



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตฟิล์มบางยิ่งยวดที่บริเวณใต้จากแผ่นเส้นใยนาโนที่มีไขขาว
เป็นองค์ประกอบหลักโดยการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต
และการศึกษาสมบัติการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากฟิล์ม

โดย เสาวคนธ์ วงศาสุลักษณ์

31 กรกฎาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตฟิล์มบางยิ่งยวดที่บริโภคได้จากแผ่นเส้นใยนาโนที่มีไขขาว
เป็นองค์ประกอบหลักโดยการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต
และการศึกษาสมบัติการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากฟิล์ม

โดย เสาวคนธ์ วงศาสุลักษณ์

ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.ดร. ทิพาพร อยู่วิทยา ศ.ดร. พิชญ์ สุภผล และ Prof.Dr. Jochen Weiss นักวิจัยพี่เลี้ยงทั้ง 3 ท่าน รวมถึง รศ.ดร.สัทกมน เทพหัสดิน ณ อยุธยา ผศ.ดร.ชัยรัตน์ ตั้งดวงดี และ รศ.ดร.ปาริฉัตร หงสประภาส ที่ได้ให้คำปรึกษาและประเด็นคิดที่มีความหมายยิ่งแก่งานวิจัยนี้ ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้สนับสนุนเงินทุนทั้งหมดของงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณ คณะผู้บริหารสำนักงานฝึกอบรมและพัฒนาโรงงานต้นแบบ และภาควิชา วิศวกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ซึ่งเป็นผู้บริหารของที่ทำงานต้นสังกัด ของผู้วิจัยที่ได้เห็นความสำคัญและสนับสนุนงานวิจัยโครงการนี้ สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบใจนักศึกษาที่เป็นผู้ช่วยวิจัยที่ดี ให้ความร่วมมือและช่วยสนับสนุนการทำงานวิจัยโครงการนี้อย่างดียิ่ง

ขอขอบพระคุณ

เสาวคนธ์ วงศาสุลักษณ์

Project code : TRG 5080008

Project title: Preparation of ultrathin edible films from electrospun nanofibrous mats of egg albumen-based materials and a study on the release of active compound from the films

Researcher: Saowakon Wongsasulak

King mongkut's University of Technology Thonburi

E-mail Address: nuhuy.w@gmail.com, saowakon.won@kmutt.ac.th

Project Period: July 1, 2007 — July 31, 2009

Abstract

This report highlights an attempt to fabricate two forms of food grade nanofibers carrying model protein; nanofiber containing dispersed model protein and hollow fibers carrying core model protein. The former was produced using conventional electrospinning technique whereas the latter was fabricated using the coaxial one. The main component of the fibers matrix was cellulose acetate. The model proteins of the hollow and typical fibers were gelatin and egg albumen, respectively. Properties of the electrospinning solution; viscosity, surface-tension, surface tension and electrical conductivity were improved by adding some surfactant and electrolyte. The morphology of the electrospun fibers was examined by SEM whilst their compositions were characterized by FTIR-spectroscopy and TGA. The release properties of the as-spun fibers were also explored. Overall, this research showed that the fine structure of the protein-polysaccharide blend nanofibers could be fabricated through properly modifying solution properties. Besides, the electrospinning setup developed in this work was proved to have a potential for protein-polysaccharide (core-shell) coaxial electrospun fibers fabrication. The preliminary results of release characteristic for the both fibers exhibited a trend of slow release in pH 2 buffer solution without bursting effect. These fibers may provide a great interesting result for nutraceutical/drug delivery in GI-tract. The progressive research will be an improvement of the mucoadhesive property as well as an insight into the release characteristics in GI-tract of the fibrous film.

Keywords: Cellulose acetate; Electrospinning; Egg albumen; Nanofibers; Release

เลขที่สัญญา : TRG 5080008

ชื่อโครงการ: การผลิตฟิล์มบางยิ่งยวดที่บริโภคได้จากแผ่นเส้นใยนาโนที่มีสารจากไข่ขาว เป็นองค์ประกอบหลักโดยกระบวนการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตและการศึกษาสมบัติการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์จากฟิล์ม

นักวิจัย: เสาวคนธ์ วงศาสุลักษณ์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

E-mail Address : nuhuy.w@gmail.com, saowakon.won@kmutt.ac.th

ระยะเวลาการวิจัย : 1 กรกฎาคม 2550 — 31 กรกฎาคม 2552

บทคัดย่อ

รายงานวิจัยนี้แสดงการผลิตเส้นใยนาโนที่สามารถใช้กับอาหารได้โดยบรรจุโปรตีนจำลองในสองรูปแบบ: เส้นใยนาโนบรรจุโปรตีนซึ่งกระจายแทรกและเส้นใยนาโนกลวงซึ่งบรรจุโปรตีนไว้ภายใน เส้นใยแบบแรกนั้นถูกผลิตโดยใช้เทคนิคการปั่นเส้นใยแบบดั้งเดิม ในขณะที่เส้นใยแบบหลังถูกผลิตขึ้นโดยเทคนิคการปั่นเส้นใยแบบแกนร่วมด้วยไฟฟ้าสถิต องค์ประกอบหลักของแมทริกซ์ของไฟเบอร์คือเซลลูโลสแอซิเตท แบบจำลองของโปรตีนที่นำมาบรรจุในเส้นใยแบบกลวงและแบบดั้งเดิมคือเจลาตินและไข่ขาวตามลำดับ ในการปรับปรุงสมบัติของสารละลายสำหรับอิเล็กโตรสปินนิง; ความหนืด แรงตึงผิวและแรงตึงผิวระหว่างเฟส แรงตึงผิวและค่าการนำไฟฟ้าได้ทำโดยการเติมสารลดแรงตึงผิวและสารละลายอิเล็กโทรไลต์ สันฐานวิทยาของเส้นใยที่ได้ได้ถูกตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดและตรวจสอบองค์ประกอบโดยใช้เทคนิคของ FTIR และ TGA นอกจากนี้ได้ศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสมบัติการปลดปล่อยสารด้วย โดยภาพรวมแล้ว งานวิจัยนี้ได้แสดงว่าการผลิตเส้นใยนาโนด้วยเทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตจากพอลิเมอร์ผสมของโปรตีนกับพอลิแซ็กคาไรด์สามารถทำได้โดยการปรับสมบัติสารละลายให้เหมาะสม นอกจากนี้ยังได้ยังแสดงให้เห็นว่าชุดอุปกรณ์ประกอบอิเล็กโตรสปินนิงแบบแกนร่วมที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้มีศักยภาพเพียงพอในการผลิตเส้นใยแกนร่วมที่มีลักษณะสันฐานที่ดีได้ ผลการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับสมบัติการปลดปล่อยในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 2 และ pH 7.4 ของเส้นใยซึ่งบรรจุโปรตีนแบบกระจาย พบว่ามีอัตราการปลดปล่อยสารที่ค่อนข้างต่ำโดยไม่มีการแตกออกของเส้นใย เส้นใยที่ได้นี้น่าจะให้ผลที่น่าสนใจเกี่ยวกับการนำส่งสารนิวทราซูติคัลหรือยาในทางเดินอาหาร การศึกษาต่อยอดจากงานวิจัยนี้คือการพัฒนาสมบัติการเกาะติดกับเนื้อเยื่อและการศึกษาให้เข้าใจอย่างกระจ่างเกี่ยวกับลักษณะการปลดปล่อยสารในทางเดินอาหารของแผ่นฟิล์มใยนี้

คำสำคัญ: การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต; การปลดปล่อยสาร; ไข่ขาว; เซลลูโลสแอซิเตท; เส้นใยนาโน

1. บทนำ

ในปัจจุบันนี้ ทางด้านการแพทย์ของทั้งประเทศไทยและแทบทุกประเทศทั่วโลกได้เล็งเห็นบทบาทและความสำคัญของโภชนาบำบัดที่มีต่อการบำบัดรักษาโรค ตลอดจนการส่งเสริมให้ร่างกายมีสุขภาพแข็งแรง ทั้งนี้ความจำเป็นที่ต้องรับสารอาหาร วิตามิน สาร probiotic และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (bioactive compound) ให้ได้ปริมาณที่มากเพียงพอกับความต้องการของร่างกายนั้นมีความสำคัญมาก อย่างไรก็ตาม สมบัติเชิงหน้าที่ของสารที่จำเป็นดังกล่าวมักค่อยลงหรือถูกทำลายไปในระหว่างกระบวนการผลิต ที่สำคัญยิ่งไปกว่านี้ สมบัติและประสิทธิภาพของสารดังกล่าวมักถูกทำลายไปโดยสิ้นเชิงอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ ในระบบการย่อยอาหารเนื่องจากสภาวะความเป็นกรดที่เข้มข้นสูงในกระเพาะอาหาร สาเหตุที่กล่าวมานี้ทำให้สารอาหารที่บริโภคหรือยาที่ได้รับไม่เพียงพอที่จะบำบัดรักษาโรค และ/หรือดำรงชีพให้เป็นปกติสุข ซึ่งอาจต้องใช้ปริมาณยา (dose) ที่สูงมากขึ้นกว่าความต้องการจริง ตลอดจนการต้องรับยาหรือสารจำเป็นเหล่านี้ในรูปแบบอื่น เช่น การฉีด แทนการรับประทาน สาเหตุหลักของการสูญเสียสมบัติเชิงหน้าที่ของสารสำคัญเหล่านี้ในระบบการย่อย ก็เนื่องจากโครงสร้างของสารประกอบนั้นถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงไปด้วยสภาวะกรดที่เข้มข้นสูงร่วมกับเอนไซม์ในกระเพาะอาหาร เพราะฉะนั้น จึงต้องปกป้องสารประกอบที่ไวต่อการถูกเปลี่ยนแปลง (sensitive compound) นี้ ด้วยการห่อหุ้มในวัสดุชีวภาพที่มีศักยภาพที่ดีเพียงพอและควบคุมให้ปลดปล่อย ณ ตำแหน่งที่มีการดูดซึมเข้าสู่เซลล์สูง เช่น ที่ดูโอดินัมซึ่งความเป็นกรดต่ำอยู่ ที่ประมาณ 7.2-8

งานวิจัยเดิมของผู้วิจัยนี้ (Wongsasulak, 2005; Wongsasulak et al, 2007b) ได้พัฒนาโครงสร้างประกอบระหว่างไขขาวกับแป้งมันสำปะหลังขึ้นเพื่อใช้เป็นสารห่อหุ้มสารสำคัญ ซึ่งพบว่าโครงสร้างประกอบนี้มีศักยภาพที่ดีมากเพียงพอในการชะลอการปลดปล่อยสารอาหารในสิ่งแวดล้อมที่มีความเป็นกรดสูง และจะมากขึ้นเมื่อสิ่งแวดล้อมมีค่า pH สูงขึ้น อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการปลดปล่อยสารจากโครงสร้างประกอบนี้ขึ้นกับอัตราการบวมและการถูกกัดกร่อน ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งคือ loading efficiency ของโครงสร้างที่พัฒนาขึ้นไม่สูงมากนัก เมื่อเทียบกับโครงสร้างนาโน

Weiss, Takhistov และ McClements (2006) ได้สรุปถึงสมบัติสำคัญของโครงสร้างที่ทำหน้าที่กักเก็บและเป็นตัวพาสารหรือยา ก็คือ ความสามารถในการบรรจุ (loading efficiency) อัตราและจลนศาสตร์ของการปลดปล่อยที่ต้องสามารถควบคุมได้และโดยปกติควรเป็นค่าคงที่ซึ่งไม่ขึ้นกับเวลาหรือที่เรียกว่าอันดับศูนย์ (zero order) รวมถึงความสามารถที่จะต้องปกป้องสารที่กักเก็บให้ปลอดภัยต่อการทำปฏิกิริยาเคมีกับกระบวนการทางชีวภาพในระหว่างการผลิต การเก็บ ตลอดจนระหว่างการใช้งาน เช่น ในระบบการย่อย หลักการหนึ่งของการปรับแปรโครงสร้างคือ การทำให้การจัดเรียงโมเลกุลในโครงสร้างของวัสดุระหว่างการจัดขึ้นรูปให้มีระเบียบและขนาดที่เล็กมากยิ่งขึ้น

เช่นในระดับนาโนเมตร การขึ้นรูปโครงสร้างในระดับนาโนหรือ 10^{-9} จึงมีบทบาทและได้รับความสนใจอย่างมากทวีขึ้นในปัจจุบัน ทางสาขาชีวภาพการแพทย์มีการนำโครงสร้างในระดับนาโนนี้มาใช้ในการส่งยาไปยังเซลล์เป้าหมายได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงและแม่นยำ ความสามารถในการกักเก็บหรือบรรจุสารสำคัญหรือยาได้ในปริมาณที่สูงซึ่งทำให้ปริมาณการให้ยา (dose) เท่ากับปริมาณที่ต้องการจริงเท่านั้น รวมถึงสามารถควบคุมเวลาการปลดปล่อยได้แม่นยำกว่า แต่ถึงกระนั้น ก็ยังมีรายงานว่ากลไกศาสตร์ของการปลดปล่อยยังไม่สามารถควบคุมได้เนื่องจากโครงสร้างที่ห่อหุ้ม (shell) นี้ มักเกิดการบวมและแตกออก (bursting) (Zeng et al, 2003) เมื่อช่วงเวลาหนึ่งและทำให้อัตราการปลดปล่อยพุ่งสูงขึ้น แต่ที่ผ่านมารวดเร็ว นี้ Chew et al (2005); Xu et al (2005) และ Zeng et al (2003) ได้รายงานไว้ว่าโครงสร้างแบบเส้นใยนาโน (nanofiber) มีกลไกศาสตร์ของการปลดปล่อย ที่เข้าใกล้อันดับศูนย์มากกว่าแบบทรงกลมนาโน (nanosphere) นอกจากนี้เส้นใยที่ได้จากการอิเล็กโตรสปินนิงมีขนาดที่เล็กขวยยิ่ง (ultrafine) ทำให้พื้นที่ผิวเทียบกับขนาดของเส้นใยมีค่าที่สูงมากและ เป็นข้อเด่นที่สำคัญอีกข้อหนึ่งของเส้นใยอิเล็กโตรสปิน

อิเล็กโตรสปินนิง คือเทคนิคอย่างหนึ่งที่ใช้ในการผลิตเส้นใยที่มีความยาวต่อเนื่องไม่หักทอ และมีขนาดที่เล็กมากโดยปกติคือระหว่างเล็กกว่า 0.5 ไมครอนถึง 10 นาโนเมตร เส้นใยที่ได้มีพื้นที่ผิวที่เรียบมาก ด้วยขนาดที่เล็กมากเช่นนี้ทำให้เส้นใยดังกล่าวมีพื้นที่ผิวเทียบต่อน้ำหนักและ/หรือ ปริมาตรที่สูงมาก ส่งเสริมให้เส้นใยประเภทนี้มีสมบัติต่างๆ ที่น่าสนใจหลายประการ เช่น สมบัติการนำพาสาร (carrier property) สมบัติการควบคุมการปลดปล่อยสาร (controlled release) การใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell implant) เช่น เซลล์เนื้อเยื่อและเซลล์กระดูกอ่อน การเป็นตัวกรอง (filtration) เพราะฉะนั้นฟิล์มที่ได้จากการสะสมตัวของเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงนี้จึงได้มีการนำไปใช้อย่างแพร่หลายในงานด้านชีวภาพการแพทย์ เครื่องสำอาง เกล็ดขี้ผึ้ง สิ่งทอ เยื่อแผ่น (Jiang et al 2005; Kenawy et al, 2002; Taepaiboon et al, 2006; Zeng et al, 2005) เนื่องจากการประยุกต์ใช้ฟิล์มแผ่นใยนี้กับสิ่งมีชีวิตมีแนวโน้มที่สูงขึ้นมากในปัจจุบัน สมบัติการสามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) การแพ้ (allergenic) และความเป็นพิษ (toxicity) ของเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงนี้ จึงมีสมบัติที่สำคัญมากอีกประการหนึ่ง ดังเห็นได้จากงานวิจัยด้านอิเล็กโตรสปินนิงในระยะหลังมานี้ได้มุ่งเน้นการขึ้นรูปจากพอลิเมอร์ที่สามารถเข้ากันได้กับสิ่งมีชีวิต (biocompatible) และย่อยสลายได้ด้วยระบบชีวภาพ (biodegradable) ตลอดจนจนถึงการสังเคราะห์จากวัสดุชีวภาพ (biomaterial) เท่านั้น (Christopher et al, 1999; Huang et al, 2004; Jiang et al, 2005; Peesan et al, 2006; Wongsasulak et al, 2007a) แต่ถึงกระนั้นก็ตาม การนำเส้นใยอิเล็กโตรสปินนิงมาใช้กับอาหารและยารับประทานยังมีน้อยมากเมื่อเทียบกับการนำใช้งานด้านสิ่งทอ งานเคมี เซนเซอร์ และเยื่อแผ่นกรอง เหตุผลประการหนึ่งเนื่องจากข้อจำกัดของพอลิเมอร์ที่ยอมรับเพื่อให้ใช้ได้กับอาหารและยา รวมถึงสมบัติการรับประทานได้

ในงานวิจัยพอลิเมอร์ชีวภาพที่ใช้ผลิตแผ่นใยอิเล็กทรอนิกส์โปรตีนและพอลิแซ็กคาไรด์ แต่โดยมากพอลิเมอร์ทั้งสองประเภทนี้มีแนวโน้มในการสร้างพันธะไฮโดรเจนกับสารละลายสูง ซึ่งนับเป็นปัญหาสำคัญข้อหนึ่งของเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์โปรตีนในการสามารถจัดเรียงตัวของพอลิเมอร์ให้เป็นเส้นใย ดังจะพบว่ามีการใช้สารใช้พอลิเมอร์สังเคราะห์อื่นๆ ที่มีสมบัติการเกี่ยวพันของโมเลกุล (entanglement) สูง เช่น พอลิเอธิลีนออกไซด์ พอลิไวนิลคลอไรด์ เป็นต้น เป็นส่วนผสมเพื่อช่วยการขึ้นรูปเป็นเส้นใย งานวิจัยของ Wongsasulak (2007a) ได้ผลิตเส้นใยอิเล็กทรอนิกส์โปรตีนจากโปรตีนไข่ขาวโดยมีพอลิเอธิลีนผสมที่สัดส่วนโดยน้ำหนักร้อยละ 5 และใช้กรดฟอร์มิกเข้มข้นเป็นตัวทำละลาย พอลิเอธิลีนออกไซด์เป็นพอลิเมอร์สังเคราะห์ที่มีลักษณะสูตรโครงสร้างของโมเลกุลเป็นสายตรงยาว คล้ายกับพอลิเมอร์ของพอลิแซ็กคาไรด์ ในงานวิจัยดังกล่าวพบว่าสารละลายซึ่งมีองค์ประกอบของโปรตีนไข่ขาวเพียงอย่างเดียวนั้นมีความหนืดและสมบัติการเกี่ยวพันของโมเลกุลต่ำ ทำให้โมเลกุลของโปรตีนไข่ขาวไม่สามารถจัดเรียงตัวเป็นเส้นใยด้วยเทคนิคการอิเล็กทรอนิกส์โปรตีนนิ่ง นอกจากพอลิเมอร์ที่เป็นส่วนผสมจะมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความสามารถในการจัดเรียงตัวของโมเลกุลให้เป็นเส้นใยแล้ว ประเภทของตัวทำละลายกับชนิดของพอลิเมอร์ก็ยังนับเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง (Sangsanoh and Supapol, 2006; Tan et al, 2005)

งานวิจัยนี้จึงได้ดำเนินการวิจัยเพื่อต่อยอดจากงานวิจัยเดิม (wongsasulak 2007 a, b) ของผู้วิจัย โดยมีเป้าหมายหลักเพื่อผลิตแผ่นฟิล์มขนาดบางยืดหยุ่นที่รับประทานได้ด้วยเทคนิคอิเล็กทรอนิกส์โปรตีนนิ่ง (edible electrospun fibrous ultrathin film) ซึ่งมีไข่ขาวเป็นองค์ประกอบ การศึกษาประกอบด้วยงานวิจัยสองระยะคือ ระยะที่หนึ่งเป็นการผลิตแผ่นใยอิเล็กทรอนิกส์โปรตีนที่รับประทานได้จากพอลิเมอร์ผสมของไข่ขาวกับพอลิแซ็กคาไรด์ (เซลลูโลสแอซิเตท) และการศึกษาสมบัติการปลดปล่อยในสถานะที่มีความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันคือที่ pH 2 7.2 และ 9 งานวิจัยระยะที่สองเป็นการศึกษาเพื่อสำรวจความเป็นไปได้ในการพัฒนาเส้นใยให้เป็นโครงสร้างกลวงเพื่อบรรจุสารที่ต้องการกักเก็บแบบแกนร่วม (coaxial electrospun fiber)

