

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E46263

CHARACTERIZATION OF SILK FIBROIN HYDROGELS
PREPARED WITH DIFFERENT GEL FORMERS

SIRIN PANYAKOM

MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011

b00256083



ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ



E46263

**CHARACTERIZATION OF SILK FIBROIN HYDROGELS
PREPARED WITH DIFFERENT GEL FORMERS**

SIRIN PANYAKOM

**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY
OCTOBER 2011**

**CHARACTERIZATION OF SILK FIBROIN HYDROGELS PREPARED
WITH DIFFERENT GEL FORMERS**

SIRIN PANYAKOM

THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON
Associate Professor Dr. Udom Sriyotha

..... MEMBER
Associate Professor Dr. Surasak Watanesk

..... MEMBER
Associate Professor Dr. Ruangsri Watanesk

..... MEMBER
Dr. Sukjit Kungwankunakorn

THESIS ADVISOR

.....
Associate Professor Dr. Surasak Watanesk

25 October 2011

ACKNOWLEDGMENTS

The author would like to express her sincere thanks and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Surasak Watanesk, her thesis advisor, and also Assoc. Prof. Dr. Ruangsri Watanesk for their kindness on giving such invaluable guidance, grateful supervision and many suggestions, and also continual encouragement and discussions.

The acknowledgement is also extended to the Center for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC), Commission on Higher Education, Ministry of Education for sponsoring the graduate scholarship. Thanks to the Graduate School, Chiang Mai University for additional financial supports to this research, and also to the Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiang Mai University for providing the facilities which enable this work to be carried out.

Furthermore, I also grateful to Dr. Kanya Buttarat, Miss Jiraporn Kittikul and Mr. Natpattarapong Suvannachai, Department of Chemistry, Maejo University for instrumental instruction with FT-IR and DSC. Thanks are also given to those who have one way or other contributions to the success of this work especially members of the Chemical Modification of Natural Fibrous Materials Research Laboratory.

Most importantly, the author would like to greatly thank and express her appreciation to her parents for their love, encouragement, inspiration, understanding and support.

Sirin Panyakom

Thesis Title	Characterization of Silk Fibroin Hydrogels Prepared with Different Gel Formers
Author	Ms. Sirin Panyakom
Degree	Master of Science (Chemistry)
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Surasak Watanesk

ABSTRACT

E46263

In this research, the characterization of silk fibroin hydrogel prepared with different gel formers such as Carbopol 940, Poloxamer 188 and Hydroxypropyl methylcellulose were studied. These gelling agents can improve some properties of silk fibroin film such as flexibility and strength in forming good hydrogels. Preparation of silk fibroin hydrogels were done by mixing 30 g/L of silk fibroin solution with each gel former solution at various concentrations. After that, the solution was stirred until the homogenous solution occurred and dried at 60 °C for 12 hrs. Then, the hydrogel films were treated with 80% v/v EtOH and it was observed that they were curved and gained more strength but it was still brittle and crackable compared to the EtOH untreated hydrogels.

When the characterization of silk fibroin hydrogels was done, no matter whether it is composed of silk fibroin only or forming hydrogel with various gel formers. It was found that the water swelling of the blended hydrogel could occur more than the silk fibroin “only” hydrogel. By comparing the hydrogels prepared with three

different gel formers, the hydrogel with Carbopol had the highest swelling ratio at 324%. For fibroin protein release from the hydrogels, it was observed that the amounts of protein release were nearly the same. However, the hydrogel prepared with Poloxamer showed the highest protein release of 0.024%. When the cross-section of the hydrogel film was studied using Scanning Electron Microscope, it was observed that the EtOH treated silk fibroin film appeared to have sheet-like morphology and became smoother than the untreated films. Investigating the secondary protein structure of silk fibroin in the hydrogel using Fourier Transform Infrared Spectroscopy revealed the β -sheet structure in EtOH treated and untreated silk fibroin hydrogels. Lastly, the thermal analysis using Differential Scanning Calorimeter exhibited the homogeneity of the blended hydrogels and the thermal energies for melting of all the hydrogels were nearly the same. However, it was observed that the silk fibroin hydrogel film blended with Carbopol absorbed the highest amount of heat of melting at 444 J/g.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การหาลักษณะเฉพาะของซิลิกไฟโบรอินไฮโดรเจลที่เตรียมด้วยสารก่อเจลต่างชนิด
ผู้เขียน	นางสาวสิรินทร์ ปัญญาคม
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เคมี)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร. สุรศักดิ์ วัฒนเสถ์

