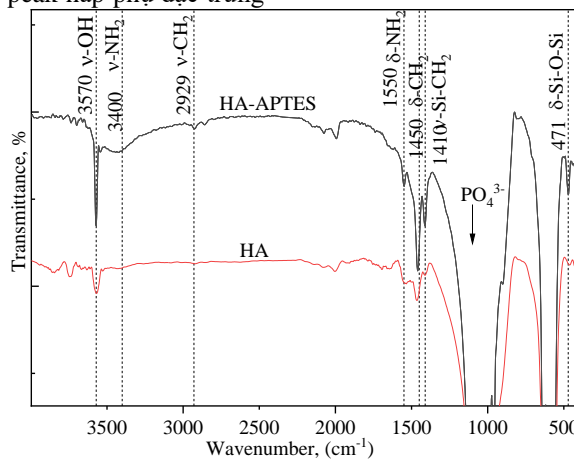


Hình 3. Phổ FTIR của collagen trích ly từ cá tra

3.3. Gắn kết APTES lên bề mặt của hydroxyapatite

APTES (3 – amino propyl triethoxysilane) là tác nhân hoạt hóa bề mặt cho nhiều vật liệu khác nhau như TiO₂, SiO₂ và Fe₃O₄ (Chen et al., 2012; Meroni et al., 2016; Song, Hildebrand, & Schmuki, 2010). Trong nghiên cứu này, HA được gắn kết bằng APTES theo phương pháp như đã được trình bày phần thực nghiệm nhằm tạo gốc amine gắn kết collagen (Hình 1). Trong đó HA nồng độ 1/25 (g/mL) trong ethanol tinh khiết phản ứng với APTES ở nồng độ 0,2 M, hàm lượng nước 0,75%, thời gian 12 giờ, ở nhiệt độ 70°C nhằm thu được HA-APTES. Kết quả phân tích phổ phân tích hồng ngoại (Hình 4) cho thấy rằng mẫu HA ban đầu được đặc trưng bởi peak hấp phụ ở 3570 cm⁻¹ tương ứng cho liên kết OH và peak hấp phụ 1046, 962, 601 và 571 cm⁻¹ tương ứng cho 4 peak hấp phụ đặc trưng

stretching của ion ν-PO₄³⁻. Khi mẫu HA được gắn kết phân tử APTES thì phổ FTIR xuất hiện các peak đặc trưng của APTES với các peak hấp phụ tại 3400 cm⁻¹ và 1550 cm⁻¹ tương ứng hấp phụ stretching và bending của nhóm NH₂, cùng với peak hấp phụ tại 2929 cm⁻¹ và 1450 cm⁻¹ tương ứng hấp phụ stretching và bending của CH₂. Ngoài ra, sự xuất hiện peak hấp phụ tại bước sóng 1410 cm⁻¹ và 471 cm⁻¹ tương ứng là đặc trưng cho dao động bending CH₂-Si và stretching của liên kết Si-O-Si là liên kết mới được hình thành trong quá trình gắn kết giữa HA và APTES từ phản ứng polymer hóa (Chang & Tanaka, 2002; Goonasekera, Jack, Cooper-White, & Grøndahl, 2013). Vì thế APTES đã gắn thành công lên bề mặt HA bằng sự xuất hiện các peak đặc trưng ở 3400 cm⁻¹, 2929 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹, 1410 cm⁻¹ và 471 cm⁻¹ tương ứng cho các liên kết của các nhóm NH₂, CH₂, CH₂-Si và Si-O-Si.