แนวคิดวิจัยของงานวิจัยนี้คือ การใช้โครงสร้างพอลิแซ็กคาไรด์แบบเป็นเส้นตรงที่คล้ายกับโครงสร้างของพอลิเอธิลีนออกไซด์ทดแทนพอลิเอธิลีนออกไซด์ที่ได้ใช้ในงานวิจัยเดิมของผู้วิจัย (Wongsasulak et al., 2007) ในการเป็นพอลิเมอร์ผสมที่ช่วยในการขึ้นรูปเส้นใยนาโนที่ไข่ขาวเป็นองค์ประกอบ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยคือ เพื่อศึกษาการผลิตฟิล์มแผ่นใยขนาดบางยืดหยุ่นที่บริโภคได้ด้วยเทคนิคการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต และเพื่อศึกษาให้เข้าใจอย่างกระจ่างในเรื่องอิทธิพลของสัดส่วนผสมของเซลลูโลสแอซิเตทและตัวทำละลาย ที่มีต่อสมบัติทางวิทยากระแสน การนำไฟฟ้า และแรงดึงผิวของสารละลายพอลิเมอร์ผสม และรวมถึงอิทธิพลที่มีต่อสถานะของเส้นใยที่ได้ด้วย

ตอนที่ 1 การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตจากส่วนผสมของไข่ขาว (EA) กับเซลลูโลสแอซิเตท (CA) และการศึกษาสมบัติการปลดปล่อย

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายผสมของไข่ขาวกับเซลลูโลสแอซิเตทและการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

การเตรียมสารละลายผสมทำโดยผสมสารละลายตั้งต้นของไข่ขาวในกรดฟอร์มิกและของสารละลายเซลลูโลสแอซิเตทในกรดแอซิติก โดยสัดส่วนการผสมระหว่างเซลลูโลส/ไข่ขาวมีการปรับเป็น 3 สัดส่วนคือ 91/9, 77/23 และ 66/34 โดยในงานวิจัยนี้ใช้ชื่อว่า **Blend 91/9**, **Blend 77/23** และ **Blend 66/34** สัดส่วนและขั้นตอนการเตรียมแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1. ขั้นตอนการเตรียมและสัดส่วนของสารละลายผสมของไข่ขาวและเซลลูโลสแอซิเตท เพื่อใช้ปั่นเส้นใยผสมของไข่ขาวกับเซลลูโลสซึ่งมีสัดส่วนระหว่างเซลลูโลส/ไข่ขาวเป็น 91/9, 77/23 และ 66/34

Preparation step of			Components	
Stock solution of CA; stock CA			CA powder	20.0 g
			85% acetic acid	80.0 g
Stock solution of EA; stock EA			EA powder	12.0 g
			50% formic acid (99%)	88.0 g
CA-EA blending solutions			Stock solution blending volume ratio CA:EA	
Samples	Polymer wt. ratio (CA:EA)	Total polymer conc. (% w/w)	Stock CA (g)/stock EA (g)/Tween40®(g)	
Pure CA	100:0	20.0	20.00/-/-	
Blend 91/9	91:9	19.25	3.64/0.36/0.40	
Blend 77/23	77:23	18.25	3.08/0.92/0.72	
Blend 66/34	66:34	17.25	2.64/1.36/0.92	
Pure EA	0:100	12.00	-/ 20.00/-	

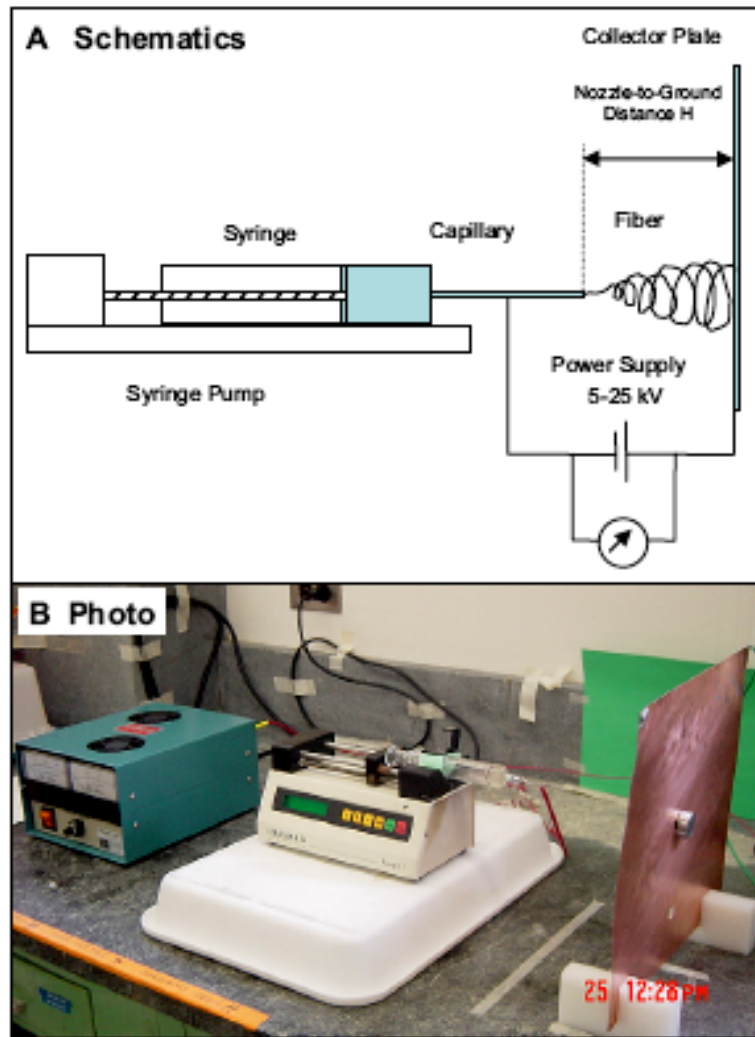
สำหรับสารละลายผสมจะเติม Tween® 40 เพื่อลดแรงตึงผิวซึ่งช่วยทำให้การขึ้นรูปเป็นเส้นใยสามารถทำได้ง่ายขึ้น อัตราส่วนที่เติม คือ 10, 18 และ 23 สำหรับสารละลายผสม Blend 91/9, Blend 77/23 และ Blend 66/34 (wt.%) สำหรับการศึกษาการปลดปล่อยได้ไ่วตามินบี 2 ไ่วเส้นใยโดยละลายผงวิตามินบี 2 ในสารละลายพอลิเมอร์ที่จะนำไปขึ้นรูป สัดส่วนการผสมแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2. ขั้นตอนการเตรียมและสัดส่วนของสารละลายผสมของไข่ขาวและเซลลูโลสแอซิเตท เพื่อใช้ปั่นเส้นใยผสมของไข่ขาวกับเซลลูโลสซึ่งมีสัดส่วนระหว่าง CA:EA:Tween:Vit. B₂ เป็น 91:5:3:1

Preparation steps of	Components		
Stock solution: CA	CA powder	2.00	g
	85% acetic acid	8.00	g
Stock solution: EA-vit B₂ mixing 1 st : EA-vit B ₂ #1	EA powder	1.20	g
	vit. B ₂ powder	0.12	g
	formic acid (99%)	8.68	g
mixing 2 nd : EA-vit B ₂ #2	EA-vit B ₂ #1	10.00	g
	Tween 40	0.72	g
EA-CA blending solution (total solid blending ratio=20 wt.%)	EA-vit B₂ stock solution	0.88	g
	CA stock solution (CA:EA:Tween:vit. B ₂ = 91:5:3:1)	10.00	g

2.2 การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

ลักษณะการติดตั้ง/จัดตั้งอุปกรณ์สำหรับปั่นเส้นใยแสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยเครื่องจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงมีช่วงความต่างศักย์ระหว่าง 0-30 kV เครื่องฉีดสารละลายสำหรับหลอดฉีดยา ซึ่งมีเข็มฉีดยาเป็นเหล็กสแตนเลส มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 0.69 mm หลอดฉีดยาดัดตั้งอยู่กับเครื่องฉีดสารละลายโดยอัตราการไหลของสารละลายถูกควบคุมที่ค่า 0.18 mL/h ให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าแก่สารละลายที่ 20 kV ในการดักจับเส้นใยใช้แผ่นโลหะทองแดงวางถัดจากปลายเข็มฉีดยาเป็นระยะประมาณ 15 cm อุณหภูมิห้องขณะปั่นเส้นใยควบคุมที่ 25 °C และค่าความชื้นสัมพัทธ์เป็นร้อยละ 50±5



รูปที่ 1. ลักษณะการติดตั้งและจัดตั้งอุปกรณ์สำหรับการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต

2.2 การวัดสมบัติของสารละลายพอลิเมอร์

2.2.1 สมบัติการไหลและความหนืด

การวัดความหนืดปรากฏของสารละลายพอลิเมอร์ใช้เครื่อง Rotational rheometer (MCR 150, Paar Physica, Germany) ซึ่งใช้ตุ้มและถ้วยวัด CC 17 โดยทำการวัดตัวอย่างละ 5 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 25 °C ค่าความเค้นเฉือนในพจน์ของอัตราเฉือนคำนวณจากสมการยกกำลัง ดังนี้

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n$$

โดยที่ σ คือ ความเค้นเฉือน $\dot{\gamma}$ คือ อัตราเฉือน K คือ ค่าคงที่สัมประสิทธิ์ความข้นหนืด และ n คือ ดัชนีการไหล ซึ่งเมื่อ $n = 1$ แสดงว่าของไหลมีพฤติกรรมการไหลแบบ Newtonian และ $n \neq 1$ แสดงว่าของไหลมีพฤติกรรมการไหลแบบ Non-Newtonian

2.2.2 ค่าการนำไฟฟ้า

ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายพอลิเมอร์ได้วัดด้วย Digital conductivity meter (Schott Model CG855, Germany) ที่อุณหภูมิ 25 °C

2.2.3 แรงตึงผิว

แรงตึงผิวของสารละลายพอลิเมอร์จะถูกทดสอบด้วยเครื่อง Digital tensiometer (Dataphysic Model DCT11, Germany) ซึ่งมีวงแหวนแพลทินัมขนาดปกติเป็นอุปกรณ์ทดสอบ โดยจะทำการทดสอบสารละลายพอลิเมอร์ปริมาณ 20 mL ที่อุณหภูมิควบคุม 25 °C ผลการทดสอบแรงตึงผิวจะรายงานในหน่วย mN/m ค่าที่รายงานได้จากการเฉลี่ยจากจำนวนซ้ำการทดสอบเท่ากับ 3 ครั้ง

2.3 การตรวจสอบลักษณะสมบัติของเส้นใยที่ได้

2.3.1 Thermal gravity analysis (TGA)

แผ่นฟิล์มใยที่ผลิตได้จะถูกนำมาตรวจสอบองค์ประกอบโดยเทคนิคของ Thermogravimetric analyzer: TGA (Mettler Toledo TGA/SDTA 851^o) โดยนำแผ่นเส้นใยน้ำหนัก 3 mg บรรจุในจานแพลทินัมและเพิ่มอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 °C ไปที่ 900 °C ที่อัตราการให้ความร้อนเท่ากับ 7 องศาเซลเซียส/นาที

2.3.2 Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

การตรวจสอบสารประกอบและลักษณะทางเคมีของแผ่นฟิล์มใยโดยเทคนิค FT-IR (Perkin-Elmer Model Spectrum GX, USA) ทำการทดสอบในช่วงเลขคลื่น (wave number) 4000-400 cm⁻¹ ซึ่งข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลเฉลี่ยจากการสแกน 16 ครั้ง

2.3.3 Scanning Electron microscopy (SEM)

ลักษณะวิทยาของเส้นใยที่ผลิตได้ตรวจสอบด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM: JEOL JSM-5800, USA) ด้วยความต่างศักย์ในการเร่งอิเล็กตรอน 10 kV ภาพที่ได้จำนวน 3 ภาพ จะถูกนำมาตรวจสอบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางด้วยโปรแกรม Image J (JEOL, USA)

2.4 การศึกษาลักษณะสมบัติของการปลดปล่อยสาร

สารละลายซึ่งใช้เป็นตัวกลางสำหรับการทดสอบการปลดปล่อยวิตามินบี 2 เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH เท่ากับ 1.2 และ pH 7.4 การทดลองทำโดยนำแผ่นฟิล์มใยซึ่งมีวิตามินบี 2 ที่ผลิตได้ มาตัดให้ได้ขนาด 2.5 × 5.0 cm แล้วนำไปวัดความหนาของแผ่นเส้นใยด้วยไมโครมิเตอร์ (Mitutoyo, Japan) ก่อนที่จะบรรจุลงในตะกร้าสแตนเลสสตีล ซึ่งตะกร้าที่บรรจุแผ่นเส้นใยจำนวน 4 แผ่น จะถูกนำไปแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ปริมาณ 360 mL ที่มี pH 1.2 หรือ 7.4 ในบีกเกอร์ขนาด 400 mL และมีอุณหภูมิ 37±0.5 °C โดยมีการกวนสารละลายด้วยใบพัดสแตนเลสสตีลที่

ความเร็วรอบ 100 ± 3 rpm (โดยอ้างอิงจาก Abraham and Srinath, 2007) ทั้งนี้จะทำการตรวจสอบความเข้มข้นของวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ ด้วยการนำสารละลายบัฟเฟอร์ที่เวลาต่างๆ มาตรวจสอบค่า Optical density (OD) โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 444 nm (Kagan et al., 2006)

กลไกการปลดปล่อยวิตามินบี 2 จากแผ่นเส้นใยสามารถประเมินได้ด้วยการพิจารณาข้อมูลที่สอดคล้องกับความสัมพันธ์ระหว่าง สัดส่วนระหว่างมวลวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อย ณ เวลาใดๆ (M_t) กับมวลของวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อย ณ เวลาที่สิ้นสุดการติดตาม (M_∞) ดังแสดงด้วยสมการยกกำลังดังนี้

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

เมื่อ	M_t	คือ มวลของวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อย ณ เวลาใดๆ (μg)
	M_∞	คือ มวลของวิตามินบี 2 ณ เวลาสุดท้ายของการติดตามการปลดปล่อย (μg)
	k	คือ ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย (h^{-1})
	n	คือ เลขยกกำลังการแพร่ของกลไกการปลดปล่อย
	t	คือ เวลา (h)

2.5 สถิติสำหรับการวิเคราะห์ผลการวิจัย

ค่าที่ได้จากการวัดสมบัติต่างๆ ได้นำมาตรวจสอบความแตกต่างด้วยวิธีทางสถิติที่เรียกว่า ANOVA แบบทางเดียวและ turkey's multiples range test. ผลการวิเคราะห์สถิติที่มีค่า $p < 0.05$ พิจารณาว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ค่ารายงานอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบน ($\bar{X} \pm SD$)

3. ผลการทดลองและบทวิจารณ์

3.1 ผลของสมบัติสารละลายที่มีต่อความสามารถในการขึ้นรูปเป็นเส้นใยและสถานะของเส้นใยที่เตรียมโดยการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

สมบัติการไหล ความหนืด การนำไฟฟ้าและความตึงผิวของสารละลายของไข่ขาว เซลลูโลสแอซิเตท และสารละลายผสมของไข่ขาวกับเซลลูโลสแอซิเตทแสดงในตารางที่ 3 จากผลการทดลองพบว่าองค์ประกอบของไข่ขาวมีสมบัติทางด้านความหนืดและค่าดัชนียกกำลังที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับเซลลูโลสแอซิเตท ค่าความหนืดที่ต่ำมากนี้สะท้อนถึงสมบัติการเกี่ยวพันของภายในโครงสร้างว่ามีค่า

น้อยมาก นอกจากนี้ยังมีค่าแรงตึงผิวและค่าการนำไฟฟ้าที่สูงมาก ซึ่งหมายถึงการต้องให้ค่าความต่างศักย์ที่สูงเพื่อเอาชนะแรงตึงผิวที่ interface ระหว่างสารละลายกับอากาศและสามารถยึดลำสายของพอลิเมอร์ที่จะถูกผลักรอกจากปลายเข็มให้เป็นลำเส้นเพื่อขึ้นรูปเป็นเส้นใย แต่ทั้งนี้ค่าการเกี่ยวพัน (entanglement) ของไขขาวที่ต่ำ เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ไม่สามารถขึ้นรูปไขขาวเป็นเส้นใยนาโนด้วยวิธีการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตดังแสดงในรูปที่ 2 โดยพบเพียงลักษณะของอนุภาคเป็นลักษณะหยดกระจายทั่วพื้นผิวของแผ่นดักจับเส้นใยในทางตรงข้ามผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเซลลูโลสซึ่งมีสมบัติความหนืดที่สูงกว่าไขขาวถึงประมาณ 9 เท่า และค่าการนำไฟฟ้าที่ต่ำกว่ามากจึงสนับสนุนให้สามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใยนาโนโดยวิธีการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตได้

ตารางที่ 3. สมบัติของสารละลายผสมของไขขาวกับเซลลูโลสแอซิเตทซึ่งไม่มี Tween® 40

Percentage ratio (CA:EA)	Apparent viscosity $\eta_{a,100}$ (Pa·s)	Power law consistency coefficient (K)	Power law flow-behavior index (n)	Surface tension (mN/m)	Electrical conductivity (mS/cm)
100:0	3.10±0.07	4.33±0.20	0.93±0.01	29.68±0.06	0.02±0.00
91:9	2.8±0.02	5.43±0.12	0.92±0.01	30.44±0.03	0.17±0.00
77:23	1.48±0.04	5.63±0.04	0.83±0.02	31.25±0.10	0.69±0.00
66:34	1.36±0.04	5.42±0.11	0.79±0.01	32.03±0.10	1.05±0.00
0:100	0.37±0.04	6.85±0.37	0.37±0.02	34.28±0.06	5.75±0.01

อย่างไรก็ดี พบว่าในกรณีของพอลิเมอร์ผสมของเซลลูโลสแอซิเตทกับไขขาวจะสามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้เพียงกรณีสัดส่วนผสมของเซลลูโลสแอซิเตทกับไขขาวเป็น 91:9 เท่านั้น ซึ่งเชื่อว่าผลของสมบัติสารละลายได้แก่ค่าความหนืด ค่าการนำไฟฟ้าและรวมถึงแรงตึงผิวยังไม่เหมาะสม เพราะฉะนั้นจึงได้ใช้พอลิเมอร์ที่มีโมเลกุลใหญ่และไม่มีประจุผสมเข้ากับพอลิเมอร์ผสม ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้สารลดแรงตึงผิวที่มีชื่อการค้าว่า Tween® 40 ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่สามารถใช้ผสมในอาหารและรับประทานได้ โดยสัดส่วนที่ผสมนั้นได้ใช้สัดส่วนที่ต่ำที่สุดที่สามารถทำให้ขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้ ซึ่งเท่ากับ 10, 18 และ 23 เปอร์เซ็นต์ สำหรับสารละลายผสมที่สัดส่วนของเซลลูโลสแอซิเตทต่อไขขาวเป็น 91:9, 77:23 และ 66:34 ตามลำดับ สารละลายผสมที่ได้นี้เรียกว่า blend 91/1, blend 77/23 และ blend 66/34 ตามลำดับ ผลการวัดสมบัติต่างๆ ของสารละลายพอลิเมอร์ซึ่งมี Tween® 40 ผสมแสดงในตารางที่ 4 ผลการทดลองพบว่าการปรับสมบัติของสารละลายด้วยสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมนั้นสามารถทำให้ขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้ดังแสดงในรูปที่ 2 (b-d)