บทคัดย่อ

E46263

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาลักษณะเฉพาะของซิลิกไฟโบรอินไฮโดรเจลที่เตรียมด้วยสารก่อเจลต่างชนิด ได้แก่ คาร์โบพอล 940 พอลอกซาเมอร์ 188 และ ไฮดรอกซีโพรพิลเมทิลเซลลูโลส สารก่อเจลที่ใช้เหล่านี้จะช่วยปรับปรุงสมบัติบางประการของแผ่นฟิล์มซิลิกไฟโบรอิน เช่น ความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของแผ่นฟิล์มให้มากขึ้นที่จะทำให้เกิดไฮโดรเจลที่ดี สำหรับการเตรียมแผ่นซิลิกไฟโบรอินไฮโดรเจลทำโดยการนำสารละลายซิลิกไฟโบรอินเข้มข้น 30 กรัมต่อลิตร มาผสมกับสารก่อเจลแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน คนจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกันแล้วนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศา นาน 12 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแผ่นไฮโดรเจลที่เตรียมได้ไปแช่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่า แผ่นไฮโดรเจลจะมีลักษณะโค้งงอและแข็งมากขึ้น แต่จะเปราะและหักได้ง่ายกว่าแผ่นไฮโดรเจลที่ไม่ได้แช่

เมื่อทำการหาลักษณะเฉพาะของแผ่นซิลิกไฟโบรอินไฮโดรเจล ไม่ว่าจะมีเพียงซิลิกไฟโบรอินเพียงอย่างเดียว หรือเกิดเป็นไฮโดรเจลกับสารก่อเจลต่างๆ พบว่า ในประเด็นการบวมตัวในน้ำนั้น ไฮโดรเจลที่เกิดกับสารก่อเจลต่างๆจะบวมน้ำได้มากกว่าแผ่นซิลิกไฟโบรอินเพียงอย่างเดียว เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแผ่นไฮโดรเจลที่เติมด้วยสารก่อเจลทั้งสามชนิด พบว่า แผ่นไฮโดรเจลที่ผสมด้วยคาร์โบพอลจะมีค่าการบวมตัวในน้ำสูงที่สุดที่ 324% สำหรับการปลดปล่อยโปรตีนไฟโบรอินจากแผ่นซิลิกไฟโบรอินไฮโดรเจลที่เตรียมด้วยสารก่อเจลทั้งสามชนิด พบว่า ปริมาณโปรตีนที่หลุดออกมานั้นมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก อย่างไรก็ตามแผ่นไฮโดรเจลที่ผสมพอลอกซาเมอร์ มีค่าการปลดปล่อยไฟโบรอินสูงที่สุด คือ 0.024% เมื่อศึกษาภาคตัดขวางของแผ่นไฮโดรเจลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่า แผ่นฟิล์มซิลิกไฟโบรอินที่แช่ในเอทานอลจะมีลักษณะเป็นชั้นชัดเจนมากขึ้นและเรียบมากขึ้นเมื่อเทียบกับแผ่นที่ไม่ได้แช่ จากการตรวจสอบ

โครงสร้างโปรตีนทุติยภูมิของซิลิกาไฟโบรอินในแผ่นไฮโดรเจลด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี แสดงให้เห็นถึงสภาพโครงสร้างแบบบีตา-ชีท ที่เกิดขึ้นในแผ่นไฮโดรเจลที่แช่และไม่ได้แช่ในเอทานอล สูดท้ายเป็นการวิเคราะห์ค่าทางความร้อนด้วยเครื่องดิฟเฟอเรนเชียล สแกนนิ่งแคลอริมิเตอร์ แสดงให้เห็นถึงการรวมตัวเป็นเนื้อเดียวกันของไฮโดรเจลที่มารวมตัวกันและพลังงานความร้อนเพื่อใช้ในการหลอมเหลวไฮโดรเจลทั้งหมดต่างก็มีค่าที่ใกล้เคียงกัน โดยแผ่นซิลิกาไฟโบรอินไฮโดรเจลที่ผสมกับคาร์โบพอล จะใช้ความร้อนในการหลอมเหลวมากที่สุดคือ 444 จูลต่อกรัม

