การเตรียมเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินโดยการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตเพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย

สำนักงานวิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นางสาวมนัญญา โอฆวิไล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5070404821

PREPARATION OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN ELECTROSPUN FIBER MATS FOR CONTROLLED RELEASE APPLICATIONS

Miss Manunya Okhawilai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Engineering Program in Chemical Engineering

Department of Chemical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

522133

Title	PREPARATION OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN ELECTROSPUN FIBER MATS FOR CONTROLLED RELEASE APPLICATIONS
By	Miss Manunya Okhawilai
Field of Study	Chemical Engineering
Thesis advisor	Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.
Thesis co-Advisor	Rattaphol Rangkupan, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

..... Dean of the Faculty of Engineering

(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman

(Associate Professor Tharathon Mongkhonsi, Ph.D.)

..... Thesis advisor

(Associate Professor Siriporn Damrongsakkul, Ph.D.)

..... Thesis co-Advisor

(Rattaphol Rangkupan, Ph.D.)

..... Examiner

(Assistant Professor Sorada Kanokpanont, Ph.D.)

..... External Examiner

(Uracha Rungsardthong Ruktanonchai, Ph.D.)

มนัญญา โอฆวิไล : การเตรียมเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินโดยการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตเพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย (PREPARATION OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN ELECTROSPUN FIBER MATS FOR CONTROLLED RELEASE APPLICATIONS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร.รัฐพล รังกุพันธุ์, 84 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเตรียมเส้นใยผสมระหว่างไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบี โดยการปั่นแบบไฟฟ้าสถิตเพื่อประยุกต์ใช้ในการควบคุมการปลดปล่อย จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความต่างศักย์ที่ใช้ในการผลิตเส้นใยเพิ่มมากขึ้น เส้นใยที่ได้มีการกระจายตัวของขนาดเส้นใยลดลง และมีขนาดโดยเฉลี่ยลดลง นอกจากนั้นพบว่าการเพิ่มปริมาณไฟโบรอินไหมไทยในสารละลายผสม มีผลทำให้ขนาดโดยเฉลี่ยของเส้นใยเพิ่มขึ้น โดยสามารถผลิตเส้นใยที่มีความเรียบได้จากส่วนผสมของไฟโบรอินและเจลาตินชนิดบีอัตราส่วน 10/90, 20/80, 30/70, 40/60 และ 50/50 โดยน้ำหนัก ดังนั้นจึงเลือกแผ่นเส้นใยไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบีอัตราส่วน 50/50, 30/70 และ 10/90 โดยน้ำหนัก ไปทำการชลอความสามารถในการละลายน้ำของแผ่นเส้นใยโดยการเชื่อมขวาง ซึ่งพบว่าวิธีการพ่นแผ่นเส้นใยด้วยสารละลาย EDC/NHS แล้วจึงแช่แผ่นเส้นใยในสารละลาย EDC/NHS เดิม เป็นวิธีที่เหมาะสมในการเชื่อมขวางแผ่นเส้นใย เนื่องจากมีน้ำหนักที่หายไปน้อยที่สุดและมีโครงสร้างสัณฐานของแผ่นเส้นใยใกล้เคียงโครงสร้างก่อนกระบวนการเชื่อมขวาง นอกจากนั้นยังพบว่าแผ่นเส้นใยผสมที่มีสัดส่วนปริมาณไฟโบรอินมากจะมีสมบัติทางกลที่ดีเมื่อเทียบกับแผ่นเส้นใยผสมที่มีอัตราส่วนของไฟโบรอินน้อย จากการศึกษาการสลายตัวทางชีวภาพในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าแผ่นเส้นใยไฟโบรอินและเจลาตินชนิดบีอัตราส่วน 10/90 ถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วในสารละลายคอลลาจีเนส เนื่องจากเจลาตินมีโครงสร้างเช่นเดียวกันกับคอลลาเจนซึ่งสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยคอลลาจีเนส จากการศึกษาการควบคุมการปลดปล่อยตัวอย่างสารประกอบจากแผ่นเส้นใยผสมไฟโบรอินไหมไทยและเจลาตินชนิดบี พบว่าประจุที่เหมือนกันของแผ่นเส้นใยผสมและอะโซเคซีน น่าจะทำให้เกิดแรงผลักกันทางไฟฟ้า อย่างไรก็ตามพบการปลดปล่อยอะโซเคซีนจากแผ่นเส้นใยผสม โดยการแพร่อย่างต่อเนื่องในช่วง 72 ชั่วโมง ตรงกันข้ามกับการปลดปล่อยเมทธิวลีนบลูและสารเร่งการเติบโตของเส้นประสาท ซึ่งพบว่าสารทั้งสองถูกดูดซับไว้บนแผ่นเส้นใยโดยอาศัยแรงดึงดูดทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นระหว่างแผ่นเส้นใยผสมและตัวอย่างสารประกอบทั้งสองชนิด และการปลดปล่อยของสารทั้งสองสามารถถูกควบคุมได้โดยการย่อยสลายทางชีวภาพของแผ่นเส้นใย

ภาควิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่อนิสิต มนัญญา โอฆวิไล

สาขาวิชา วิศวกรรมเคมี ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2552 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม R. Ratthapol

5070404821 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : SILK FIBROIN / GELATIN / ELECTROSPINNING / CONTROLLED RELEASE

MANUNYA OKHAWILAI: PREPARATION OF THAI SILK FIBROIN/GELATIN ELECTROSPUN FIBER MATS FOR CONTROLLED RELEASE APPLICATIONS. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.SIRIPORN DAMRONGSAKKUL, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : RATTAPHOL RANGKUPAN, Ph.D., 84 pp

This research aimed to study the preparation of fiber mats from Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) using electrospinning for controlled release applications. From the results, the increasing in applied voltage resulted in narrow fiber size distribution and decreased average fiber size. An increasing in silk fibroin content in blended solution also resulted in larger size of obtained electrospun fiber. A smooth fiber could be produced from SF/GB blended solution at weight blending ratios of 10/90, 20/80, 30/70, 40/60, and 50/50. Therefore, the blended SF/GB fiber mats at the weight ratio of 50/50, 30/70 and 10/90 were selected to prevent the water solubility of the fiber mats by crosslinking treatment. Among three treatment methods, spraying EDC/NHS dissolved in ethanol solution onto fiber mats following by soaking the fiber mats in that solution was a suitable treatment method because the blended fiber mats after treatment showed the lowest percentage of weight loss and the morphology similar to its original. Moreover, the blended fiber mats with high silk fibroin content showed good mechanical properties compared to those with low silk fibroin content. From *in vitro* biodegradation, SF/GB 10/90 fiber mats was rapidly degraded in collagenase solution because the structure of gelatin was the same as collagen that can be degraded by collagenase. From *in vitro* controlled release of model compounds from SF/GB blended fiber mats, it was expected that the same charge of blended fiber mats and azo-casein would result in the repulsion force. Azo-casein was continuously diffused from blended fiber mats within 72-h of incubation. In contrast, methylene blue and nerve growth factor could be absorbed by an attraction interaction between the blended fiber mats and the two model compounds. The release of these of model compounds could be controlled by the biodegradation of SF/GB blended fiber mats.

Department : Chemical Engineering Student's Signature มนัญญา โอฆวิไล

Field of Study : Chemical Engineering Advisor's Signature

Academic Year : 2009 Co-Advisor's Signature R. Rattaphol

ACKNOWLEDGEMENTS

This research is completed with the aid and support of many people. The author would like to express her deepest gratitude to Associate Professor Dr. Siriporn Damrongsakkul, her advisor, for her continuous guidance, helpful suggestions and warm encouragement. She wishes to give her gratitude to Dr. Rattaphol Rankupan, the thesis co-advisor, for his kind guidance and invaluable discussions. In addition, she is also grateful to Associate Professor Dr. Tharathon Mongkhonsi, Assistant Professor Dr. Sorada Kanokpanont and Dr. Uracha Rungsardthong Ruktanonchai for serving as the chairman and the members of the thesis committee, respectively, whose comments were constructively and especially helpful. The author would like to acknowledge THE 90th ANNIVERSARY OF CHULALONGKORN UNIVERSITY FUND (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund), the Thailand Research Fund-Master Research Grants (TRF-MAG) and Center of Innovative Nanotechnology, Chulalongkorn University for financial supports.