ตารางที่ 4. สมบัติของสารละลายผสมของไข่ขาวกับเซตดูโลสแอซีเตทซึ่งมี Tween® 40

Percentage ratio (CA:EA)	Apparent viscosity $\eta_{a,100}$ (Pa·s)	Power law consistency coefficient (K)	Power law flow-behavior index (n)	Surface tension (mN/m)	Electrical conductivity (mS/cm)
91:9	2.73±0.06	5.42±0.23	0.85±0.01	28.69±0.02	0.14±0.01
77:23	1.32±0.01	5.81±0.17	0.68±0.01	29.16±0.05	0.42±0.00
66:34	1.19±0.09	3.51±0.26	0.77±0.01	29.28±0.05	0.73±0.01

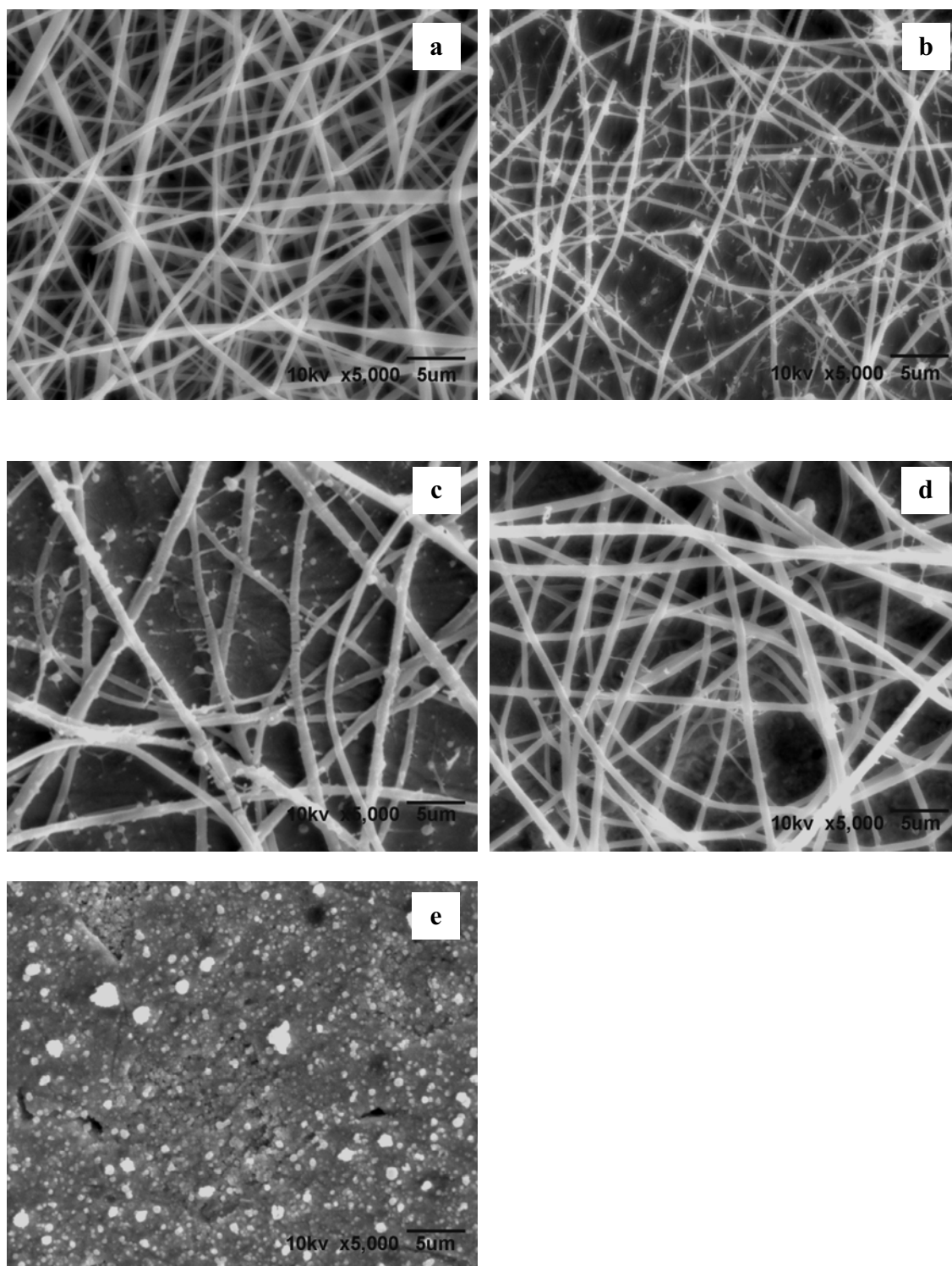
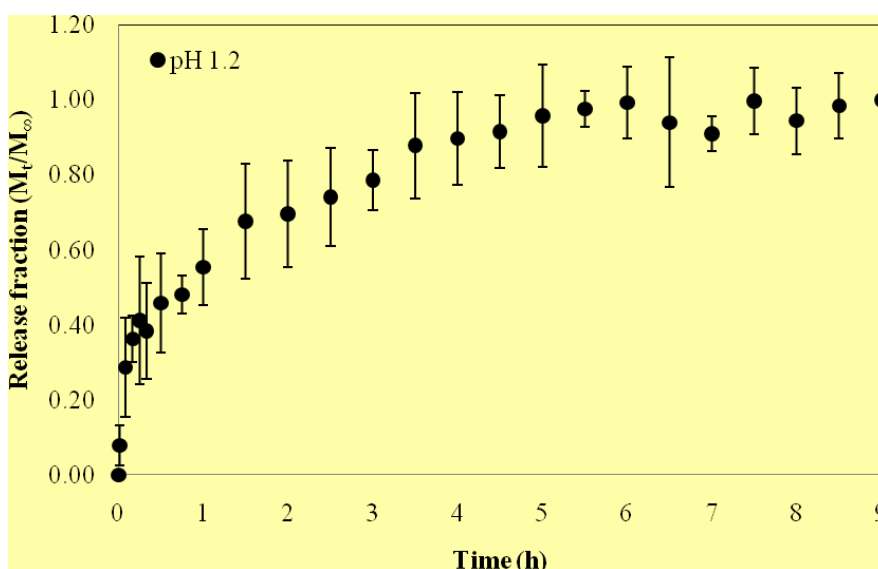


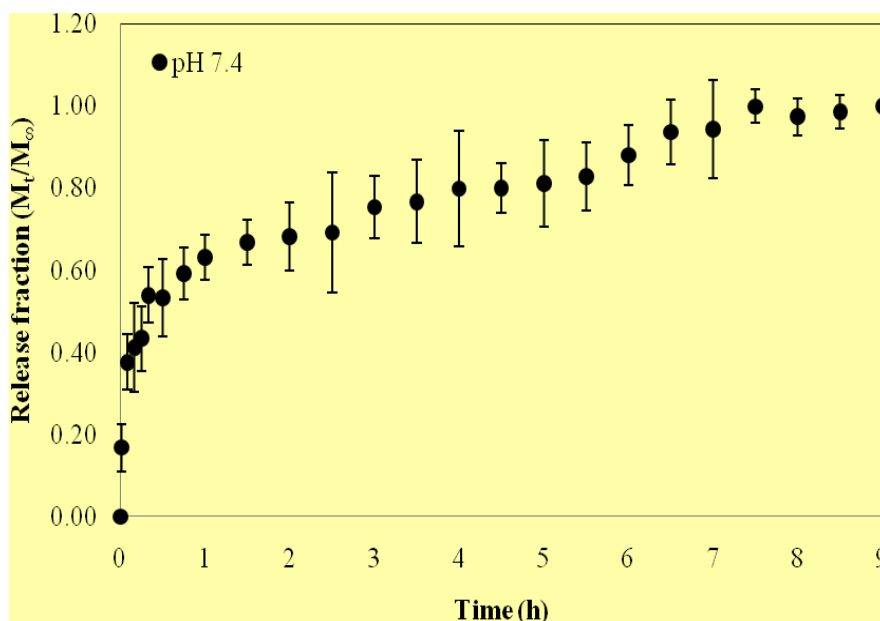
Figure 2. SEM micrographs of the electrospun nanofibers or electrospun particles from mixed solution of CA (20 wt% in 85% acetic acid) and EA (12 wt% in 50% formic acid). The micrographs from (A) to (D) were the morphology of (A) pure CA, (B) blend 91/9, (C) blend 77/23, (D) blend 66/34 and (E) pure EA. The bar scale is 5 μm .

3.2 สมบัติการปลดปล่อยสารของแผ่นฟิล์มใย

ในการศึกษาสมบัติการปลดปล่อยสารของเส้นใยผสมของ CA-EA ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.2 และ 7.4 ได้ใช้วิตามินบี 2 เป็นตัวอย่างของกรณีศึกษา โดยวิตามินบี 2 จะกระจายฝังแทรกในเมทริกซ์ของไข่ขาวมีสัดส่วนโดยมวลเป็น 1% ของมวลรวมขององค์ประกอบทั้งหมดในเส้นใย อุณหภูมิในการศึกษาการปลดปล่อยควบคุมไว้ที่ 37 ± 0.5 °C ติดตามการปลดปล่อยเป็นระยะเวลานาน 9 ชั่วโมง ปริมาณวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อยออกมาอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เวลาต่างๆ จะตรวจสอบโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง อัตราการปลดปล่อยทำโดยการเทียบเคียง profile ของปริมาณวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อย ณ เวลาใดๆ กับสมการรูปแบบยกกำลัง ผลของลักษณะการปลดปล่อย และค่าอัตราการปลดปล่อยวิตามินบี 2 ในสารละลายที่มีค่า pH เท่ากับ 2 และ 7.4 แสดงในรูปที่ 3 และ 4 ตามลำดับ ค่าที่คำนวณได้จากการเทียบเคียงด้วยสมการยกกำลังรายงานในตารางที่ 5



รูปที่ 3. สัดส่วนมวลของวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อย ณ เวลาใดๆ เทียบกับปริมาณมวลตั้งต้นจากแผ่นฟิล์มใยผสมของ CA-EA ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.2 อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C



รูปที่ 4. สัดส่วนมวลของวิตามินบี 2 ที่ปลดปล่อย ณ เวลาใดๆ เทียบกับปริมาณมวลตั้งต้นจากแผ่นฟิล์มโพลิเมอร์ของ CA-EA ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 อุณหภูมิ 37 ± 0.5 °C

ตารางที่ 5 ค่าคงที่อัตราการปลดปล่อย, เลขยกกำลังของการปลดปล่อย (n) ของวิตามินบี 2 จากแผ่นฟิล์มโพลิเมอร์ของ CA-EA ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 1.2 และ pH 7.4 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 ± 0.5 °C

Buffer pH	Release rate constant (k ; h^{-1})	Diffusion exponent (n)	r^2
1.2	0.06 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.99
7.4	0.10 ± 0.04	0.23 ± 0.04	0.99

ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการปลดปล่อยสารจากเส้นใยโพลิเมอร์นี้มีค่าค่อนข้างต่ำมากแนวโน้มเป็นลักษณะการปลดปล่อยอย่างช้าๆ ทั้งในสภาวะ pH 1.2 และ 7.4 จากผลในรูปที่ 3 และ 4 แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการปลดปล่อยสารทั้งหมด 100 % นั้นนานประมาณ 7 ชั่วโมง โดยที่ในสภาวะ pH 7.4 การเปลี่ยนแปลงช่วงต้นคือประมาณ 1 ชั่วโมงแรก (ประมาณ 10% แรกของช่วงเวลาทั้งหมด) จะเร็วกว่าใน pH 1.2 เล็กน้อยแต่จากนั้นอัตราการปลดปล่อยจะช้ากว่าใน pH 1.2 ผลการทดลองยังแสดง

ว่ากลไกการแพร่เป็นไปตาม Quasi-Fickian ซึ่งหมายถึงว่าอัตราการปลดปล่อยของวิตามินบี 2 จากแผ่นฟิล์มไฮผสมของ CA-EA ถูกควบคุมด้วยสองปรากฏการณ์ คือ การแพร่ของวิตามินบี 2 ผ่านโครงสร้างที่บวมพอง และอัตราการละลายของวิตามินบี 2 ในสารละลายตัวกลางซึ่งอยู่ในโครงสร้างที่บวมพอง และเลขกำลังการแพร่ที่มีค่าน้อยกว่า 0.5 หมายถึง อัตราของ Polymer relaxation มีค่ามากกว่าอัตราของ Solvent diffusion (Bajpai et al., 2002)

ตอนที่ 2 การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเส้นใยผสมของเซลลูโลสแอซิเตท (CA) กับ ใยขาวที่บรรจุสารจำลองในแกนร่วม (coaxial fibers)

หลังจากการศึกษาตอนที่ 1 ได้ดำเนินการจบลงในปีแรก ผู้วิจัยได้ศึกษาต่อในตอนที่ 2 ซึ่งเป็นการศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตเส้นใยผสมของเซลลูโลสแอซิเตท (CA) กับใยขาวที่บรรจุสารจำลองแบบแกนร่วม (coaxial fibers) โดยงานวิจัยหลักของตอนที่ 2 นี้ เป็นการพัฒนาชุดอุปกรณ์การผลิตเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตเพื่อให้หัวเข็มฉีดยามีลักษณะเป็นสองชั้นแบบแกนร่วม ข้อที่ดีกว่าของเส้นใยที่บรรจุสารแบบแกนร่วมคือสารละลายที่จะถูกห่อหุ้มหรือบรรจุลงในเมทริกซ์ของเส้นใยไม่จำเป็นที่ต้องมีสมบัติ compatible กับสารละลายพอลิเมอร์ที่เป็นเมทริกซ์ห่อหุ้ม นอกจากนี้สารที่จะถูกห่อหุ้มก็ไม่จำเป็นต้องมีสมบัติที่นำไฟฟ้าได้ รวมถึงการบรรจุแบบแกนร่วมยังสามารถป้องกันการสัมผัสโดยตรงระหว่างสารที่ถูกห่อหุ้มกับตัวทำละลายของพอลิเมอร์ที่ใช้ห่อหุ้ม ซึ่งโดยมากมักเป็นสารละลายกรดอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามการศึกษเบื้องต้นของผู้วิจัยพบว่าเส้นใยแบบแกนร่วมที่มีชั้นเปลือกนอกเป็นพอลิเมอร์ผสมของเซลลูโลสแอซิเตทกับใยขาวจะไม่สามารถขึ้นรูปด้วยเทคนิคดังกล่าวได้อย่างแน่นอน เพราะฉะนั้นจึงได้ใช้เฉพาะเซลลูโลสแอซิเตทเพียงองค์ประกอบเดียว วิธีการทดลองและผลการทดลองเป็นดังนี้คือ

2. วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารละลายสำหรับชั้นเปลือกนอกและชั้นแกนใน

สารละลายชั้นเปลือกนอกคือ สารละลาย CA เตรียมโดยละลายผง CA ในสารละลายกรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 85 และเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีความเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าโดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดได้ทดลองโดยทดลองปรับความเข้มข้นของ NaCl ในสารละลายพอลิเมอร์เป็น 3 ระดับคือ 0.75, 0.9 และ 1 เปอร์เซ็นต์และติดตามผลโดยตรวจสอบลักษณะสัญญาณวิทยาของเส้นใยที่ได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด เพื่อใช้เป็นค่าชี้วัดอัตราส่วนผสมที่เหมาะสมที่สุด สำหรับสารละลายชั้นแกนในได้ใช้อิมัลชันผสมของ PEG, เจลาตินและน้ำมันพืช ซึ่งเตรียมโดยละลายสาร PEG ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 85 หลังจากนั้นนำสารละลายผสมที่ได้ไปโฮโมจีไนซ์กับน้ำมันพืชและสารลดแรงตึงผิว (Tween[®] 40) สัดส่วนโดยน้ำหนักขององค์ประกอบ PEG/gelatin/oil/ Tween[®] 40 เป็น 87/10/2/1 รายละเอียดของวิธีการเตรียมและอัตราส่วนผสมของสารละลายชั้นเปลือก (shell layer) และชั้นแกนใน (core layer) แสดงในตารางที่ 6 และ 7 ตามลำดับ

ตารางที่ 6. ขั้นตอนการเตรียมและสัดส่วนการเตรียมสารละลายชั้นเปลือกนอก

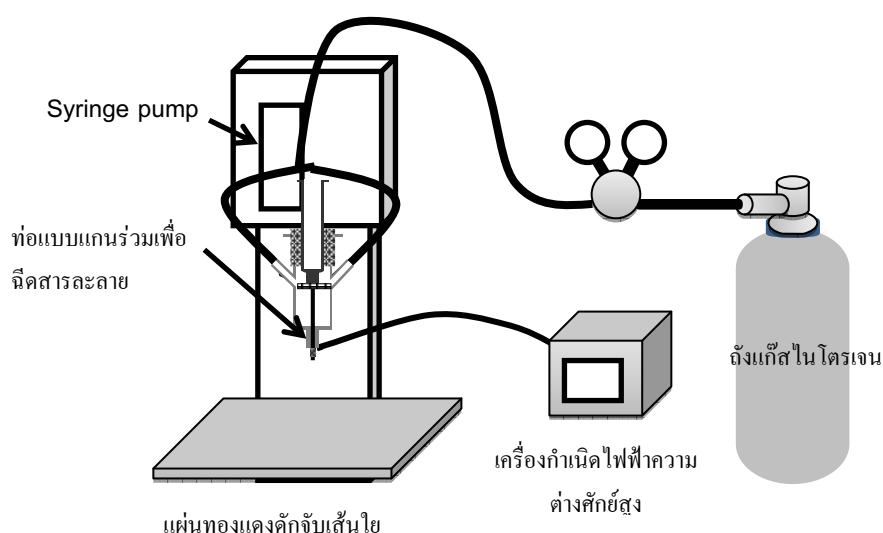
ขั้นตอนการเตรียมสารชั้นเปลือกนอก	ส่วนประกอบและอัตราส่วนผสม		
สารละลาย CA ❶	CA ผง	4.00	กรัม
	กรดอะซิติก (85%)	16.0	กรัม
สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 1 M ❷	โซเดียมคลอไรด์	58.5	มิลลิกรัม
	น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร
ผสมสารละลาย ❶ + ❷ โดยอัตราส่วนการผสมระหว่าง CA:NaCl แปรเป็น 3 สัดส่วนดังนี้			
a) 99.25:0.75	❶ = 20 กรัม; ❷ = 150 มิลลิกรัม		
b) 99.1:0.9	❶ = 20 กรัม; ❷ = 175 มิลลิกรัม		
c) 99.0:1.0	❶ = 20 กรัม; ❷ = 200 มิลลิกรัม		

ตารางที่ 7. ขั้นตอนการเตรียมและสัดส่วนการเตรียมสารชั้นแกนใน

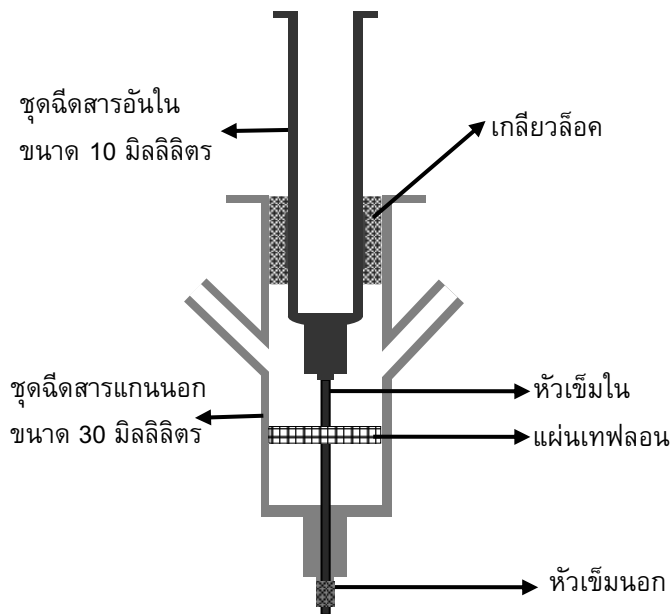
ขั้นตอนการเตรียมสารชั้นแกนใน	ส่วนประกอบและอัตราส่วนผสม		
สารละลายเจลาติน	เจลาตินผง	20.0	กรัม
	กรดอะซิติก (85%)	80.0	กรัม
สารละลาย PEG	PEG ผง	20.0	กรัม
	กรดอะซิติก (85%)	80.0	กรัม
ผสมสารละลายเจลาติน-PEG แล้วนำไปโฮโมจีไนซ์กับน้ำมันพืชและ Tween [®] 40 (สัดส่วนโดยน้ำหนักของ PEG/gelatin/oil/Tween40 = 87/10/2/1)			
	สารละลายเจลาติน	1.00	กรัม
	สารละลาย PEG	9.00	กรัม
	น้ำมันพืช	0.216	กรัม
	Tween [®] 40	0.105	กรัม