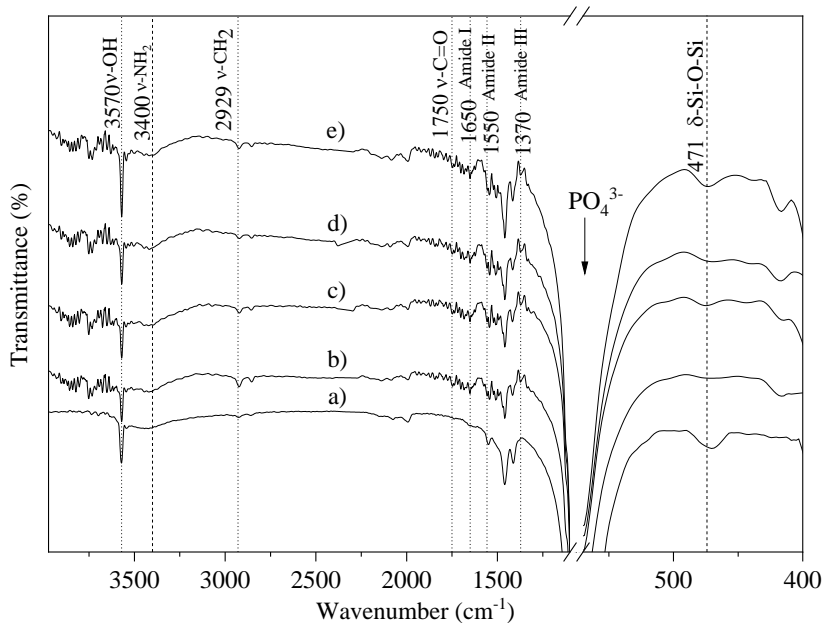


Hình 4. Phổ FTIR của mẫu HA và HA-APTES. Điều kiện tạo mẫu: HA ethanol 1/25 (g/mL), APTES 0,2 M, hàm lượng nước 0,75%, 12 giờ phản ứng và nhiệt độ 70°C

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ collagen đến khả năng gắn kết lên bề mặt HA

Để gắn kết collagen, HA-APTES được phân tán vào dung dịch phosphate buffer saline (PBS) tỉ lệ 1:25 (g/mL) và phản ứng với glutaraldehyde (GA) ở nồng độ 0,25 M, thời gian 1 giờ, ở nhiệt độ 30°C. Hỗn hợp được lọc rửa 3 lần với PBS để loại bỏ phần GA còn thừa và sấy khoảng 1 giờ thu được hạt HA-APTES-GA. Các hạt này tiếp tục được sử dụng gắn kết với collagen để tạo thành HA-collagen thông qua cầu nối aldehyde của GA. Các thí nghiệm được tiến hành ở các nồng độ collagen thay đổi từ 0,25 – 1 mg/mL để khảo sát ảnh hưởng của nồng độ collagen đến quá trình gắn kết. Yếu tố cố định: thời gian phản ứng 60 phút, dung dịch acetic acid hòa tan collagen có pH=3, thời gian gắn kết 1 giờ, nhiệt độ phản ứng 30°C. Kết quả phân tích FT-IR mẫu sau khi gắn kết

(Hình 5) cho thấy bên cạnh sự hiện diện các peak đặc trưng của HA-APTES còn có sự xuất hiện của các peak tại bước sóng 1628 cm⁻¹, 1550 cm⁻¹ và 1370 cm⁻¹ là các peak đặc trưng của amine I, amine II, amine III và peak ở 1750 cm⁻¹ đặc trưng cho nhóm chức C=O của GA (Barth & Zscherp, 2002; Coates, 2006). Qua đó có thể nói rằng đã gắn kết thành công cho collagen gắn vào bề mặt phân tử HA. Ngoài ra, phổ FTIR (Hình 5) cũng cho thấy rằng nồng độ collagen càng cao, quá trình gắn kết diễn ra tốt hơn. Khi nồng độ collagen tăng lên thì cường độ peak của các nhóm amine có xu hướng tăng có nghĩa là khả năng gắn kết tốt hơn vì nồng độ collagen tăng lên thúc đẩy quá trình gắn kết diễn ra nhanh chóng, động học phản ứng tăng lên (Azami, Rabiee, & Moztarzadeh, 2010). Kết quả phân tích trên cho thấy rằng nồng độ collagen ở 1 mg/mL cho kết quả gắn kết tốt nhất.