The author would like to thank the staffs of Analytical Instrument Center and Laboratory, Chulalongkorn University for their helps with experiments. She would like to extend her grateful thanks to all members of Polymer Engineering Research Group at the Department of Chemical Engineering, especially Dr. Juthamas Ratanavaraporn for her kindness attentions and suggestions as well as members of Center for Chitin-Chitosan Biomaterials at Chulalongkorn University.

Finally, the author expresses her sincere thanks to her parents and everyone in her family for their unfailing understanding and affectionate encouragement.

CONTENTS

PAGE

ABSTRACT (IN THAI) iv

ABSTRACT (IN ENGLISH) v

ACKNOWLEDGEMENTS vi

CONTENTS vii

LIST OF TABLES xi

LIST OF FIGURES xii

CHAPTER

I INTRODUCTION 1

1.1 Background 1

1.2 Objectives 3

1.3 Scope of research 3

1.4 Expected benefits 3

II RELEVANT THEORY AND LITERATURE REVIEWS 4

2.1 Materials for scaffold fabrication 4

2.1.1 Synthetic polymers 4

2.1.2 Natural polymers 5

2.1.2.1 Silk 5

2.1.2.2 Gelatin 9

2.2 Fabrication of scaffolds 13

2.2.1 Freeze drying 13

2.2.2 Porogen leaching 13

2.2.3 Electrospinning 14

2.2.3.1 Apparatus 14

2.2.3.2 Mechanism of electrospinning 14

2.2.3.3 Electrospinning parameters 15

2.2.3.4 Application of electrospun fibers 17

2.3 Controlled drug delivery 18

2.3.1 Physical controlled release mechanism 19

2.3.1.1 The diffusion controlled release systems.....19
2.3.1.2 Solvent-controlled systems.....21
2.3.2 Chemically controlled release mechanism.....21
2.3.3 Advantages of controlled release.....22
2.4 Literature reviews.....23
2.4.1 Electrospinning of silk fibroin and gelatin.....23
2.4.2 Studies of silk fibroin and gelatin systems.....26
2.4.3 Studies of the controlled release of electrospun fiber mats.....28
III EXPERIMENTAL WORKS.....30
3.1 Materials and reagents.....30
3.2 Equipments.....30
3.3 Experimental procedures.....32
3.3.1 Preparation of regenerated Thai silk fibroin.....33
3.3.2 Preparation of the blended solution of silk fibroin and gelatin.....33
3.3.3 Electrospinning of the blended solution.....33
3.3.4 Treatment of the blended electrospun fiber mats.....34
3.3.4.1 Soaking in ethanol.....34
3.3.4.2 Soaking in EDC/NHS dissolved in ethanol.....34
3.3.4.3 Spraying and soaking in EDC/NHS dissolved in ethanol.....34
3.3.5 Characterization of the blended solution and fiber mats.....35
3.3.5.1 Viscosity and conductivity.....35
3.3.5.2 Morphology.....35
3.3.5.3 Mechanical properties.....35
3.3.5.4 *In vitro* biodegradation.....36
3.3.5.4.1 *In vitro* biodegradation in phosphate buffer saline.....36
3.3.5.4.2 *In vitro* biodegradation in collagenase.....37
3.3.6 *In vitro* controlled release of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....37
3.3.6.1 Loading method and controlled release of methylene blue and azo-casein.....37
3.3.6.2 Loading method and controlled release of nerve growth