3.2 การติดตั้งอุปกรณ์การปั่นเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมด้วยไฟฟ้าสถิต

การติดตั้งชุดอุปกรณ์และอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมที่ใช้ในงานวิจัยนี้ แสดงในรูปที่ 5 และแสดงภาพขยายส่วนของท่อนิดสารละลายแบบแกนร่วมในรูปที่ 6 โดยชุดอุปกรณ์การปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตประกอบด้วยท่อแบบแกนร่วมเพื่อฉีดสารละลาย (coaxial spinneret) โดยเข็มแกนในและแกนนอก (popper & sons, USA) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.194 และ 0.514 มิลลิเมตร ตามลำดับ syringe pump (New Era Pump Systems NE1000, USA), เครื่องกำเนิดไฟฟ้าความต่างศักย์สูง ถึงไนโตรเจนแก๊ส และมีเตอร์ควบคุมความดันแก๊ส, เครื่องกำเนิดไฟฟ้าความต่างศักย์สูง (high voltage power supply) และแผ่นทองแดงเพื่อดักจับเส้นใย อัตราการป้อนเข้าของสารละลายชั้นแกนในและสารละลายชั้นเปลือกนอกควบคุมในช่วงระหว่าง 0.18-0.42 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง



รูปที่ 5. แผนภาพของการติดตั้งอุปกรณ์การปั่นเส้นใยแบบแกนร่วม



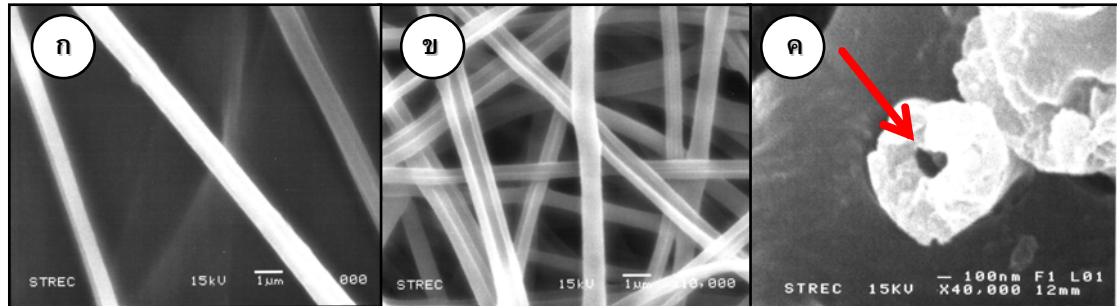
รูปที่ 6. แผนภาพขยายของท่อแบบแกนร่วมเพื่อฉีดสารละลาย

ผลการทดลองการผลิตเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมด้วยวิธีการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

4.1 การประกอบและพัฒนาอุปกรณ์การผลิตเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมด้วยวิธีการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

ผู้วิจัยได้ติดตั้งอุปกรณ์การผลิตเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมด้วยวิธีการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิตดังแสดงในรูปที่ 5. และ 6. ทั้งนี้ ช่วงระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาเพื่อประกอบและพัฒนาชุดอุปกรณ์นั้นค่อนข้างนานมากคือประมาณ 7-8 เดือน เนื่องจากมีจุด critical หลายประการและยังไม่มีรายงานวิจัยที่แสดงหรืออธิบายอย่างกระจ่าง ทั้งนี้สังเกตว่าการพัฒนาประสิทธิภาพของอุปกรณ์ดังกล่าวนี้น่าจะเป็นสิ่งที่ผู้วิจัยไม่มีใครเปิดเผยมากนัก ซึ่งน่าจะเป็นเนื่องจากเงื่อนไขของสิทธิบัตร โดยรวมแล้วระยะเวลาที่ใช้พัฒนาอุปกรณ์ที่ประกอบขึ้นในงานวิจัยนี้ประมาณถึง 7-8 เดือน อย่างไรก็ดี เมื่อได้ประกอบและติดตั้งอุปกรณ์การปั่นเส้นใยแบบแกนร่วมและได้ทดลองจนเชื่อว่าจะสามารถใช้งานได้ค่อนข้างดีแล้ว ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองเพื่อตรวจสอบศักยภาพของชุดอุปกรณ์ที่พัฒนาขึ้น โดยทดลองผลิตเส้นใยนาโนแบบทอกลวงของเซลลูโลสอะซิเตท (CA) ในการทดลองใช้สารละลายของ CA 20 wt.% ในกรดอะซิติก (85%) เป็นสารละลายชั้นเปลือกและใช้สารละลายโพลีเอทิลีนออกไซด์ (PEO) 4 wt.% ในสารละลายเอทานอล (เข้มข้น 90%) เป็นสารละลายชั้นแกนใน เส้นใยที่ผลิตได้ถูกนำไปตรวจสอบองค์ประกอบโดยใช้เทคนิคของ Fourier Transform Infrared Spectrometry (FT-IR) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscopy, SEM) จากนั้นนำไปละลายชั้นแกนในของ PEO ออกและนำไปตรวจสอบองค์ประกอบและโครงสร้างอีกครั้ง ซึ่งพบว่าได้โครงสร้างเส้นใยกลวงของเซลลูโลสอะซิเตท ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 850 nm

โดยมีขนาดท่อกลวงแกนในคือประมาณ 100 nm โครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยที่ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดแสดงในรูปที่ 7 และผลการตรวจสอบองค์ประกอบด้วยเทคนิค FTIR แสดงในรูปที่ 8.

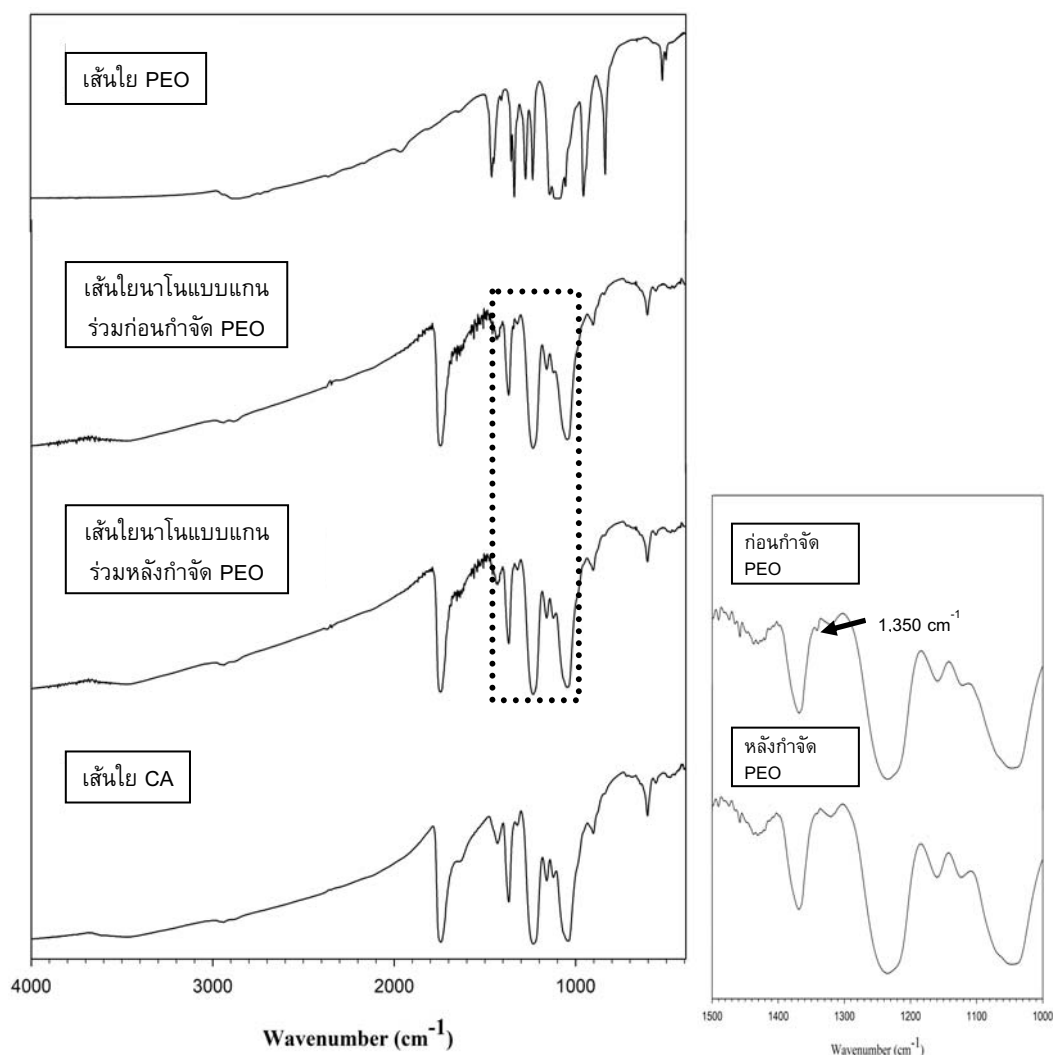


(ก) ก่อนกำจัดแกนใน PEO

(ข) หลังกำจัดแกนใน PEO
(เส้นใยกลวงของ CA)

(ค) ภาควัดขวางของเส้นใยกลวง
CA

รูปที่ 7. ภาพโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมของ CA/PEO ก่อน (ก) และหลัง (ข) กำจัดเอาองค์ประกอบของ PEO ออก และภาควัดขวางของเส้นใยที่กำจัดเอาองค์ประกอบของ PEO ออกแล้ว (ค)



รูปที่ 8. สเปกตรัมของเส้นใยนาโน; เส้นใย PEO, เส้นใยนาโนแบบแกนร่วม CA/PEO ทั้งก่อนและหลังกำจัดเออองค์ประกอบของ PEO (สารชั้นแกนใน) และเส้นใย CA (ภาพด้านซ้ายขยายเพื่อแสดงตำแหน่ง peak ที่มี signal ต่ำหลังกำจัด PEO)

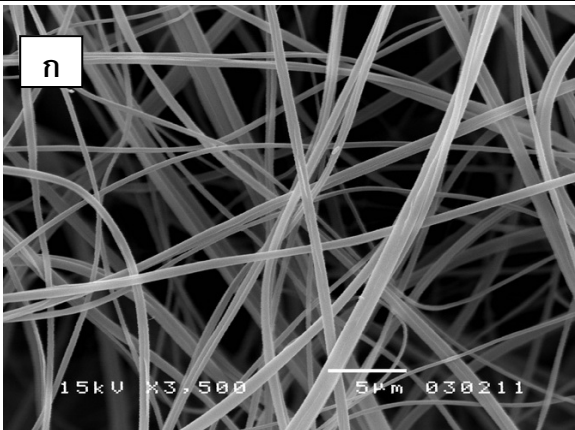
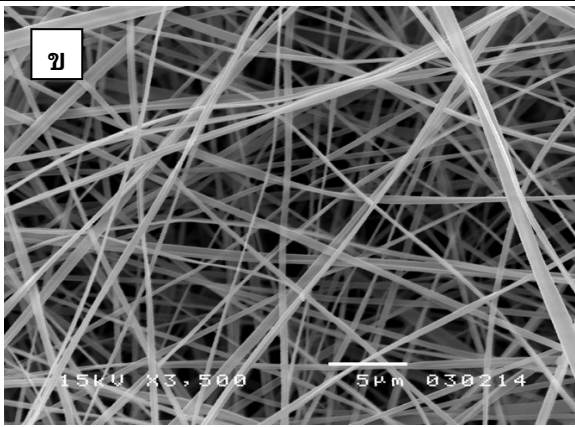
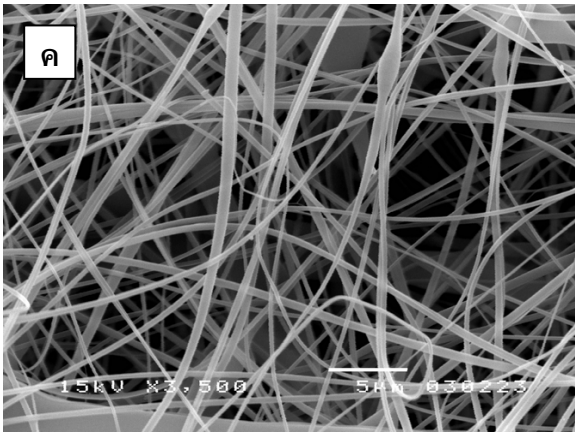
ผลการตรวจสอบครั้งนี้ได้ยืนยันว่าชุดอุปกรณ์การปั่นเส้นใยแบบแกนร่วมด้วยไฟฟ้าสถิตมีศักยภาพเพียงพอในการผลิตเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมได้ ถ้าคัดัดมาได้เปลี่ยนสารชั้นแกนในต้นแบบจาก PEO มาเป็นสารละลายอิมัลชันของน้ำมันพืชในสารละลายผสมของเจลาตินกับ PEG เพื่อเป็นแบบจำลองของโปรตีนที่จะถูกห่อหุ้มในโครงสร้างของเส้นใยกลวงของ CA ซึ่งอิมัลชันนี้เตรียมโดยการโฮโมจิไนซ์สารละลายเจลาตินรวมกับน้ำมันพืชและ PEG ร่วมกับการเติมสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 โมลาร์ ในสารละลาย CA ในสัดส่วน 1% เพื่อเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าตามที่ Moghe และ Gupta (2008) ได้รายงานว่าค่าการนำไฟฟ้าของสารชั้นแกนในควรมีค่าต่ำกว่าสาร

ชั้นเปลือกนอก ผลการวัดสมบัติค่าการนำไฟฟ้าระหว่างค่าของสารละลายชั้นเปลือกนอก / แกนใน
ในพจน์ของค่าการนำไฟฟ้า และค่าอัตราการป้อนแสดงในรูปที่ 9 และ 10

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้สังเกตว่าอัตราส่วนของค่าการนำไฟฟ้า อัตราป้อน ความหนืด ของชั้น
เปลือกเทียบกับชั้นแกนในมีผลสำคัญต่อสัญญาณของเส้นใยและความยากง่ายในการขึ้นรูปเส้นใยแกน
ร่วม จึงได้ศึกษาผลของอัตราส่วนดังกล่าว ซึ่งได้ผลการศึกษาโดยสรุปดังนี้

4.2 การศึกษาผลของอัตราส่วนค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายชั้นเปลือกนอกและสารชั้นแกนในที่มี ต่อสัญญาณของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วม

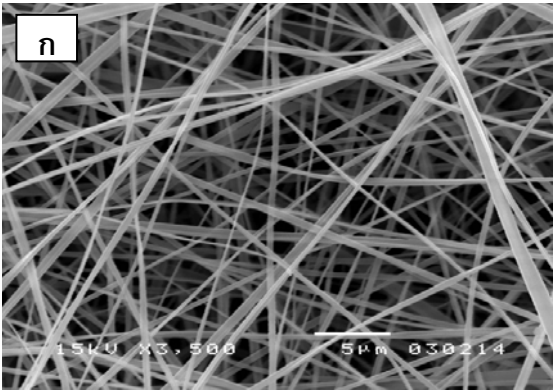
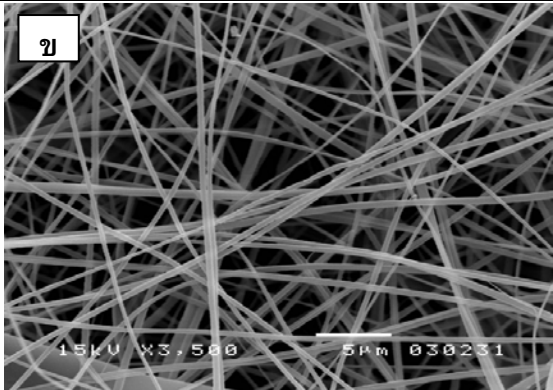
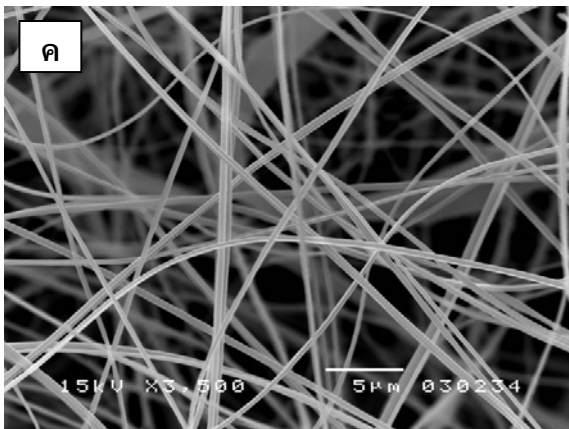
จากการทดลองปรับเปลี่ยนอัตราส่วนค่าการนำไฟฟ้าของสารชั้นเปลือกนอกและสารชั้นแกน
ในเป็น 1.09, 1.27 และ 1.40 โดยใช้สภาวะในการปั่นเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมที่สภาวะเดียวกันคือ
ใช้ความต่างศักย์เท่ากับ 29 kV อัตราการป้อนเข้าของสารชั้นแกนในและสารชั้นเปลือกนอกมีค่า
เท่ากับ 0.18 และ 2.8 มิลลิเมตรต่อชั่วโมง และระยะห่างระหว่างปลายเข็มถึงฉากรับมีค่าเท่ากับ 18 cm
เมื่อนำเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมที่ผลิตได้ไปวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าเส้นใยที่ผลิตได้มีค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 720 ± 177 , 405 ± 112
และ 392 ± 106 นาโนเมตร เมื่ออัตราส่วนค่าการนำไฟฟ้าของสารชั้นเปลือกนอกและสารชั้นแกนใน
เป็น 1.09, 1.27 และ 1.40 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9

อัตราส่วนค่าการนำไฟฟ้าของสารชั้นเปลือกนอกและสารชั้นแกนใน	ภาพโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (nm)
(ก) 1.09		720±177
(ข) 1.27		405±112
(ค) 1.40		392±106

รูปที่ 9. ภาพโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมของ CA/อิมัลชันของเจลาตินที่อัตราส่วนค่าการนำไฟฟ้าของสารชั้นเปลือกนอกต่อสารชั้นแกนใน (ก) 1.09, (ข) 1.27 และ (ค) 1.40 มาตรฐานแท่งขนาดเท่ากับ 5 μm

4.3 การศึกษาผลของอัตราการป้อนของสารแกนในที่มีต่อลักษณะของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วม

จากการทดลองปรับเปลี่ยนอัตราป้อนของสารชั้นแกนในเป็น 0.18, 0.30 และ 0.42 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง โดยให้อัตราการป้อนเข้าของสารชั้นเปลือกนอกมีค่าคงที่เท่ากับ 2.8 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรืออัตราส่วนของอัตราป้อนของแกนในต่อแกนนอกเพิ่มขึ้นจาก 0.06:1, 0.10:1 และ 0.15:1 พบว่าค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมมีค่าเป็น 405 ± 112 , 436 ± 118 และ 501 ± 132 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 10

อัตราการป้อนของสาร ชั้นแกนใน (มิลลิลิตร ต่อชั่วโมง)	ภาพโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใย	เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย (nm)
0.18		405 ± 112^a
0.30		436 ± 118^b
0.42		501 ± 132^c