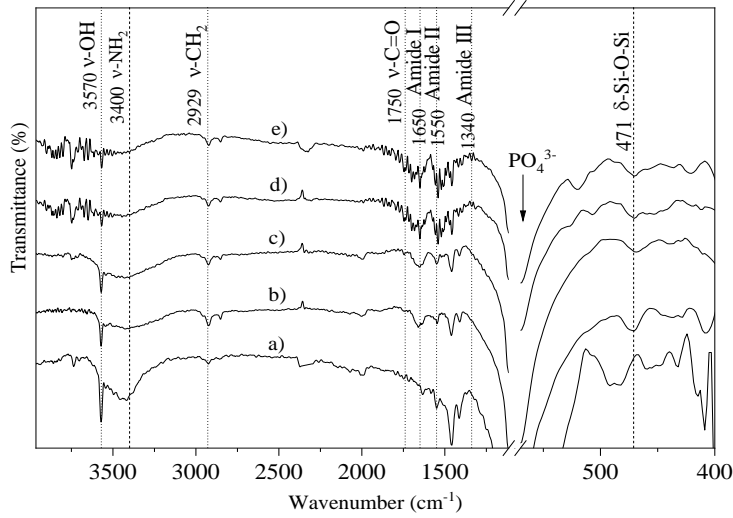
Hình 5. Phổ FTIR của các mẫu HA gắn kết với collagen ở các nồng độ khác nhau

a) 0 mg/mL; b) 0,25 mg/mL; c) 0,5 mg/mL; d) 0,75 mg/mL; e) 1 mg/mL. Các yếu tố cố định: HA-APTES/dd PBS = 1/25 (g/mL), thời gian phản ứng gắn kết 60 phút; dung dịch acetic acid hòa tan collagen có pH 3, nhiệt độ 30°C

Ảnh hưởng của thời gian đến khả năng gắn kết collagen với HA

Khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng gắn kết thí nghiệm được tiến hành ở các khoảng thời gian khác nhau thay đổi từ 1–5 giờ. Trong đó, nồng độ collagen 1 mg/mL, dung dịch acetic acid pH 3, nhiệt độ phản ứng 30°C sẽ được cố định. Kết quả

phân tích FTIR mẫu sau khi gắn kết cho thấy rằng khi thời gian phản ứng tăng lên từ 1–3 giờ thì cường độ peak ở 1628 cm⁻¹ của nhóm amine I tăng lên rõ rệt (Hình 6a-c). Tuy nhiên khi thời gian tăng lên 4–5 giờ thì các peak hấp thụ bị nhiễu và trở nên không rõ rệt (Hình 6d-e). Điều này cho thấy thời gian 3 giờ là thời gian phù hợp để gắn kết collagen với HA.



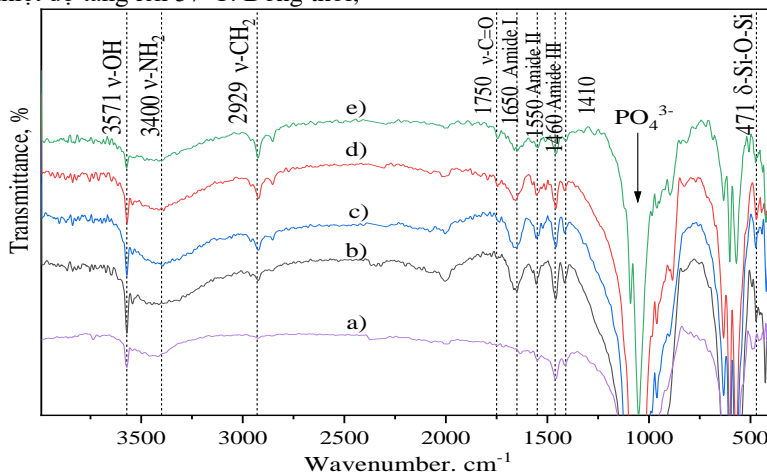
Hình 6. Phổ FTIR của các mẫu HA gắn kết collagen với mốc thời gian khác nhau

a) 1 giờ; b) 2 giờ; c) 3 giờ; d) 4 giờ; e) 5 giờ. Các yếu tố cố định: HA-APTES/dd PBS = 1/25 (g/mL), dung dịch acetic acid hòa tan collagen có pH 3, nồng độ collagen 1g/mL, nhiệt độ 30°C.