TABLE OF CONTENTS

	Page
ACKNOWLEDGEMENT	iii
ABSTRACT (ENGLISH)	iv
ABSTRACT (THAI)	vi
LIST OF TABLES	xii
LIST OF FIGURES	xiii
ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	xvi
CHAPTER 1 INTRODUCTION	1
1.1 Hydrogel	1
1.1.1 Hydrogel formation	2
1.1.2 Preparation of hydrogels	4
1) Use of cross-linkers	4
2) Isostatic ultra high pressure (IUHP)	5
3) Use of gelling agent	5
4) Use of irradiation and freeze thawing	5
5) Synthesis of hydrogel in industry	5
1.1.3 Application of hydrogels	6
1) Wound healing	6

2) Soft contact lenses	6
3) Industrial applicability	6
4) Tissue engineering	6
5) Hydrogel for gene delivery	7
6) Cosmetology	7
7) Tropical drug delivery	7
8) Protein drug delivery	7
1.2 Silks	7
1.2.1 Silk fibers	8
1) Silk sericin	10
2) Silk fibroin	11
1.2.2 Silk proteins	12
1) Primary structure	12
2) Secondary structure	13
3) Tertiary structure	13
4) Quaternary structure	14
1.2.4 Silks in biomaterials	15
1) Silk fibroin porous sponges	17
2) Silk fibroin films	18
3) Silk fibroin hydrogels	19
1.3 Gel Former	20
1.3.1 Carbopol	20
1.3.2 Poloxamer	23

1.3.3	HPMC	27
1.4	Literature Review	28
1.5	Experimental Techniques	32
1.5.1	Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)	32
1.5.2	Differential scanning calorimetry (DSC)	36
1.5.3	Scanning electron microscopy (SEM)	39
1.5.1	Ultraviolet and visible spectrometry (UV-VIS)	41
1.6	Research Objectives	44
CHAPTER 2 EXPERIMENTAL		45
2.1	Chemicals, Materials and Equipments	45
2.1.1	Chemicals	45
2.1.2	Materials	46
2.1.3	Equipments	47
2.2	Preparation of the Solutions	48
2.3	Procedures	50
2.3.1	Preparation of SF films	50
2.3.2	Preparation of the SF based hydrogel	51
2.3.3	Characterization of SF films and SF hydrogels films	51
1)	Cross-linking investigation	51
2)	Thermal analysis	52
3)	Morphology investigation	52
4)	Swelling test	52

5) Protein loss detection	53
CHAPTER 3 RESULTS AND DISCUSSION	54
3.1 Preparation of SF Films	54
3.2 Preparation of the SF Based Hydrogel	59
3.3 Characterization of SF Films and SF Hydrogels	61
3.3.1 Cross-linking investigation	62
3.3.2 Thermal analysis	72
3.3.3 Morphology investigation	78
3.3.4 Swelling test	80
3.3.5 Protein loss detection	84
CHAPTER 4 CONCLUSION	89
REFERENCES	92
APPENDICES	99
APPENDIX A Determination of Swelling Ratio	100
APPENDIX B Determination of SF Protein Loss	103
CURRICULUM VITAE	108
THE RELEVANCE OF THE RESEARCH WORK TO THAILAND	118

LIST OF TABLES

Table	Page
1.1 Amino acid composition of fibroin and sericin	8
1.2 Physical and chemical properties of Carbopol	22
1.3 Poloxamer grades and their chemical composition	24
1.4 Specifications of Poloxamers	25
3.1 Characteristic IR bands of SF powder, SF hydrogel, SF/CP hydrogel and CP powder	65
3.2 Characteristic IR bands of SF film, SF/PL hydrogel and PL powder	68
3.3 Characteristic IR bands of SF hydrogel, SF/HPMC hydrogel and HPMC powder	71