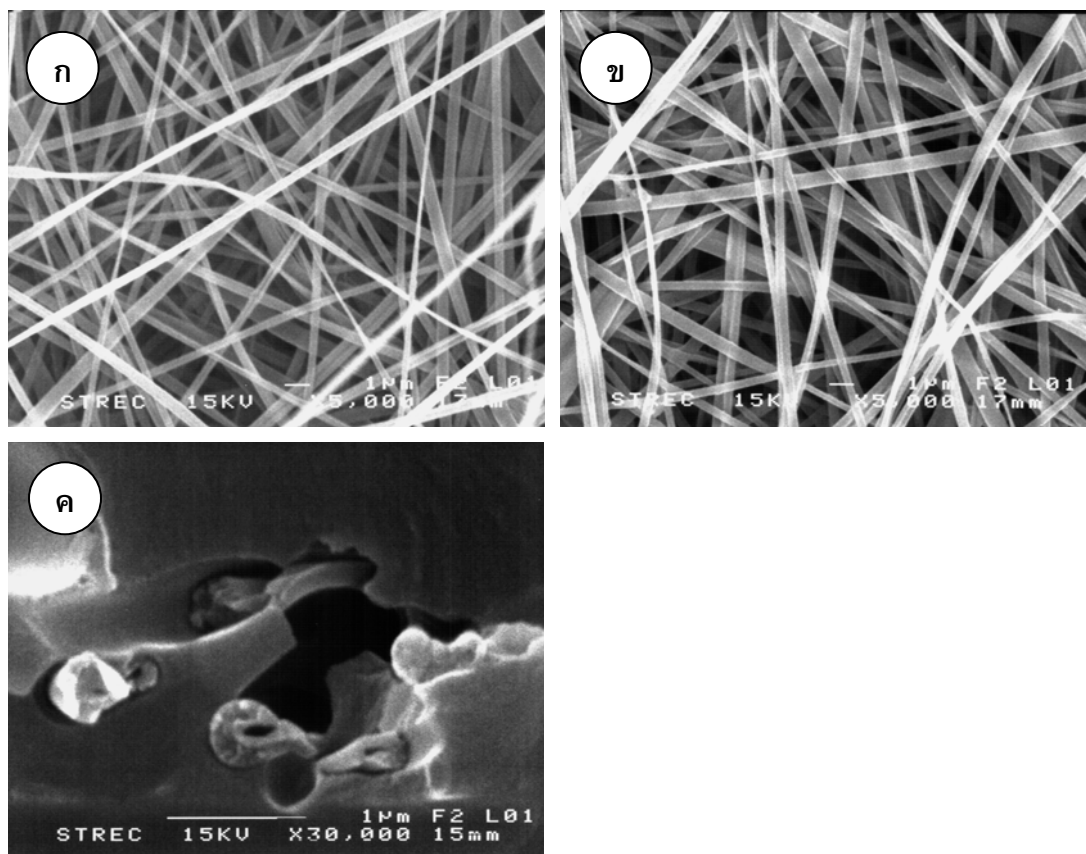
รูปที่ 10. ภาพโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมของ CA/อิมัลชันของเจลาติน ที่ผลิตจากอัตราการป้อนเข้าของสารชั้นแกนในเท่ากับ (ก) 0.18, (ข) 0.30 และ (ค) 0.42 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง แท่งมาตราส่วนมีขนาดเท่ากับ 5 μm

4.4 การตรวจสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับสมบัติการปลดปล่อยอิมัลชันผสมระหว่างพอลิเอธิลีนไกลคอลกับ เจลาตินที่บรรจุในแกนร่วมของเส้นใยเซลลูโลสแอซิเตทที่เตรียมโดยการปั่นด้วยไฟฟ้าสถิต

อัตราส่วนการบวมพองของฟิล์มประกอบ (น้ำหนักของฟิล์มประกอบหลังแช่ในสารละลาย บัฟเฟอร์นาน 120 ชั่วโมงต่อน้ำหนักเริ่มต้น) มีค่าเท่ากับ 13.1 ± 0.3 รูปที่ 11 แสดงการเปรียบเทียบ โครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วม CA/เจลาติน-PEG ก่อนและหลังแช่ใน สารละลายบัฟเฟอร์ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาคือ 120 ชั่วโมง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสัณฐานวิทยาของ เส้นใยนาโนแบบแกนร่วมยังคงสมบูรณ์ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาคือ 120 ชั่วโมง นอกจากนั้นยัง พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์มีค่า เพิ่มขึ้นจาก 405 ± 112 เป็น 525 ± 68 nm อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้การศึกษาลักษณะการปลดปล่อยสาร ของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นและจะดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมในงานวิจัย โครงการถัดไปของผู้วิจัย

4. สรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิตเพื่อผลิตแผ่นฟิล์มเส้นใยนาโนซึ่งมี ส่วนประกอบของไข่ขาวกับเซลลูโลสแอซิเตท ความมุ่งหมายเดิมของงานวิจัยคือการผลิตเส้นใยนา โนจากไข่ขาวเป็นหลักเนื่องจากโปรตีนไข่ขาวมีสมบัติการเป็น pH-sensitive ที่ดี โดยมีเซลลูโลสแอซิ เตทเป็นส่วนผสมซึ่งจะทำหน้าที่ช่วยในการขึ้นรูปเป็นเส้นใย อย่างไรก็ตามผลการทดลองพบว่าไม่ สามารถขึ้นรูปเส้นใยนาโนจากไข่ขาวเป็นหลักแม้ว่าจะมีการดัดแปรสมบัติทางด้านความหนืดและค่า การนำไฟฟ้าด้วยสารลดแรงตึงผิวแล้วก็ตาม โดยพบว่าสัดส่วนระหว่างไข่ขาวกับเซลลูโลสแอซิเตทที่ สามารถขึ้นรูปเป็นเส้นใยได้เท่ากับ 9:1 ปัญหาหลักของการไม่สามารถขึ้นรูปเส้นใยนาโนที่มี องค์ประกอบของไข่ขาวเป็นหลักคือ การขาดสมบัติการเกี่ยวพันแต่มีค่าการนำไฟฟ้าและแรงตึงผิวที่ สูงมาก ทำให้ต้องใช้ศักย์ไฟฟ้าที่สูงแต่ไข่ขาวเองกลับมีสมบัติการเกี่ยวพันที่ต่ำจึงไม่สามารถยึดค่า กระแสของสารละลายที่ฉีดผ่านปลายท่อได้เป็นเส้นสาย หน้าที่หลักของเซลลูโลสแอซิเตทก็จะเป็น พอลิเมอร์โครงสร้างในขณะที่ไข่ขาวทำหน้าที่เป็นวัสดุภาคที่เติมลง(Filler) ในเมทริกซ์ของพอลิแซค คาไรด์ ซึ่งเป็นวัสดุภาควงการปลดปล่อยสาร โดยเชื่อว่าช่วยส่งเสริมให้เส้นใยเกิดโครงสร้างพูน เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทำให้เกิดการปลดปล่อยสารในอัตราที่เพิ่มขึ้น เส้นใยที่ได้เตรียมได้ในงานวิจัยครั้งนี้ น่าจะให้ผลที่น่าสนใจเกี่ยวกับการนำส่งสารนิวทราซูติคัล หรือยาในทางเดินอาหาร เพราะฉะนั้น การศึกษาต่อยอดจากงานวิจัยนี้คือการพัฒนาสมบัติการ เกาะติดกับเนื้อเยื่อและการศึกษาให้เข้าใจอย่างกระจ่างเกี่ยวกับลักษณะการปลดปล่อยสารใน ทางเดินอาหารของแผ่นฟิล์มใยนี้



รูปที่ 11. ภาพโครงสร้างระดับจุลภาคของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมของ CA ที่บรรจุอิมัลชันของน้ำมันในสารละลายผสมของเจลาตินกับ PEG ก่อนแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 (ก) และหลังแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์เดียวกันเป็นเวลา 120 ชั่วโมง (ข) โดยรูป (ค) แสดงภาคตัดขวางของเส้นใยนาโนแบบแกนร่วมหลังแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.4 ซึ่งพบว่าเป็นท่อกลอง

5. เอกสารอ้างอิง

- Bhattarai N., Edmondson D., Veisoh O., Matsen FA. and Zhang M. (2005) "Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility" *Biomaterials*, 26(31): 6176-6184.
- Christopher J. Buchko, Loui C. Chen, Yu Shen and David C. Martin (1999) "Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films" *Polymer*. 40(26): 7397-7407.
- Gupta B.S., King M.W., Hudson M.S., Lobo E.G. Electrospun Core-Sheath Fibers for Soft Tissue Engineering. National Textile Center Research Briefs: June 2007. Project number: F05-NS04.
- Huang Z-M., Zhang Y-Z., Kotaki M. and Ramakrishna S. (2003) "A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites" *Composites Science and Technology*, 63(15): 2223-2253.
- Huang Z-M., Zhang YZ., Ramakrishna S. and Lim CT. (2004) "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers" *Polymer*, 45(15): 5361-5368.
- Jiang H., Hu Y., Li Y., Zhao P., Zhu K. and Chen W. (2005) "A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents" *Journal of Controlled Release*, 108(2-3): 237-243.
- Kenawy (E-R), Bowlin GL., Mansfield K., Layman J., Simpson DJ., Sanders EH. and Wnek GE. (2002) "Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend" *Journal of Controlled Release*, 81(1-2): 57-64.
- Maretschek S., Greiner A., Kissel T. 2008. "Electrospun biodegradable nanofiber nonwovens for controlled release of proteins". *Journal of Controlled Release*, 127(2): 180-187.
- Moghe A.K. and Gupta B.S. 2008. "Co-axial Electrospinning for Nanofiber Structures: Preparation and Applications". *Polymer Reviews*, 48(2): 353 – 377.
- Peesan M., Rujiravanit R., and Supaphol P. (2006) "Electrospinning of Hexanoyl Chitosan/Polylactide Blends," *Journal of Biomaterials Science - Polymer Edition*, 17(5): 547-565.
- Sangsanoh P. and Supaphol P. (2006) "Stability Improvement of Electrospun Chitosan Nanofibrous Membranes in Neutral or Weak Basic Aqueous Solutions" *Biomacromolecules*, 7(10), 2710-2714.
- Tan, S-H. Inai R., Kotaki M. and Ramakrishna S. (2005) "Systematic parameter study for ultra-fine fiber fabrication via electrospinning process" *Polymer*, 46(16): 6128-6134.
- Taepaiboon P., Rungsardthong U., and Supaphol P. (2006) "Drug-Loaded Electrospun Mats of Poly(vinyl alcohol) Fibres and Their Release Characteristics of Four Model Drugs," *Nanotechnology*, 17(9):, 2317-2329. Impact factor: 2.993
- Weiss, J., P. Takhistov and D. J. McClements (2006). "IFT Scientific Status Summary: Functional Materials in Food Nanotechnology" *Journal of Food Science*, 71(9): R107-R116.
- Wongsasulak S. (2005). "Release mechanisms from composite structure of egg albumen and cassava starch" a PhD thesis submitted to King Mongkut's University of Technology Thonburi, Department of Food Science. Bangkok, Thailand.

- Wongsasulak S., Kit K.M., McClements D.J., Yoovidhya T. and Weiss J. (2007) "The effect of solution properties on the morphology of ultrafine electrospun egg albumen-PEO composite fibers" *Polymer*, 48(2): 448-457.
- Wongsasulak S., Yoovidhya T., Bhumiratana S. and Hongprabhas P. (2007) "Physical properties of egg albumen and cassava starch composite network formed by a salt-induced gelation method" *Food Research International*, 40(2): 249-256.
- Xu X., Yang L., Xu X., Wang X., Chen X., Liang Q., Zeng J. and Jing X. (2005) "Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions" *Journal of Controlled Release*, 108(1, 2): 33-42.
- Zeng J., Xu X., Chen X., Liang Q., Bian X., Yang L. and Jing X. (2003) "Biodegradable electrospun fibers for drug delivery" *Journal of Controlled Release*, 92(3): 227-231.
- Zeng J., Yang L., Liang Q., Zhang X., Guan H., Xu X., Chen X. and Jing X. (2005) "Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation" *Journal of Controlled Release*, 105(1-2): 43-51.
- Zhang J.-F., Yang D.-Z., Xu F., Zhang Z.-P., Yin R.-X. and Nie J. 2009. "Electrospun Core-Shell Structure Nanofibers from Homogeneous Solution of Poly(ethylene oxide)/Chitosan" *Macromolecules*. 42: 5278-5284.

Outputs:

International Publications:

1. Wongsasulak S.* , Patpeejumruswong M., Weiss J., Supapol P. and Yoovidhya T. “Electrospinning of food-grade nanofibers of cellulose acetate and egg albumen blend”. (*submitted to Journal of Food Engineering: Under review*)
2. Wongsasulak S*. Sakuldoa S. and Yoovidhya T. “Coaxial electrospinning of cellulose acetate carrying protein solution nanofibers and its release characteristics”. (*Manuscript in preparation*)

Presentation with proceedings: (International conference)

1. Patapeejumruswong M., Yoovidhya T. and Wongsasulak S*. “Electrospinning of food grade nanofibers from egg albumen-cellulose acetate blend”. *Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON) 2008*. Bangkok, THAILAND. Jan 30-Feb 1, 2008. p.228. (Poster presentation)
2. Krengvithaya C., Yoovidhya T. and Wongsasulak S*. “Fabrication and release characteristics of cellulose acetate-egg albumen blend nanofibrous film”. *The Proceedings of the International Conference on Innovations in Food Processing Technology and Engineering (ICFPTE'08)*, Asian Institute of Technology, Pathumthani, Thailand 19-20 January 2009. (Oral presentation)
3. Sakuldao S., Yoovidhya T. and Wongsasulak S*. “Fabrication of hollow nanofibers from cellulose acetate by coaxial electrospinning technique” *The proceedings of Food Innovation Asia Conference 2009*. June 18-19, 2009. Bangkok. (Poster presentation)

Presentation with abstracts:

1. Wongsasulak S*. and Yoovidhya. “Fabrication of Food Grade Nanofibers for Future Application of Neutraceutical Delivery in Human”. *the 21st annual conference of the Thai Society for Biotechnology*. September 24-25, 2009. Bangkok. (Oral presentation)

Others:

1. เสาวคนธ์ วงสาสุลักษณ์ “การพัฒนาฟิล์มไยนาโนจากเส้นใยไข่ขาว” หนังสือพิมพ์กรุงเทพธุรกิจ ฉบับวันที่ 27 ตุลาคม 2551.
2. http://siweb.dss.go.th/news/show_abstract.asp?article_ID=2006 “ฟิล์มนาโนจากไข่ขาว”

Graduated students:

Three Master degree (M.Eng.; Food Engineering) students:

- 2007: Miss Manaschuen Patapeejumraswong
(Electrospinning of ultrafine cellulose acetate-egg albumen blend fibers)
- 2008: Mr. Chakkrit Krengwithya
(Electrospinning of food grade cellulose acetate-egg albumen blend for bioactive compound delivery)
- 2008: Miss Sutana Sakuldao
(Electrospinning of Cellulose Acetate Coaxial nanofibers)

Electrospinning of Food grade Nanofibers from Egg Albumen-Cellulose Acetate Blends

Manaschuen Patapeejumruswong, Tipaporn Yoovidhya, Saowakon Wongsasulak*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, Thailand

**E-mai: saowakon@pdti.kmutt.ac.th , Tel: +66-2-470-9341*

ABSTRACT

The number of chronic diseases threatening the health of consumers has greatly increased. Recently, nano-structures with high surface areas have been developed to precisely control the release kinetics of bioactive compounds. Electrospun nanofibers have been reported as excellent drug carrier that not only promotes a very high load with respect to their overall mass but have also shown a much more ideal zero-order release kinetics as compared with the spherical nanoparticles. In this study, the food grade nanofibers were electrospun from blended solutions of egg albumen (EA) in 50% formic acid and cellulose acetate (CA) in 85% acetic acid. The ratio of CA to EA dissolved in the mixed solvents was varied from 1:0 to 1:0.1, 1:0.3, 1:0.5 and 0:1. The suspension property was studied by viscometer. Morphology of the electrospun fibers was examined by SEM. The results evidently suggested that EA lacks of sufficient entanglement and also possesses very high surface tension, thereby is unable to form nanofibers. An addition of CA and surfactant (TWEEN 40) resulted in lower electrical conductivity and surface tension that can lead to the formation of EA-CA blended nanofibers. The diameters of the blended nanofibers were 261 ± 29 , 281 ± 44 , 404 ± 61 and 441 ± 66 nm corresponding to the blended ratios of CA:EA of 1:0, 1:0.1, 1:0.3, and 1:0.5, respectively. To the best of our knowledge, this study is the first report of the food grade nanofiber fabrication by using electrospinning technique.

Keywords

Biomaterial / Cellulose acetate / Egg Albumen / Electrospinning / Nanofibers

1. INTRODUCTION

Electrospinning is a technique used to form long non-woven ultrafine fibers, i.e., fibers with diameters of up to several hundred nanometers (1-3). In general, fibers may have size ranging from 40 to 1000 nm (1,4), but fibers as thick as 5000 nm have also been produced (5). Electrospun fiber is produced via ejection of a polymeric jet from positive charged viscous polymeric solution through a capillary tip to an electrical grounded target. The solvent evaporates rapidly from the ejected jet during travels from the capillary to the grounded target and leave behind only fibers with high surface to volume ratio on the collecting plate. Because of the rapid evaporation and simultaneously superimposed mechanical stresses due to developing bending instabilities of the polymer jet, polymers in electrospun fibers are more oriented than the conventional polymer and therefore exhibit better mechanical properties and higher thermal stability (6-10). Consequently, interest in production of electrospun fibers from biodegradable and/or edible biopolymers is gaining increasing interest in the foods, pharmaceuticals and cosmetics. To date, electrospun fibers have been used to manufacture filter media, cosmetic skin masks, nanosensors, military protective clothing, control drug delivery matrices, and tissue scaffolding for wound dressings (3). It has been previously demonstrated by our group that egg albumen (EA) based ultrafine fibers are superior drug carriers. They can withstand the stomach's severe acidic condition and release the bioactive at the alkaline pH of the intestine thereby yielding maximum absorption (11). However, its globular molecular structure resulted in low entanglement and led to failure in nanofiber formation. This research was therefore aims to improve the fabrication of edible EA based nanofiber by blending with a more processible cellulose acetate (CA). The effects

of solution properties of EA-CA (i.e., viscosity, surface tension and electrical conductivity) on electrospinning ability and fibers morphology are investigate.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Preparation of electrospun solution and setup of the elctrospinning apparatus

EA powder (Igreca, France) was purchased from Winner Group Enterprise and CA powder having M_w of 30 kDa (acetyl content = 39.7% and degree of acetyl substitution ≈ 2.4) was purchased from Sigma-Aldrich (Switzerland). EA-CA blended solution was prepared by blending EA solution (in 95% formic acid) having concentration of 20 %w/v with CA solution (in 85% acetic acid). The final blended ratio was 1:0, 1:0.1, 1:0.3, 1:0.5 and 0:1 corresponding to the weight ratio of CA to EA. A 30-mL syringe (Top, Japan) containing 10 mL of blended solution and equipped with stainless steel needle having inner diameter of 0.69 mm (Hamilton No.91019) was mounted on a syringe pump (New Era Pump Systems; NE1000, USA). The stainless steel needle was connected to a high voltage generator (Gamma High Voltage; ES30P-5W, USA) operated in positive DC mode. A grounded copper plate was used as electrospun particle collecting plate. All experiments were carried out at ambient condition (25 °C, RH 50±5%).

2.2 Investigation of solution property

Apparent viscosity of the blended solution was determined by using a rotational rheometer (Haake VT500, Germany) with a double coaxial bob and cup (length = 61.4 mm, diameter = 10.1 mm, gap width = 1.45 mm). Shear stress (σ , Pa) of the blended solution was recorded as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) ranging between zero and 400 s^{-1} . The temperature of the loaded sample was controlled at 25±0.5 °C. The reported results were averaged from triplicate measurements. The recorded data of shear stress versus shear rate were fitted to the power law model and then flow behavior consistency and flow index were obtained as described by Lapasin and Prigl, 1995 (12)

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n$$

where σ is the shear stress, $\dot{\gamma}$ is the shear rate, K is the consistency coefficient and n is the flow-behavior index which reflects the viscosity of the solution, i.e., $n = 1$ if the solution behaves Newtonian and $n \neq 1$ if the solution behaves non-Newtonian (e.g., shear thinning or shear thickening).

The electrical conductivity of the blended solution was determined by using a digital conductivity meter (Schott, Germany). Results are averaged from three measured data and two replications of sample preparation.