3.5. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến khả năng gắn kết collagen lên bề mặt HA

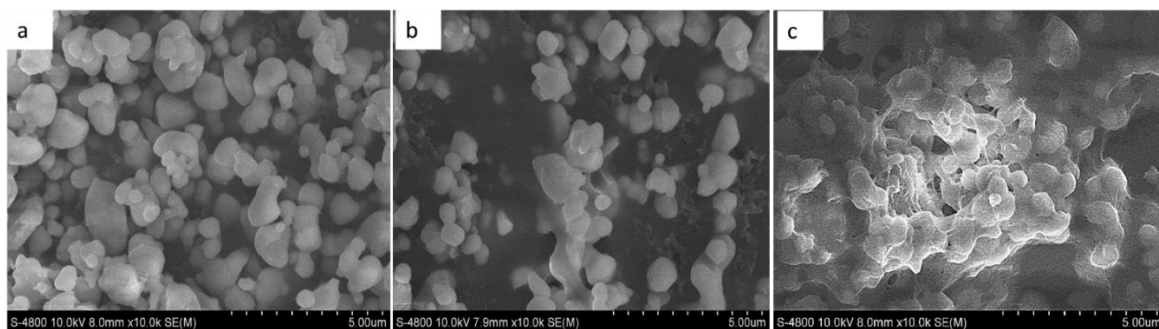
Phản ứng gắn kết collagen được tiến hành ở các nhiệt độ từ 4–37°C trong đó nồng độ collagen 1 mg/mL, thời gian phản ứng 3 giờ, dung dịch acetic acid hòa tan collagen có pH=3. Kết quả phân tích FT-IR mẫu sau khi gắn kết cho thấy rằng nhiệt độ càng cao thì quá trình gắn kết các phân tử collagen lên bề mặt hạt HA-APTES-GA diễn ra tốt hơn. Tín hiệu của các nhóm amine bậc I và III tăng khi nhiệt độ tăng từ 4 đến 37°C. Ở 4°C tín hiệu 1740 cm⁻¹ của nhóm C=O của GA có cường độ cao nhất và cường độ giảm dần khi nhiệt độ tăng lên 37°C. Đồng thời,

tín hiệu nhóm imin (-C=N-) tăng dần khi nhiệt độ tăng từ 4 đến 37°C. Điều này là do khi nhiệt độ tăng lên đã làm tăng tốc độ phản ứng của các nhóm amine của phân tử collagen với nhóm -CHO có trong GA. Từ phân tích trên cho thấy rằng điều kiện 37°C tối ưu cho quá trình gắn kết collagen vào phân tử HA-APTES-GA. Kết quả chụp SEM cho thấy rằng so với HA chưa gắn kết (Hình 8a), bề mặt HA gắn kết APTES xuất hiện một lớp mỏng phủ lên bề mặt (Hình 8b) và bề mặt HA khi gắn kết collagen có sự xuất hiện lớp phủ dày trên bề mặt (Hình 8c) vì thế một lần nữa khẳng định thêm sự gắn kết thành công collagen trên bề mặt HA.



Hình 7. Phổ FT-IR của các mẫu HA-APTES-GA-Col ở nhiệt độ phản ứng khác nhau

a) HA-APTES, b) 4°C, c) 20°C, d) 30°C, e) 37°C. Các yếu tố cố định: HA-APTES/dd PBS = 1/25 (g/mL), dung dịch acetic acid hòa tan collagen có pH 3, nồng độ collagen 1g/mL, thời gian phản ứng 3 giờ



Hình 8. Ảnh SEM của mẫu: a) HA từ xương cá, b) HA-APTES, c) HA-Collagen

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu cho thấy rằng có thể trích ly collagen từ da cá tra và gắn kết chúng lên bề mặt hydroxyapatite được điều chế từ xương cá. Trong đó điều kiện gắn kết hiệu quả, thời gian phản ứng 3 giờ, dung dịch acetic acid pH 3, nhiệt độ phản ứng 37°C và nồng độ collagen 1 mg/mL. Kết quả nghiên cứu chứng tỏ rằng có thể hoạt hóa bề mặt hydroxyapatite bằng protein nhằm tăng cường khả năng tương tác với polymer và hoạt tính sinh học của vật liệu từ đó mở ra nhiều hướng ứng dụng trong lĩnh vực y sinh.

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin cảm ơn Dự án Nâng cấp Trường Đại học Cần Thơ VN14-P6 bằng nguồn vốn vay ODA từ Chính phủ Nhật Bản (MSĐT: F4-4) đã tài trợ kinh phí để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Azami, M., Rabiee, M., & Moztafzadeh, F. (2010). Glutaraldehyde crosslinked gelatin/hydroxyapatite nanocomposite scaffold, engineered via compound techniques. *Polymer Composites*, 31(12), 2112-2120.