factor.....37
3.3.7 Statistical analysis.....38
V. RESULTS AND DISCUSSION.....39
4.1 Physical characteristics of the blended Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....39
4.1.1 Viscosity and conductivity of Thai silk fibroin/type B gelatin blended solution.....39
4.1.2 The effect of applied voltage on morphology and distribution of Thai silk fibroin/type B gelatin fiber size.....41
4.1.3 The effect of silk fibroin content on morphology and distribution of Thai silk fibroin/type B gelatin fiber size.....45
4.2 The effect of treatment methods on weight loss and morphology of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....47
4.2.1 Percentage of weight loss of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats after treatment.....48
4.2.2 Morphology of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats after treatment.....50
4.2.3 Mechanical properties of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....52
4.3 *In vitro* biodegradation of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....54
4.3.1 *In vitro* biodegradation in phosphate buffer saline.....54
4.3.2 *In vitro* biodegradation in collagenase solution.....56
4.4 *In vitro* release of model compounds from Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....57
4.4.1 Release behavior of azo-casein.....58
4.4.2 Release behavior of methylene blue.....60
4.4.3 Release behavior of nerve growth factor.....62
VI. CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS.....64
5.1 Conclusions.....64
5.2 Recommendations.....65
REFERENCES.....66

APPENDICES.....72

APPENDIX A: Weight loss of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats after treatment.....73

APPENDIX B: *In vitro* biodegradation of Thai silk fibroin/type B gelatin electrospun fiber mats.....77

APPENDIX C: Standard curve.....82

BIOGRAPHY.....84

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Amino acid compositions of *Bombyx mori* silk fibroin	7
2.2	Specifications for type A and B gelatin	10
2.3	Amino acid composition of gelatin	11
2.4	Effects of electrospinning parameters on fiber morphology	17
4.1	SF/GB fiber size at various weight blending ratios and applied voltage	45
4.2	Mechanical properties of wet Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats	53
4.3	Half life of the blended electrospun fiber mats	56
4.4	Charges of materials and model compounds	59
A-1	Treatment by soaking in ethanol	73
A-2	Treatment by soaking in EDC/NHS in ethanol	75
A-3	Treatment by spraying and soaking in EDC/NHS in ethanol	76
B-1	*In vitro* biodegradation in collagenase solution	77
B-2	*In vitro* biodegradation in phosphate buffer saline	80

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

2.1 Structure of silk fiber Structure 5

2.2 Structure of fibroin.....6

2.3 Schematic structure of *Bombyx mori* silk fiber protein.....7

2.4 Applications of silk.....9

2.5 Preparation processes for acidic and basic gelatins from collagen.....10

2.6 Structure of gelatin.....11

2.7 Applications of gelatin.....13

2.8 The schematic of electrospinning process.....15

3.1 Diagram of experimental procedures.....32

4.1 Viscosity of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) blended solution at various weight blending ratios.....40

4.2 Conductivity of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) blended solution at various weight blending ratios 41

4.3 SEM micrographs of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats at various weight blending ratios 42

4.4 Average fiber size of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats..... 44

4.5 Average fiber size of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats obtained from various applied voltage.....46

4.6 Percentage of weight loss of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats after various treatment methods 48

4.7 SEM micrographs of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats at various weight blending ratios after soaking in ethanol for 30 min.....50

4.8 SEM micrographs of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats at various weight blending ratios after soaking in EDC/NHS dissolved in ethanol for 2 h.....51

4.9 SEM micrographs of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB)

electrospun fiber mats at various weight blending ratios
after spraying and soaking in EDC/NHS dissolved in ethanol for 2. 52
4.10 Remaining weight of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats after degraded in phosphate buffer saline solution
at 37°C over 14-day period.....55
4.11 Remaining weight of Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats after exposed in collagenase solution at 37°C.....57
4.12 *In vitro* release of azo-casein from Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats in phosphate buffer saline
over 72-h period 59
4.13 *In vitro* release of methylene blue from Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber in phosphate buffer saline
over 72-h period.....61
4.14 *In vitro* release of nerve growth factor from Thai silk fibroin/type B gelatin (SF/GB) electrospun fiber mats in phosphate buffer saline over 14-day period.....63
C-1 Standard curve of azo-casein.....82
C-2 Standard curve of methylene blue.....82
C-3 Standard curve of nerve growth factor.....83