2.3 Characterization of electrospun product morphology

The morphology of the electrospun fibers and/or beads was evaluated by scanning electron microscopy (SEM; model JSM 5800, JEOL USA). Fibers were spun directly on a grounded brass SEM stub that was mounted on the collecting plate. After deposition of the samples approximately 10-15 mins, the stub was removed and sputter coated with gold using coating condition of 2 kV, 5 mA for 2 mins with an argon backfill at 8 Pa. The average diameter of the electrospun fibers was determined by image analysis software namely Image J for microscopy (NIMH, Maryland, USA.).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Solution properties of CA-EA blended solution

The apparent viscosity at shear rate of 100 s^{-1} ($\eta_a, 100$) of 12 wt% EA in 50% formic acid was 0.3797 Pa.s whilst the one of CA (20 wt% in 85% acetic acid) was 3.12±0.03 Pa.s. The apparent viscosity of

the blended solutions at that shear rate decreased to 2.73 ± 0.06 , 1.32 ± 0.01 , and 1.1901 ± 0.09 Pa·s upon increasing the CA-EA ratios from 1:0.1 to 1:0.3 and 1:0.5, respectively (Table 1). The reduction in the apparent viscosity could be attributed to reducing degree of polymer chain entanglement between EA and CA, as consequence of the globular molecular structure of egg albumen. Increasing ratio of EA in the CA-EA mixed solution (from 1:0.1 to 1:0.5) shifted the blended solution's flow behavior far from Newtonian characteristic that the n was reduced from 0.85 ± 0.00 to 0.77 ± 0.01 . As shown in figure 1, electrical conductivity of the blended solution was significantly affected by the component of EA. An optimum electrical conductivity is an important that affects the electrospun fiber formation. Normally, higher voltage is necessary for EA to attain high electrical conductivity and high surface tension in order to initiate the Taylor cone, thereby originating the nanofiber formation. However, the low apparent viscosity of EA (which normally implies low molecular entanglement) did not support for such high voltage applying and led to the failure of fiber formation that the droplets were deposited on the collecting plate instead (figure 2).

Table 1. Apparent viscosity at a shear rate of 100 s^{-1} , and power law indices K and n of EA-CA blend as a function of CA:EA ratio. The total polymer concentration in mixed solvents of formic acid and acetic acid was 20 wt%.

Mixing ratio (CA:EA)	Apparent viscosity $\eta_{a,100}$ (Pa s)	Power law consistency coefficient (K)	Power law flow-behavior index (n)
1:0	3.1203 ± 0.0295	4.3304 ± 0.0033	0.9289 ± 0.0021
1:0.1	2.7288 ± 0.0559	5.4171 ± 0.2316	0.8512 ± 0.0048
1:0.3	1.3183 ± 0.0141	5.8064 ± 0.1657	0.6781 ± 0.0045
1:0.5	1.1901 ± 0.0901	3.5096 ± 0.2631	0.7651 ± 0.0131
0:1	0.3797 ± 0.0137	6.7880 ± 0.1834	0.3751 ± 0.0140

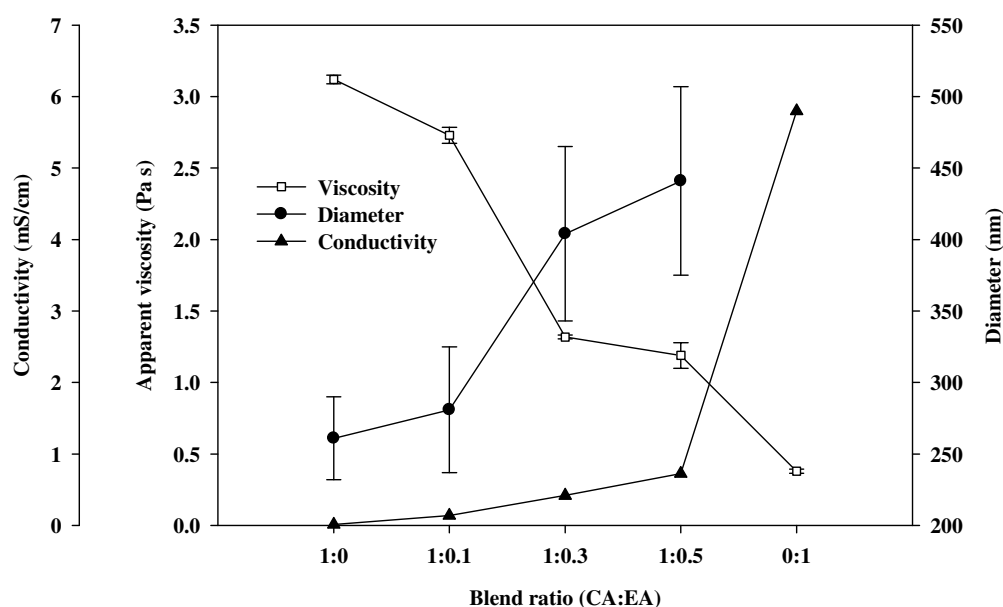
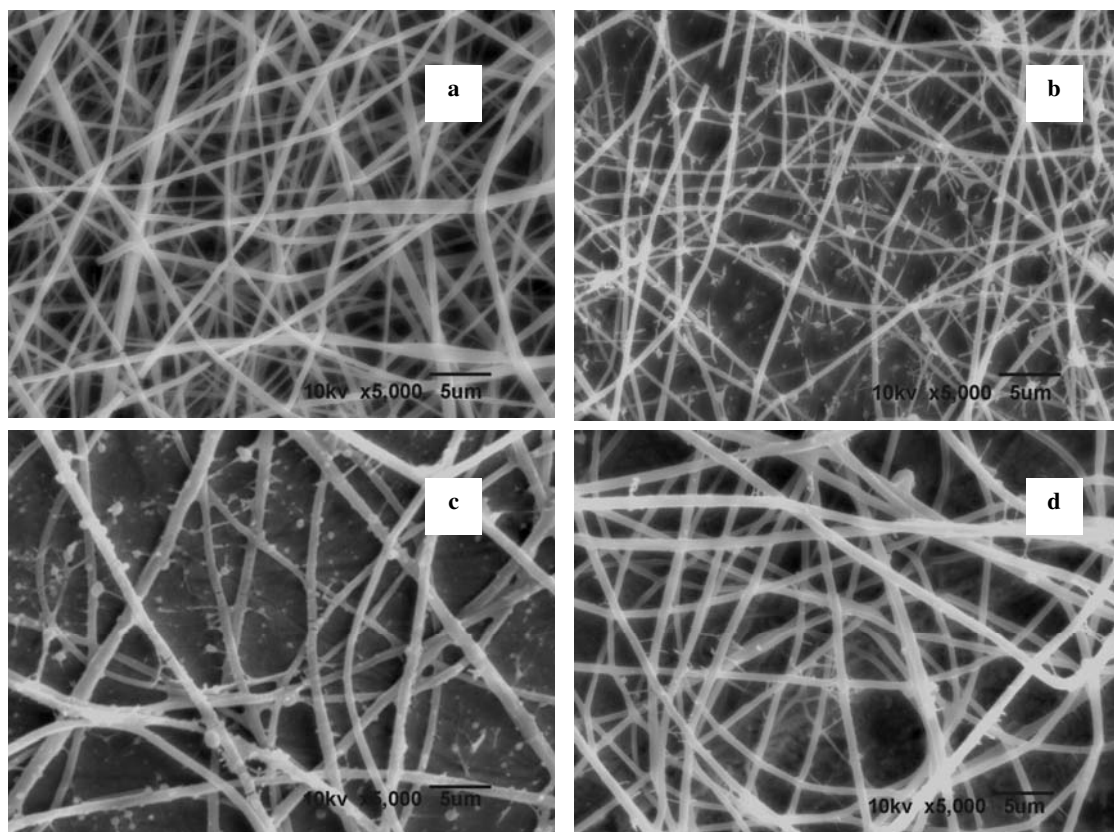


Figure 1. Viscosity and electrical conductivity of EA-CA blend as a function of ratio of CA:EA at a total polymer concentration of 20 wt% in mixed solvents of formic acid and acetic acid. The average diameter of electrospun fibers (if fibers were formed) is plotted as a function of the CA:EA ratio.

3.2 Electrospinning of EA-CA blended nanofibers and morphology of the electrospun fibers

In this study, pure CA and EA-CA blended electrospun fibers were produced at a tip-to-target distance of 15 cm with an applied voltage of 15 kV at a flow rate of 2.2 mL/h (tip's inner diameter ~ 0.69 mm). The blended nanofibers were successfully electrospun from blended solution of EA (12 wt% in 50% formic acid) and CA (20 wt% in 85% acetic acid) with addition of slight amount of surfactant, namely TWEEN 40, which played an important role on morphology of the electrospun fibers improvement (results are not shown here for the sake of brevity).

Figure 2 shows the morphology of the electrospun fibers (or particles) examined by scanning electron microscopy at a magnification of 5000X. Electrospinning of pure EA polymeric solution resulted in submicron particles whilst pure CA polymeric solution exhibited nanofibers having average diameter of 261 ± 29 nm. Enhancing proportion of EA in CA-EA blend from 9 to 23 and 33 percentages or increasing blended ratio of CA:EA from 1:0.1 to 1:0.3 and 1:0.5 resulted in the increasing diameters of the electrospun fibers from 281 ± 44 to 404 ± 61 and 441 ± 61 nm (figure 2b, 2c and 2d), respectively. The SEM micrographs indicated that addition of EA improved fiber's continuity but exhibited cracking surface of the fibers. Surface of the CA fibers seems to be smoother than the EA-CA blended fibers. Nevertheless, the smoothness of the blended fibers was increased as increasing ratio of EA (Figure 2b to 2d). This could be due to the increasing of electrical charge density of EA component. However, additional experiments using atomic force microscopy or field emission scanning electron microscopy is needed to verify the fiber surface smoothness and the continuity. Besides, the composition of the blended fibers will be further investigated.



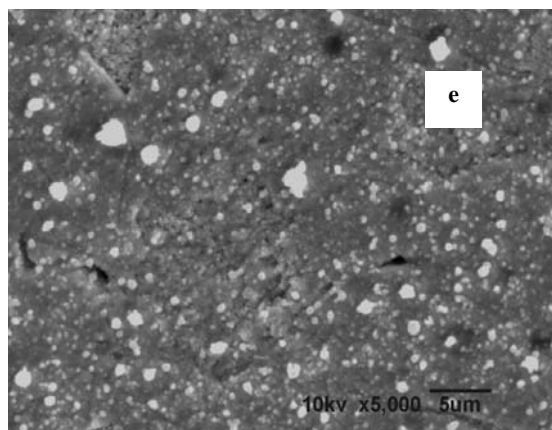


Figure 2 SEM micrographs of the EA-CA blended nanofibers electrospun from mixed solution of EA (12 wt% in 50% formic acid) and CA (20 wt% in 85% acetic acid). The CA:EA blended ratio was varied as (a) 1:0, (b) 1:0.1, (c) 1:0.3, (d) 1:0.5, and (e) 0:1. The bar scale is 5 μ m.

4. CONCLUSIONS

In this study, the edible nanofibrous film was first time fabricated by electrospinning technique. The fibers were electrospun from the blended solution of EA (12 wt% in 50% formic acid) and CA (20 wt% in 85% acetic acid). TWEEN 40 was added to reduce the surface tension and also electrical conductivity of the blended solution. The diameters of the blended fibers were 281 ± 44 , 404 ± 61 and 441 ± 61 nm corresponding to the blending ratio of CA:EA of 1:0.1, 1:0.3 and 1:0.5, respectively. Hairy structure and cracking fiber's surface was obtained in the blended fibers. However, increasing of EA ratio could improve continuity of the CA-EA electrospun fibers. The results indicated that only single component of EA (12 wt% in 50% formic acid) was not entangling enough to form fibrous structure. Mixing of CA enhanced entanglement of the mixed polymer solution leading to the successfulness in the fiber formation. Nonetheless, composition of the blended fibers will be further investigated.

5. ACKNOWLEDGMENTS

This research project was supported by a grant from Thailand Research Fund (TRF; grant number TRG 508008).

6. REFERENCES

1. Huang, ZM.; Zhang, YZ.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. *Compos Sci Technol.* **2003**, 63, 2223-2253.
2. Reneker, DH.; Chun, I. *Nanotechnology.* **1996**, 7, 216-223.
3. Xu, X.; Yang, L.; Xu, X.; Wang, X.; Chen, X.; Liang, Q. et al. *J Controlled Release.* **2005**, 108, 33-42.
4. Son, WK.; Youk, JH.; Lee, TS.; Park WH. *Polymer.* **2004**, 45, 2959-2966.
5. Gupta, P.; Elkins, C.; Long, TE.; Wilkes, GL. *Polymer.* **2005**, 46, 4799-4810.
6. Bognitzki, M.; Czado, W.; Frese, T.; Schaper, A.; Hellwig, M.; Steinhart, M. et al. *Adv Mater.* **2001**, 13, 70-72.
7. Huang, L.; McMillan, RA.; Apkarian, B.; Pourdeyhimi, EL.; Conticello, VP.; Chaikof, EL. *Macromolecules.* **2000**, 33, 2989-2997.
8. Shao, C.; Kim, HY.; Gong, J.; Ding, B.; Lee, DR.; Park, SJ. *Mater Lett.* **2003**, 57, 1579-1584.
9. Wongsasulak, S. Release mechanisms of paprika oleoresin from composite structure of egg

albumen and cassava starch. *Ph.D. Thesis*, University of King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand, **2005**.

10. Zhang, YZ.; Venugopal, J.; Huang, ZM.; Lim, CT.; Ramakrishna, S. *Polymer*. **2006**, 47, 2911-2917.
11. Wongsasulak, S.; Kit, K.M.; McClements, D.J.; Yoovidhya, T.; Weiss, J. *Polymer*. **2007**, 48, 448-457.
12. Lapasin, R.; Pricl, S. Secondary and Tertiary structure of polysaccharides in solutions and gels: rheology of industrial polysaccharides-theory and applications. Melbourne: Blackie Academic and Professional Publishers. **1995**.

Fabrication and Release Characteristics of Cellulose Acetate-Egg Albumen Blend Nanofibrous Film

Chakkrit Krengwithaya, Tipaporn Yoovidhya and Saowakon Wongsasulak*

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering
King Mongkut's University of Technology Thonburi
126 Pracha u-tid Road, Tungkru, Bangkok 10140, Thailand

**Corresponding author's email address: saowakon@pdti.kumtt.ac.th*

ABSTRACT

Due to an excellent potential of nanofibers as a near zeroth-order controlled release vehicle as well as to an interesting functional property of egg albumen (EA) as a good pH sensitive controlled release natural biopolymer, EA nanofibrous film for delivery of a water-soluble bioactive compound in gastrointestinal (GI) tract was fabricated via electrospinning. To enhance its electrospinning capability, EA was blended with cellulose acetate (CA), which is a natural biopolymer having good electrospinnability and possesses gastric protection property. A non-ionic surfactant, namely, Tween 40 was also added to the film forming solution to promote fiber formation. A model bioactive compound, i.e., vitamin B2, was incorporated in the EA phase of the blend; the solid blending ratio of CA:EA:Tween:vitamin B2 was 91:5:3:1. The film was successfully electrospun at 15 kV at an electrospinning distance of 15 cm with electrospun solution flow rate of 2.2 $\mu\text{L/h}$. The release characteristics of the blend fibrous film was then studied in buffer solutions at pH 1.2 and pH 7.4 at $37\pm 0.5^\circ\text{C}$ for 9 h. The morphology of the electrospun fiber before and after release was examined by scanning electron microscopy. The mechanism and constant rate of release were obtained by fitting the cumulative mass released to a simple power law model. Overall, the results indicated that it is possible to use CA-EA blend fibrous film for controlled release in human body where the release rate can be regulated through altering the solubility of the embedded bioactive compound in the target organ. This demonstrates a potential of fabricating polysaccharide-protein blending nanofiber for potential delivery of bioactive compound in human GI tract.

Keywords: Biopolymers; Cellulose acetate; Egg albumen; Electrospinning; Gastrointestinal tract; Release characteristics.

INTRODUCTION

Controlled drug delivery systems have gained much attention in the last few decades due to many advantages compared with the conventional dosage forms. These advantages include improving therapeutic efficacy, reducing toxicity by delivering drug at a controlled rate. To maintain local bioactive compound level within a desirable range, the bioactive compound is constantly released over a long period of time. Besides, other advantages of using controlled-delivery systems also include the decreasing number of dosages as well as site-specific delivery and specific activation of the biologically active compound at specific organs, tissues or cells. One challenge to achieve these goals is to select challenging materials for drug carriers. A wide variety of polymeric materials that can be used as delivery matrices, are either biodegradable or non-biodegradable but biocompatible (Nihant et al., 1995). Another challenge is concerned with the techniques for production of drug carriers. Recently, Zeng et al. (2003) reported the potential in a near zeroth-order release pattern of electrospun nanofibers.

Electrospun fibers are non-woven and long fibers having the diameter varied from nano- up to micrometers. It has a high surface area to volume or mass ratio. Electrospun fibers have potential for being used as a fibrous material in biomaterial applications such as wound healing, tissue engineering and drug delivery. The electrospun fibers can be fabricated from either synthetic or bio polymers. However, the benefits in terms of biodegradability as well as biocompatibility of the bio-polymer promote its popularity and quickly increased attention, comparing with synthetic polymers. The examples of biopolymer having been used for fabrication of electrospun fiber are cellulose acetate (Han et al., 2007), chitosan (Geng et al., 2005), and gelatin (Huang et al., 2004). Recently, cellulose acetate electrospun fiber containing different kinds of active compound was fabricated by Tungprapa et al. (2007), Taepaiboon et al. (2007) and Suwantong et al. (2007). These researches revealed that the amount of bioactive compound released from bioactive compound-loaded fiber mats was greater than that released from the corresponding cast film. This is due to greater surface area and swelling of bioactive compound-loaded fiber mats.

However, edible grade electrospun fibers were never reported before. Indeed, Zeng et al. (2003) reported an interesting near zero-order release pattern of the drug carrier in form of nanofibers, which was fabricated by electrospinning technique. Therefore, this study was conducted to investigate feasibility in electrospinning nanofibers from food biopolymer and using food grade solvent. The two polymers used in this study were cellulose acetate (CA) and egg albumen (EA). As reported by Wongsasulak et al. (2006) that egg albumen showed a high potential controlled release for human digestive system that the release in acidic buffer should be prolong and then be activated in basic buffer. However, they reported later that

pure egg albumen component could not promote fiber formation in the electrospinning process. This was mainly due to the low entanglement with high surface tension of egg albumen. Nevertheless, they reported that mixing with poly(ethyleneoxide); PEO could promote fiber formation. The follow-up research as reported by Patapeejumruswong et al. (2007) indicated that cellulose acetate, biodegradable and oral pharmaceutical product, could be used as the electrospinning aid to replace PEO. However, they reported that a certain amount of surfactant, namely Tween 40, was required to reduce surface tension and electrical conductivity of the egg albumen component leading to a success in fiber formation. The blend food polymers were electrospun at the electrospinning condition of electric field of 15 kV/15 cm, flow rate of 2.2 ml/h. Nevertheless, release property of the edible blend nanofibers was not studied. Therefore, this research was conducted to reproduce the blend nanofibrous film and study its release characteristics.

Materials and methods

Materials

Egg albumen (EA) powder was purchased from Winner Group Enterprise (Igreca, France). Egg albumen is a commercial product consisting of a mixture of different proteins with molecular weights ranging from 14 to 76 kDa. Cellulose acetate (CA; white powder; $M_w \approx 30$ kDa; acetyl content = 39.7 wt%; degree of acetyl substitution ≈ 2.4) was purchased from Sigma-Aldrich (Switzerland). Formic acid (commercial grade; Samsung Fine Chemicals, Korea) and glacial acetic acid (analytical reagent grade; Carlo Erba, Italy) were used as solvents of the polymer. Polyoxyethylene sorbitan monopalmitate (Tween 40; analytical reagent grade; Fluka, Germany) was used as a surfactant.

Solution preparation

Two primary stock solutions of CA in acetic acid and EA containing vitamin B₂ in formic acid were firstly prepared. The CA stock solution was prepared by dissolving CA powder in 85 %w/v acetic acid to final concentration of CA of 20% w/v. The latter stock solution was prepared by blending EA powder with vitamin B₂ (vit.B₂) powder at a ratio of (10:1). The EA-vit.B₂ mixed powder was dissolved in neat formic acid to obtain the final concentration of 13% w/v. Then the mixed EA solution was added with 60% (w/w) of Tween40 to obtain primary EA solution. The two primary solutions (CA and EA) were then mixed together at weight blending ratio of the two stock solution of 10:0.88. The final blending ratio of the polymer was thus 92:5:3:1 corresponding to CA:EA:Tween40:vit.B₂.