Barakat, N. A. M., Khalil, K. A., Sheikh, F. A., Omran, A. M., Gaihre, B., Khil, S. M., & Kim, H. Y. (2008). Physicochemical characterizations of hydroxyapatite extracted from bovine bones by three different methods: Extraction of biologically desirable HAp. *Materials Science and Engineering: C*, 28(8), 1381-1387.

Barth, A., & Zscherp, C. (2002). What vibrations tell about proteins. *Quarterly reviews of biophysics*, 35(4), 369-430.

Chang, M. C., & Tanaka, J. (2002). FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*, 23(24), 4811-4818.

Chen, W., Cao, Y., Liu, M., Zhao, Q., Huang, J., Zhang, H., . . . Zhang, Z. (2012). Rotavirus capsid surface protein VP4-coated Fe₃O₄ nanoparticles as a theranostic platform for

cellular imaging and drug delivery. *Biomaterial*, 33(31), 7895-7902.

Coates, J. (2006). Interpretation of infrared spectra, a practical approach. *Encyclopedia of analytical chemistry: applications, theory*.

Goonasekera, C. S., Jack, K. S., Cooper-White, J. J., & Grøndahl, L. (2013). Attachment of poly (acrylic acid) to 3-aminopropyltriethoxysilane surface-modified hydroxyapatite. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(42), 5842-5852.

Kikuchi, M., Ikoma, T., Itoh, S., Matsumoto, H. N., Koyama, Y., Takakuda, K., . . . & Tanaka, J. (2004). Biomimetic synthesis of bone-like nanocomposites using the self-organization mechanism of hydroxyapatite and collagen. *Composites Science and Technology*, 64(6), 819-825.

Meroni, D., Lo Presti, L., Di Liberto, G., Ceotto, M., Acres, R. G., Prince, K. C., . . . & Ardizzone, S. (2017). A close look at the structure of the TiO₂-APTES interface in hybrid nanomaterials and its degradation pathway: An experimental and theoretical study. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(1), 430-440.

Mostafa, N. Y. (2005). Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes. *Materials Chemistry and Physics*, 94(2-3), 333-341.

Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.-T., Dinpanah-Khoshdargi, E., & Jamshidi, A. (2013). Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures. *Acta biomaterialia*, 9(8), 7591-7621.

Sato, K., Kumagai, Y., & Tanaka, J. (2000). Apatite formation on organic monolayers in simulated body environment. *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials*, 50(1), 16-20.

Singh, P., Benjakul, S., Maqsood, S., & Kishimura, H. (2011). Isolation and characterisation of collagen extracted from the skin of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Food Chemistry*, 124, 97-105.

- Sionkowska, A., & Kozłowska, J. (2013). Properties and modification of porous 3-D collagen/hydroxyapatite composites. *International journal of biological macromolecules*, 52, 250-259.
- Sobczak, A., Kowalski, Z., & Wzorek, Z. (2009). Preparation of hydroxyapatite from animal bones. *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, 11(4), 23-28.
- Song, Y.-Y., Hildebrand, H., & Schmuki, P. (2010). Optimized monolayer grafting of 3-aminopropyltriethoxysilane onto amorphous, anatase and rutile TiO₂. *Surface Science*, 604(3-4), 346-353.
- Traub, W., Arad, T., & Weiner, S. (1989). Three-dimensional ordered distribution of crystals in turkey tendon collagen fibers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(24), 9822-9826.
- Yoshimura, M., & Byrappa, K. (1994). Hydrothermal processing of hydroxyapatite: past, present, and future. *Journal of Materials Science*, 43(7), 2085-2103.
- Zeeman, R., Feijen, J., & Dijkstra, P. J. (1998). *Cross-linking of collagen-based materials*: Department of Chemical Engineering, University of Twente.
- Zhang, L., Tang, P., Xu, M., Zhang, W., Chai, W., & Wang, Y. (2010). Effects of crystalline phase on the biological properties of collagen–hydroxyapatite composites. *Acta biomaterialia*, 6(6), 2189-2199.
- Zhang, Y., Lu, J., & Yang, S. (2012). Preparation of hydroxyapatite ceramic through centrifugal casting process using ultra-fine spherical particles as precursor and its decomposition at high temperatures. *Journal of Advanced Ceramics*, 1(1), 60-65.