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1.1	Overview of the mechanisms for formation of physical and chemical hydrogels	3
1.2	Details of protein and other filament silk fibers	9
1.3	Application of sericin in various industries	11
1.4	Diagrammatic representation of attributes of SF	12
1.5	Common structure of protein	15
1.6	Purification of silk fibroin from silk fibroin-sericin mixtures	16
1.7	A range of material generated from silks through processing into hydrogels, fibers, sponges, films and modification properties of silks	16
1.8	Chemical structure of Carbopol	21
1.9	Chemical structure of Poloxamer	23
1.10	Chemical structure of HPMC	27
1.11	Various regions of the electromagnetic spectrum	32
1.12	Schematic presentation of a FTIR spectrophotometer	34
1.13	Schematic diagram of Michelson interferometer	34
1.14	General regions of IR spectrum showing various types of vibrational bands	35
1.15	Schematic diagram of the power compensated and the heat flux DSC	37
1.16	Characteristics of the DSC curve	38

1.17	Typical DSC thermogram showing commonly observed transitions	38
1.18	Schematic diagram of a scanning electron microscope	40
1.19	Schematic of a single-beam UV-VIS spectrophotometer	43
1.20	Schematic of a dual-beam UV-VIS spectrophotometer	43
3.1	Preparation of SF film: (a) silk waste, (b) degumming, (c) degummed silk, (d) dissolution, (e) dialysis, (f) SF powder, (g) 30 g/L SF solution and (h) 30 g/L SF film	55
3.2	Photographs of SF films prepared from SF solutions at various concentrations: (a) 10 g/L, (b) 20 g/L, (c) 30 g/L, (d) 40 g/L and (e) 50 g/L of SF films	57
3.3	The swelling ratio of SF films at various concentrations of SF solutions	58
3.4	Appearance illustrating of the SF films and SF hydrogel films; (a) SF, (b) SF/CP, (c) SF/PL and (d) SF/HPMC	60
3.5	FTIR spectra of (a) SF powder, (b) SF/CP blend, (c) CP powder and (d) SF hydrogel	63
3.6	Intermolecular interaction between SF, Carbopol and triethanolamine	64
3.7	FTIR spectra of (a) PL powder, (b) SF/PL blend, (c) SF powder and (d) SF hydrogel	66
3.8	Intermolecular interaction between SF and Poloxamer	67
3.9	FTIR spectra of (a) HPMC powder, (b) SF/HPMC hydrogel, (c) SF powder and (d) SF hydrogel	69

3.10	Intermolecular interaction between SF and HPMC	70
3.11	DSC thermograms of (a) SF film treated with EtOH, (b) SF hydrogel, SF/CP hydrogel and CP powder. (heating rate = 10 °C/min)	73
3.12	DSC thermogram of SF film, SF-PL blend and PL powder. (heating rate = 10 °C/min)	74
3.13	DSC thermogram of SF film, SF-HPMC blend and HPMC powder. (heating rate = 10 °C/min)	74
3.14	The ΔH_c values of SF hydrogels; (a) SF/CP, (b) SF/PL and (c) SF/HPMC hydrogels	78
3.15	SEM images of SF hydrogel and gel formers; (a) SF, (b) SF/CP, (c) SF/PL and (d) SF/HPMC	79
3.16	The swelling ratio of (a) SF hydrogel, (b) SF/CP hydrogels, (c) SF/PL hydrogel and (d) SF/HPMC hydrogels	81
3.17	The protein loss of (a) SF/CP hydrogels, (b) SF/PL hydrogel and (c) SF/HPMC hydrogels	85
3.18	Relationship between swelling ratio (-●-) and protein release (-▲-) with various concentrations of CP (a) SF/CP hydrogels, (b) SF/PL hydrogel and (c) SF/HPMC hydrogels	87

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

A	absorbance
CP	Carbopol
DI-RO	deionized reversed osmosis
DSC	Differential scanning calorimetry
EtOH	ethanol
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy
g	gram
g/L	gram per liter
hr	hour
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose
kDa	kilo dalton
M	molarity
min	minute
mm	millimeter
mV	millivolt
PEO	polyethylene oxide
PL	Ploxamer
PPO	polypropylene oxide
SEM	Scanning electron microscopy
SF	silk fibroin

TEA	triethanolamine
T_g	glass transition
T_m	melting temperature
v/v	volume to volume
α	alpha
β	beta
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
ΔH_c	crystallization enthalpy