Evaluation of solution rheology

The apparent viscosity of the polymer solution was determined using a rotational rheometer (Haake VT500, Germany) with a double coaxial bob and cup. Shear stress (σ , Pa) of the blend solution was recorded as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) at a shear rate ranging from 0

and 400 s^{-1} . The temperature of the loaded sample and along the measurement was controlled at $25 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Reported results are averages of five replicated measurements. Viscosity, flow behavior consistency and flow index were obtained by fitting the obtained shear stress versus shear rate data to the power law model as described by Wongsasulak et al. (2006)

Electrospinning

A 5-mL syringe containing 3 mL of CA-EA blended solution, and equipped with a stainless steel needle (ID = 0.69 mm; Hamilton No. 91019), was mounted on a syringe pump (New Era Pump Systems; NE1000, USA). The needle was connected to a high-voltage generator (Model ES30P-5W; Gamma High Voltage, FL, USA) operated in positive DC mode. A grounded copper plate was used as fibers collector. Preliminary experiments (data not shown) led to the determination of an optimal syringe tip-to-target distance of 15 cm and flow rate of 0.18 mL/h at an applied voltage of 20 kV. All experiments were carried out at room temperature (25°C) at a relative humidity of $50 \pm 5\%$.

Characterization of electrospun fibers morphology

The morphology of the electrospun products (fibers and/or beads) was evaluated by scanning electron microscopy (Model JSM 5800; JEOL, USA). Fibers were spun directly onto a grounded brass SEM stub that was mounted on the collector plate. After deposition of the samples, the stub was removed and sputter coated with gold using a coating condition of 2 kV, 5 mA for 2 mins, with an argon backfill at 8 Pa. The average diameter of the electrospun fibers was determined using an image analysis software (Image J; NIH, Maryland, USA).

Study of release characteristics of the blended film

Four pieces of CA-EA electrospun film carrying vit.B₂ having dimension of $2.5 \times 5\text{ cm}^2$ and thickness of $50 \pm 10\text{ nm}$ were placed in stainless steel release basket and then immersed into buffer solution (pH 1.2 or pH 7.4) at $37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$. The solution was stirred by using propeller at a controlled speed of $100 \pm 3\text{ rpm}$ for 9 h. The solution was periodically sampled out to measure its optical density (OD) by using spectrophotometer at the wavelength of 444 nm.

RESULTS AND DISCUSSION

Electrospinning of CA-EA blend solution carrying vit.B₂

In this study, weight blending ratio of CA:EA:Tween 40:vit.B₂ was 91:5:3:1. Solution properties including flow property, surface tension and electrical conductivity of the two stock primary solutions and the electrospun blend solution were shown in Table 1.

As shown in Table 1, the apparent viscosity of CA solution was much higher than that of EA solution whereas the electrical conductivity was lower than EA solution as much as 385 times. Blending EA for only five percents into CA solution, the apparent viscosity of the blend decreased for 1.3 times whereas electrical conductivity increased for 8 times. The

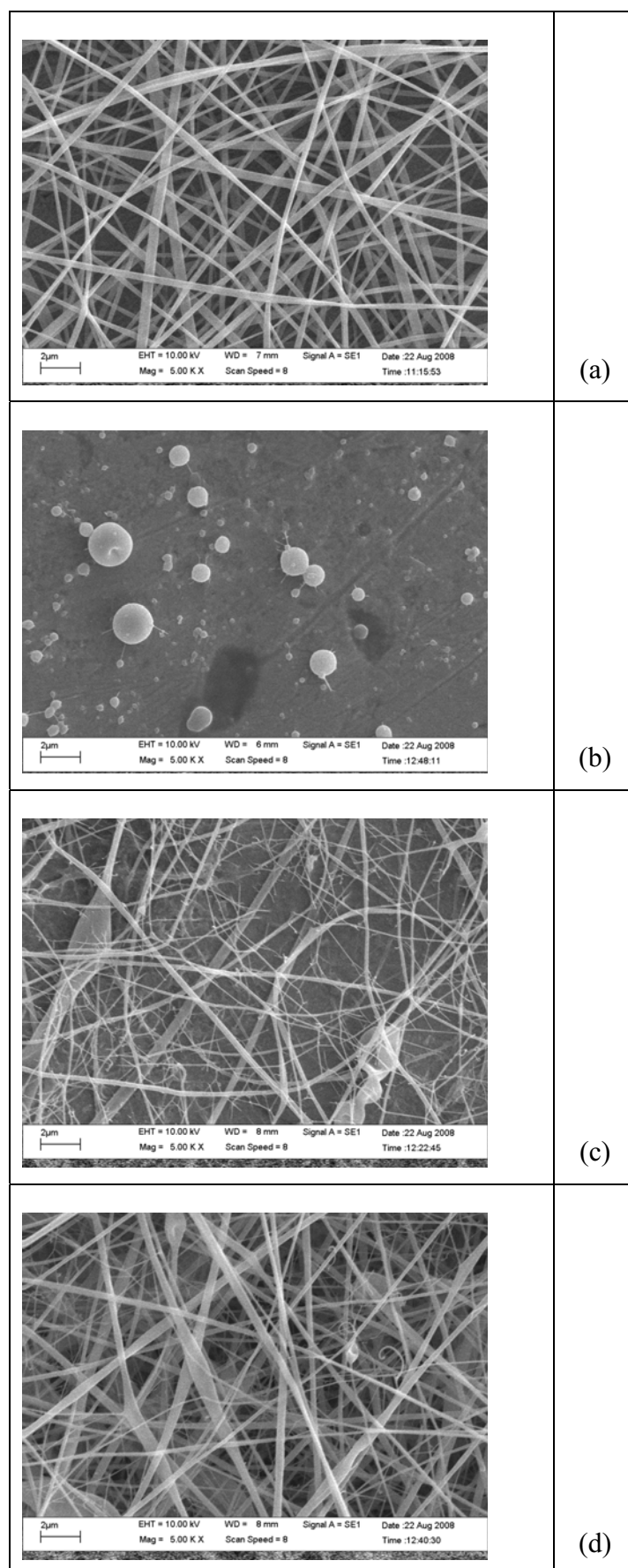
addition of 60 percents of non-ionic surfactant, namely Tween40, in the CA-EA blend, viscosity slightly increased to 7.70 ± 0.02 Pa.s. Addition of Tween40, electrical conductivity of the CA-EA blend was slightly decreased from 160 to 140 $\mu\text{S}/\text{cm}$. The effect of the non-ionic surfactant (Tween40) on the electrical conductivity reduction could be explained that EA back bone molecules was possibly occupied by surfactant molecules leading to a lower electrical conductivity (charge shielding effect), even Tween40 is non-ionic surfactant. This possibly because that non-ionic surfactant usually has a high stability in the dispersing polymer molecules leading to a low driving force of polymer-surfactant molecular interaction (Wang et al., 2007), which thereby exhibiting a low impact on viscosity of the blends containing Tween40. Addition of vit.B₂, apparent viscosity and surface tension were not significantly affected.

Table 1 Solution properties of pure stock primary solutions of CA and EA as well as CA-EA blend solution containing or not containing Tween 40 and vitamin B₂

Polymer solutions	Solution properties		
	Apparent viscosity $\eta_{a,200}$ (Pa.s)	Surface tension (mN/m)	Electrical conductivity (mS/cm)
Pure CA/85%acetic acid (20%w/w)	9.70 ± 0.28	33.98 ± 0.12	0.02 ± 0.00
Pure EA/50% formic acid (12%w/w)	0.08 ± 0.00	31.50 ± 0.16	7.71 ± 0.12
CA:EA = 95:5	7.44 ± 0.04	34.19 ± 0.03	0.16 ± 0.00
CA:EA:Tween40 = 92:5:3	7.70 ± 0.02	33.49 ± 0.17	0.14 ± 0.00
CA:EA:Tween40:vit.B ₂ = 91:5:3:1	7.45 ± 0.62	33.91 ± 0.48	0.16 ± 0.00

Morphology of the electrospun fibers

The average diameter of pure CA electrospun fibers was 208 ± 84 nm (Fig. 1a), whilst EA polymer solution resulted in microparticles diameters of CA-EA blend without Tween40 electrospun fibers were 141 ± 84 nm. Besides, beaded and branching structure, as well as a high diameter variation, was also noticeable. Addition of surfactant, the diameters of electrospun CA-EA blended fiber became larger (187 ± 75 nm) with much less beaded structure of the fiber (Fig 1d). Besides, it also contributed to a higher homogeneity of the fiber diameter that the diameter deviation was reduced from 60 to 40 percents. Moreover, it was also observed that the electrospinning process was also facilitated when the surfactant was added. In case of adding vit.B₂, average diameter of the fibers was of 197 ± 84 nm.



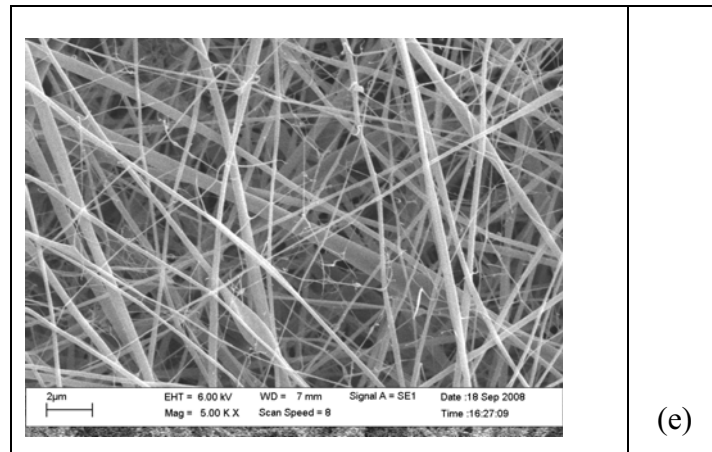


Figure 1 SEM micrographs of electrospun products (fiber, beads) from solution of cellulose acetate and egg albumen (containing, or not containing Tween 40 and vitamin B₂). The percentage blending ratio of CA:EA ranged from (a) 100:0, (b) 0:100, (c) 95:5, (d) CA:EA:Tween40 ratio of 92:5:3 and CA:EA:Tween40:vit.B₂ ratio of 91:5:3:1. The length of the scale bar was 2 μm. All the electrospun particles were electrospun at electrical field strength of 20 kV and electrospinning distance of 15 cm with flow rate of 0.18 mL/h.

Release characteristics of vit.B₂ from CA-EA blend electrospun fibrous film

The release kinetics and release rate of vit.B₂ from the fibrous film was evaluated by a simple power law model showing in equation 1;

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (\text{eq. 1})$$

where M_t is the mass of vit.B₂ released at time t , M_∞ is the mass of vit.B₂ released at an infinite time, n is a diffusional exponent, and k is the kinetic constant rate of release. Generally, the n value of 0.5, $0.5 < n < 1$ and $n < 0.5$ indicate that the diffusion obey Fickian diffusion, non-Fickian diffusion and quasi-Fickian diffusion, respectively.

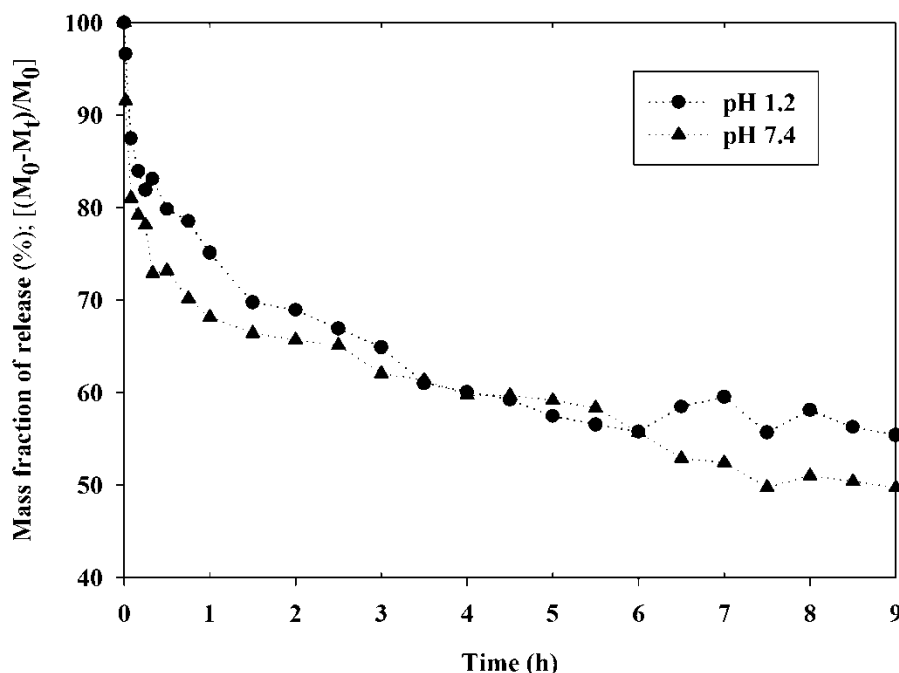


Figure 2 Mass release profiles of vitamin B₂ from CA-EA electrospun fibrous film immersed in pH 1.2 and 7.4 buffer solution and at temperature of 37±0.5 °C for 9 hours

The results of release characteristics for 9 hours of vit.B₂ from the CA-EA blend fibrous film was shown in Figure 2. The data showed that vit.B₂ was rapidly release in the first fifteen minutes then became much slower. The profile of mass release in pH 1.2 tended to be constant after 6 hours. Figure 3 shows the microstructure of the blended fibrous film before (a) and after (b) release. It was observed that the fiber exposed in pH 1.2 was more swollen than that in pH 7.4. This was hypothesized that it could be the case here.

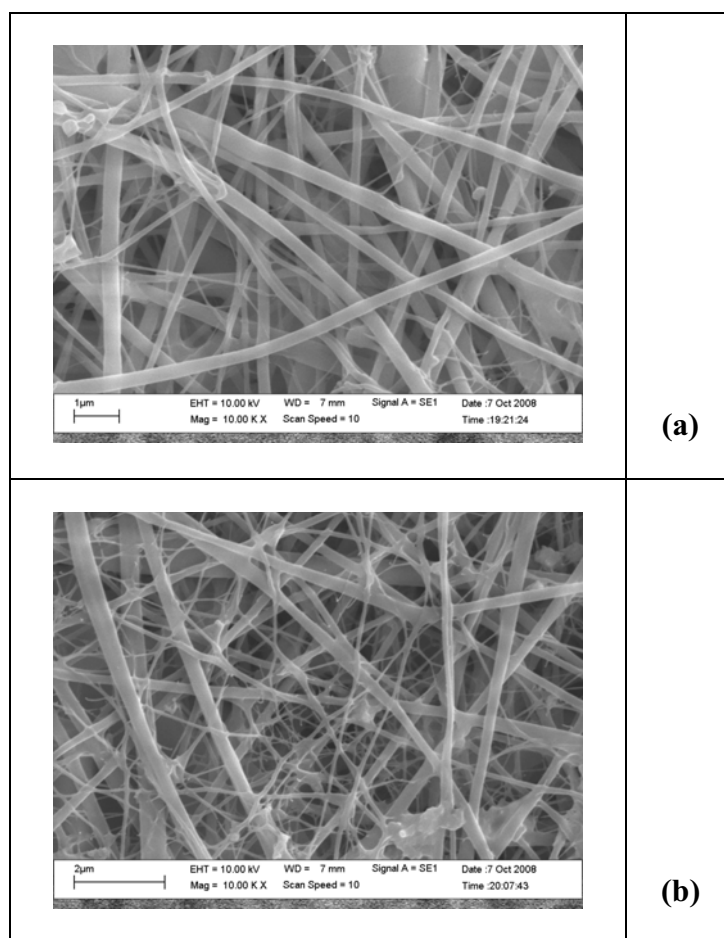


Figure 3 SEM micrograph of the CA-EA electrospun fibrous film containing vitamin B₂ after immersing in the buffer solution (a) pH 1.2 and (b) pH 7.4 for 9 hours

As shown in Table 2, the diffusional exponent (n) in pH 1.2 and 7.4 were 0.28 ± 0.02 and 0.23 ± 0.04 , respectively. The diffusional exponent indicated that release of vit.B₂ from the blend nanofibers obeyed quasi-Fickian diffusion. This means that release rate of vit.B₂ from the CA-EA blend fibrous film was controlled by combining phenomena; diffusion of the diffusant (vit.B₂) through the swollen matrix and solubilization of the diffusant in the environmental medium imbibed in the swollen matrix. The constant rate (k) results revealed that release rate of the fibrous film in pH 7.4 was averagely 1.7 times higher than that in pH 1.2.

Table 2 Release rate constant (k), diffusion exponent (n) of CA-EA blend fibrous film containing vit.B₂ in buffer solution pH 1.2 and 7.4 and at temp of 37±0.5 °C

pH	Kinetic constant ($k \times 10^5$) (s ⁻¹)	Diffusion Exponent (n)	R ²
1.2	0.06±0.02	0.28±0.02	0.99
7.4	0.10±0.04	0.23±0.04	0.99

CONCLUSION

In this study, a feasibility of using CA-EA blend electrospun fibrous film to control release of water-soluble bioactive compound in gastrointestinal tract was studied. The electrospun fibers were produced from the blend solution of 20 wt% CA in 85% acetic acid and 12 wt% EA in neat formic acid. Solid weight blending ratio of CA:EA:Tween40:vit.B₂ was 91:5:3:1. The fibers were successfully electrospun at 20 kV and electrospinning distance of 15 cm with a flow rate of 0.18 mL/h. The average diameter of the electrospun blend fiber was 197±84 nm. Tween 40 was proved to have an important role on the electrospinnability of CA-EA blend solution.

Vitamin B₂ was entrapped in EA phase and acted as release tracer. Release characteristics of the blended film were studied in buffer solutions pH 1.2 and pH 7.4 and at 37±0.5 °C for 9 h. The mechanism and constant rate of release were obtained by fitting the cumulative mass released to simple power law model. The diffusional exponents (n) in pH 1.2 and 7.4 were 0.25±0.07 and 0.24±0.04, respectively. This indicated that a pathway of the release was composed of diffusion through the swollen matrix and a diffusion through buffer solution imbibed in the swollen matrix. Release rate of the film in pH 7.4 was higher than pH 1.2 approximately of 1.7 times. This could be due to a higher solubility of vit.B₂ in alkaline solution (Machlin 1984, Prodanov et al., 2004). However, in pH 1.2, the mass release became constant after 6 h of the timeframe studied. This was possibly due to the microstructure change as confirmed by SEM micrograph. This study demonstrates a potential of fabricating protein-polysaccharide blend nanofibrous film for potential delivery bioactive compound in human GI tract where the release rate of the blended film can be regulated through altering the solubility of the embedded bioactive compound in the target organ.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was financially supported by Thailand Research fund (TRF); grant number of TRG5080008.

REFERENCES

- Bajpai, S.K. and Sonkusley, J., 2003, "Dynamic release of riboflavin from a colon-targeted delivery device: an in vitro study", **Reactive & Functional Polymers**, Vol. 55, pp. 197–210.
- Geng, X., Kwon, O., and Jang, J., 2005, "Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution", **Biomaterials**, Vol. 26, pp. 5427–5432.
- Han, S.O., Youk, J.H., Min, K.D., Kang, Y.O., and Park, W.H., 2008, "Electrospinning of cellulose acetate nanofibers using a mixed solvent of acetic acid/water: Effects of solvent composition on the fiber diameter", **Materials Letters**, Vol. 62, pp. 759-762.
- Huang, Z.M., Zhang, Y.Z., Ramakrishna, S., and Lim, C.T., 2004, "Electrospinning and mechanical characterization of gelatin nanofibers", **Polymer**, Vol. 45, pp. 5361-5368.
- Kagan, L., Lapidot, N., Afargan, M., Kirmayer, D., Moor, E., Mardor, Y., Friedman, M., and Hoffman, A., 2006, "Gastroretentive Accordion Pill: Enhancement of riboflavin bioavailability in humans", **Journal of Controlled Release**, Vol. 113, pp. 208–215.
- Machlin, M., (1984), **Handbook of vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects**, Marcel Dekker, Inc., New York.
- Nihant, N., Grandfils, C., Jerome, R. and Teyssie, P., 1995, "Microencapsulation by coacervation of poly(lactide-co-glycolide) IV. Effect of the processing parameters on coacervation and encapsulation", **Journal of Controlled Release**, Vol. 35, pp. 117–125.
- Patapeejumruswong, M., 2007, "**Electrospinning of Ultrafine Cellulose Acetate-Egg Albumen Blend Fibers**", Master of Engineering Thesis, Food Engineering Program, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, pp. 23-35.
- Prodanov, M., Sierra, I., and Vidal-Valverde, C., 2004, "Influence of soaking and cooking on the thiamin, riboflavin and niacin contents of legumes", **Food Chemistry**, Vol.84, pp. 271–277.
- Suwantong, O., Opanasopit, P., Ruktanonchai, U., and Supaphol, P., 2007, "Electrospun cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the herbal substance", **Polymer**, Vol. 48, pp. 7546-7557.

- Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., and Supaphol, P., 2007, "Vitamin-loaded electrospun cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of vitamin A acid and vitamin E", **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Vol. 67, pp. 387–397.
- Tungprapa, S., Puangparn, T., Weerasombut, M., Jangchud, I., Fakum, P., Semongkol, S., Meechaisue, C., and Supapol, P., 2007, "Electrospun cellulose acetate fibers: effects of solvent system on morphology system on morphology diameter", **Cellulose**, Vol. 14, pp. 563-575.
- Wang, W., Wang, Y.J., and Wang, D.Q., 2008, "Dual effects of Tween 80 on protein stability", **International Journal of Pharmaceutics**, Vol. 347, pp. 31–38.
- Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., Bhumiratana, S., Hongsprabhas, P., McClements, D.J. and Weiss, J., 2006, "Thermo-mechanical properties of egg albumen–cassava starch composite films containing sunflower-oil droplets as influenced by moisture content", **Food Research International**, Vol. 39, pp. 277-284.
- Wongsasulak S, Yoovidhya T, Kit KM, McClements DJ and Weiss J. 2006. "The effect of solution properties on the morphology of ultrafine electrospun egg albumen-PEO composite fibers", **Polymer**. 48(2): 448-457.
- Zeng, J., Xu, X., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., and Jing, X., 2003, "Biodegradable electrospun fibers for drug delivery", **Journal of Controlled Release**, Vol. 92, pp. 227–231.

Dear Saowakon Wongsasulak

On behalf of the organizing committee of the 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology to be held between 24-25 September, 2009 at Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand, it is my pleasure to inform you that your abstract entitled **FABRICATION OF FOOD GRADE NANOFIBERS FOR FUTURE APPLICATION OF NEUTRACEUTICAL DELIVERY IN HUMAN** is accepted for

☒ Oral presentation

☐ Poster presentation

In the session: **Nanobiotech Bioengineering**

Please find reviewers' comment(s) on file attached separately and also make sure that the presenter's name is underlined and email(s) of corresponding author(s) is provided.

In case some revisions are required, please submit a revised version of your abstract on-line at <http://www.biotec.or.th/tsbconference> to the secretariat office by August 12, 2009. Abstract submitted after the deadline will not be published in the abstract book.

Guidelines for preparation of both oral and poster presentation are available on <http://www.biotec.or.th/tsbconference/home/callforpaper.asp>. To those accepted for oral presentation, schedule will be sent to you on a separate email.

We would like to remind you that the deadline for early-bird registration and full paper submission will be on 14 August, 2009 (on-line payment at <http://www.biotec.or.th/tsbconference>).

We are looking forward to seeing you at the conference.

Sincerely yours,
Sansanalak Rachdawong, Ph.D.
Chairman of the organizing committee of TSB2009

Conference Secretariat
Tel: (66-2) 470 7400-1, 470 7450-2, 470 7557
Fax: (66-2) 452 3466
E-mail: annualmeeting2009@gmail.com



TSB 2009
The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology
BIOTECHNOLOGY:
A Solution to the Global Economic Crisis?
24-25 SEPTEMBER 2009
QUEEN SIRIKIT NATIONAL CONVENTION CENTER, BANGKOK, THAILAND

Evaluation Form

**The 21st Annual Meeting and International Conference of Thai Society for
Biotechnology Conference (TSB 2009)**

Article code... O-NB01 ...

Article Title FABRICATION OF FOOD GRADE NANOFIBERS FOR FUTURE
APPLICATION OF NEUTRACEUTICAL DELIVERY IN HUMAN

Reviewer's Opinion

- ☒ **Accept**
- ☐ **Accept** with corrections
- ☐ **Reject**

Scientific Committee of TSB 2009

FABRICATION OF FOOD GRADE NANOFIBERS FOR FUTURE APPLICATION OF NEUTRACEUTICAL DELIVERY IN HUMAN

Saowakon Wongsasulak and Tipaporn Yoovidhya

Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi. 126 Pacha-U-Tit rd. Bangmod, Tungkru, Bangkok 10140, THAILAND

This report highlights an attempt to apply nanotechnology to improve an efficiency of neutraceutical/drug delivery in human GI-tract. Two forms of food grade nanofibers carrying model protein were fabricated; hollow nanofibers containing core model protein and nanofiber containing dispersed model protein. The former was produced using coaxial electrospinning technique whereas the latter was fabricated using the conventional one. The main component of the fibers was cellulose acetate. The model proteins of the hollow and typical fibers were gelatin and egg albumen, respectively. Properties of the electrospinning polymer solution; viscosity, surface tension, surface energy and electrical conductivity were improved by properly adding surfactant, viz. Tween[®]40. The morphology of the electrospun fibers was examined by scanning electron microscope (SEM) whilst their compositions were characterized by Fourier transforms infrared (FTIR) spectroscopy and thermal gravimetric analysis (TGA). The release properties of the typical electrospun fibers as well as the hollow fibers were also explored. It was found that with properly modifying polymer solution properties, the fine structure of the protein-polysaccharide blend fiber could be produced using the traditional electrospinning technique. Meanwhile the electrospinning setup developed in this work was proved to have a good potential for fabrication of core-shell coaxial electrospun fibers. Besides, the preliminary results of release properties for both as-spun fibers showed the trend of slow release characteristics with no bursting effect within 2 days immersion in pH 2 buffer solution. These fibers may provide a great interesting result for neutraceutical/drug delivery in human GI-tract application.

มจร.พัฒนา‘ฟิล์มนาโน’จากเส้นใยข้าว

ควบคุมการปล่อยยาตรงเป้าหมายด้วยเส้นใยจากไผ่ข้าว

นักวิจัย มจร. พัฒนาแผ่นฟิล์มเส้นใยนาโนจากไผ่ข้าว ใช้ควบคุมเวลาในการปลดปล่อยสารสู่ร่างกายสำหรับระบบนำส่งยาแบบใหม่หวังนำร่องต่อยอดสร้างระบบนำส่งยาโรคกระเพาะอาหารร่วมกับแพทย์หรือนักเภสัชศาสตร์ในปี 52

ดร.เสาวคนธ์ วงศ์สุลักษณ์ นักวิจัยในภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (มจธ.) นำประสบการณ์จากการวิจัยแผ่นฟิล์มบางที่มีส่วนผสมของไผ่ข้าวและแป้งมันสำปะหลังและงานวิจัยปั้นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต เมื่อครั้งศึกษาอยู่ที่มหาวิทยาลัยแห่งแมสซาชูเซตส์ มาพัฒนาแผ่นฟิล์มจากไผ่ข้าว บางระดับ: มาโนเมต

เพื่อควบคุมการปลดปล่อยสารเข้าสู่ร่างกาย

ชาวจะสามารถปลดปล่อยสารอย่างช้าๆ แต่หากเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะที่เป็นต่าง ไผ่ข้าวจะปลดปล่อยสารอย่างรวดเร็ว กลไกดังกล่าวช่วยให้ตัวยาสำคัญไม่ถูกดูดซึมไปก่อนที่จะถึงเส้นทางไปยังเป้าหมาย โดยเฉพะอย่างยิ่ง ในกระเพาะอาหารที่มีสภาพเป็นกรด แต่ฟิล์มจากไผ่ข้าวที่ห่อหุ้มสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจะยอมให้เกิดการดูดซึมที่ช้าลงได้

นักวิจัยเริ่มทดลองนำไผ่ข้าวสดมาทำการปั่นเส้นใยด้วยไฟฟ้าสถิต แต่พบปัญหาความแห้งชื้นของไผ่ข้าวที่ไม่เท่ากันในแต่ละห้อง จึงเปลี่ยนไปใช้ข้าวผงผสมสารดูดน้ำที่มีประสิทธิภาพ แต่กลับพบว่าลักษณะโครงสร้างของโปรตีนไผ่ข้าวที่จับตัวเป็นกลุ่มก้อนทำให้มันเป็นเส้นใยได้ยาก จึงเป็นต้องใช้สื่อกลาง และพบว่า เซลลูโลสอซิเดส ที่ใช้

ทำแคปซูลยามีคุณสมบัติเหมาะสม

“การค้นพบสูตรและสภาวะที่เหมาะสมในการปั่นเส้นใยนาโนใช้ข้าวด้วยไฟฟ้าสถิตทางไปสู่การพัฒนาแบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมเวลาปลดปล่อยตัวยาได้โดยเฉพะอย่างยิ่งในโรคกระเพาะอาหาร” นักวิจัย มจร. กล่าว

โรคกระเพาะอาหารเป็นภาวะที่น้ำย่อยหรือกรดในกระเพาะอาหารอยู่ในสภาพที่ส่วร้างเนื่องจากการเจริญเติบโตของแบคทีเรียการรักษาแบบมาตรฐานคือ ให้อาหารย่อยง่ายขึ้นและอย่างใดก็ตามมักแตกตัวออกบริเวณแผ่นกระเพาะอาหารได้น้อยเพราะไคโตนน้ำย่อย หรือกรดย่อยสลายไปก่อน

ดร.เสาวคนธ์มองว่า หากนำแผ่นฟิล์มนาโนไผ่ข้าวที่มีตัวยาอยู่ ไปใส่ไว้ในแคปซูลเจลาตินแล้วให้กระเพาะอาหารย่อยโปรตีนในเจลาตินออกไปก่อน รอจนกว่าแผ่นฟิล์มจับติดกับ

ผนังกระเพาะอาหาร และถึงปล่อยตัวยาสู่ผนังกระเพาะอาหารโดยตรงจะทำให้ยามีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

นักวิจัยกล่าวว่า โครงการดังกล่าวจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมในแง่ศักยภาพของฟิล์มนาโนในการเกาะติดผนังกระเพาะอาหาร โดยคาดว่าจะเริ่มในปี 2552 และต้องอาศัยความร่วมมือจากนักวิจัยหรือผู้เชี่ยวชาญในทางแพทยศาสตร์และเภสัชศาสตร์

“นักศึกษาในโครงการอยู่ระหว่างทดสอบได้วัดกันเป็น 2 ลงไปในแผ่นฟิล์ม จำลองการใส่ยาหรือสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วนำไปทดสอบการปลดปล่อยยาในสภาวะกรด-ด่าง ซึ่งจะเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยต่อยอดต่อไป” ดร.เสาวคนธ์ กล่าวนำเสนอมผลงานในการประชุม นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโสครั้งที่ 8 จัดโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

Manuscript Number: JFOODENG-D-09-00443

Title: Electrospinning of food-grade nanofibers based on blends of cellulose acetate and egg albumen

Article Type: Research Article

Keywords: Biomaterial; Cellulose acetate; Electrospinning; Egg albumen; Nanofibers

Corresponding Author: Dr. SAOWAKON WONGSASULAK, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: King Mongkut's University of Technology Thonburi

First Author: SAOWAKON WONGSASULAK, Ph.D.

Order of Authors: SAOWAKON WONGSASULAK, Ph.D.; Manashuen Patapeejumruswong, Master; Jochen Weiss, Ph.D.; Pitt Supaphol, Ph.D.; Tipaporn Yoovidhya, Ph.D.

Abstract: Edible nanofibrous membranes were fabricated, for the first time, from blend solutions of cellulose acetate (CA) in 85% acetic acid and egg albumen (EA) in 50% formic acid by an electrospinning technique. The percentage ratios of CA to EA dissolved in the mixed solvents varied from 100:0 to 91:9, 77:23, 66:34 and 0:100. Effects of the blend ratios on the solution properties and the morphology of the electrospun particles examined by SEM were studied. The results evidently suggested that EA lacked sufficient entanglement and also possessed very high surface tension, thereby being unable to form nanofibers. The addition of CA and surfactant (Tween40®) resulted in lower electrical conductivity and surface tension of the blends, which can lead to the formation of CA-EA blend nanofibers. The micrographs obtained indicated that the continuity of the blend fibers was improved by increasing the EA ratio. Results from FTIR and TGA indicated that the blend fibers were composed of both CA and EA. This study demonstrated a potential to fabricate edible nanofibers from natural food biopolymers using the electrospinning

technique. These nanofibers may provide new functionalities with respect to vivo-controlled release.



Department of Food Engineering
King Mongkut's University of Technology Thonburi
126 Pracha U-tid Road, Bangkok 10140, Thailand
Tel: + 662 470 9245; Fax: + 662 470 9240

April 24, 2009

Editor
Journal of Food Engineering

Dear Editor:

Attached you will please find our manuscript entitled "Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate-egg albumen blends" which we would like to submit for possible publication in Journal of Food Engineering. For your information a list of three possible reviewers of the manuscript is also attached herewith.

I look forward to hearing from you in the near future regarding the status of the manuscript.

Sincerely yours,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "S. W.", with a stylized flourish at the end.

Saowakon Wongsasulak
E-mail: saowakon@pdti.kmutt.ac.th

Electrospinning of food-grade nanofibers from cellulose acetate and egg albumen blends

Saowakon Wongsasulak^{1*}, Manashuen Patapeejumruswong¹,
Jochen Weiss², Pitt Supaphol³ and Tipaporn Yoovidhya¹

¹Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, King Mongkut's University of Technology Thonburi, Bangkok, 10140, THAILAND.

² Department of Food Science and Biotechnology, University of Hohenheim
Garbenstraße 21, 70599 Stuttgart, GERMANY.

³ The Petroleum and Petrochemical College and The Center for Petroleum, Petrochemical and Advanced Materials, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, THAILAND

Submitted to Journal of Food Engineering, April 2009

Keywords: Biomaterial; Cellulose acetate; Electrospinning; Egg albumen; Nanofibers

*Corresponding author: E-mail: saowakon@pdtd.kmutt.ac.th, Phone: +66-2-470-9341; Fax: +66-2-470-9240

ABSTRACT

Edible nanofibrous membranes were fabricated, for the first time, from blend solutions of cellulose acetate (CA) in 85% acetic acid and egg albumen (EA) in 50% formic acid by an electrospinning technique. The percentage ratios of CA to EA dissolved in the mixed solvents varied from 100:0 to 91:9, 77:23, 66:34 and 0:100. Effects of the blend ratios on the solution properties and the morphology of the electrospun particles examined by SEM were studied. The results evidently suggested that EA lacked sufficient entanglement and also possessed very high surface tension, thereby being unable to form nanofibers. The addition of CA and surfactant (Tween40®) resulted in lower electrical conductivity and surface tension of the blends, which can lead to the formation of CA-EA blend nanofibers. The micrographs obtained indicated that the continuity of the blend fibers was improved by increasing the EA ratio. Results from FTIR and TGA indicated that the blend fibers were composed of both CA and EA. This study demonstrated a potential to fabricate edible nanofibers from natural food biopolymers using the electrospinning technique. These nanofibers may provide new functionalities with respect to vivo-controlled release.

1. INTRODUCTION

Over the past two decades, the use of novel biodegradable polymers as drug delivery vehicles in the human body has drawn increased attention (Karp and Langer, 2007, Ranganath and Wang, 2008). This is attributed to the expectancy of non- or minimum harm to the treated human biological system, as well as a non subsequent-removal after surgery. For biodegradable foreign material that are being incorporated into the body, the potential risks can ordinarily be minimized by a biological excretion mechanism of macrophages (phagocytosis), which engulf and digest a foreign substance, thereby allowing excretion. The other important properties of the polymers or materials used for drug carriers are that they improve delivery efficiency such as responsibility to physiologically regulated or to external stimuli, improve patient compliance, are non-toxic, and are also cost effective (Gunasekaran et al., 2007, Karp and Langer, 2007, Uchegbu and Schätzlein, 2006). The problems of conventional drug delivery are low drug-loading efficiency and the initial burst release of the drug. Recently, release kinetics of many encapsulated drugs and active compounds have been improved to have a close to zero order kinetics and a low overall degradation of the encapsulating materials. Zeng et al. (2003) reported that drugs could be encapsulated directly into electrospun fibers, whose fibrous structure had a close to zero-order kinetics of drug release when compared with a nanospherical structure (Zeng et al., 2003). The other advantages of electrospun fiber films over conventional solution-cast films is the highly porous nature of the fibrous membranes; these exhibit a much greater surface area, thus allowing active molecules to diffuse out from the matrix much more freely (Agarwal et al., 2008, Kenawy et al., 2002, 2009, Zong et al., 2002). Electrospun biodegradable nanofibers used as drug carriers (Agarwal et al., 2008, Kenawy et al., 2002, 2009, Chew et al., 2005, Taepaiboon et al., 2007) and for postoperative local chemotherapy (Ranganath and Wang, 2008, Xu et al., 2005) have thus become a promising new development.

Electrospinning is a technique used to form long, non-woven, ultrafine fibers. The diameters of the electrospun fibers vary from sub-micrometers down to nanometers, depending on the polymer solution and processing condition (Deitzel et al., 2001, Sill and von Recum, 2008). In the fiber-formation process, a polymer solution is charged and ejected through a syringe needle. A distorted drop of the polymeric solution, known as a *Taylor cone*, is formed at the tip of the needle as a consequence of the applied electrical forces. When electrical voltage is applied to the air-droplet interface, polymers are

1 electrostatically charged and a polymer jet is then ejected from the apex of the cone
2 (Deitzel et al., 2001, Sill and von Recum, 2008, Yarin et al., 2001, Reneker and Chun,
3 1996). Solvent evaporates from the jet while traveling to the grounded target, where fibers
4 are collected.

5 Egg albumen (EA) is an excellent natural source of protein. In this research, EA
6 was chosen as the electrospun polymer because it has a low cost compared to other
7 proteins, and it is readily available in Thailand as a by-product of Thai dessert
8 manufacturing. Moreover, EA exhibits several interesting functionalities that make it of
9 interest to various industries. It has the ability to stabilize emulsions; a high potential to
10 be used for controlled release (due to its pH and temperature-sensitive properties); and its
11 release pattern can be easily manipulated through regulation of the structural forming
12 condition (Wongsasulak et al., 2007a). It has been previously demonstrated by our group
13 that egg albumen-based ultrafine fibers are superior drug carriers. They can withstand the
14 stomach's severe acidic condition and release the bioactive material at the alkaline pH of
15 the intestine, thereby yielding maximum absorption (Wongsasulak et al., 2007b).
16 However, EA's globular molecular structure causes low polymeric solution entanglement,
17 leading to failure in nanofiber formation. This research was therefore aimed at improving
18 the fabrication of edible EA-based nanofibers by blending them with cellulose acetate
19 (CA), an edible polymer proven to have electrospinnability (Taepaiboon et al., 2007, Ma
20 et al., 2005, Son et al., 2006, Tungprapa et al., 2007, Suwantong, et al., 2007, Han et al.,
21 2008). Additionally, CA has properties similar to poly(ethylene oxide) (i.e., a linear chain
22 molecular structure; being hydrogen bondable; and having charge and high entanglement)
23 which was used as an electrospinning aid in our previous study (Wongsasulak et al.,
24 2007b).

25 **2. MATERIALS AND METHODS**

26 **2.1. Materials**

27 Egg albumen (EA) powder (Igreca, France) was purchased from Winner Group
28 Enterprise. Egg albumen is a commercial product consisting of a mixture of different
29 proteins with molecular weights ranging from 14 to 76 kDa (Li-Chan et al., 1995).
30 Cellulose acetate (CA; white powder; $M_w \approx 30$ kDa; acetyl content = 39.7 wt%; degree of
31 acetyl substitution ≈ 2.4) was purchased from Sigma-Aldrich (Switzerland). Formic acid

(commercial grade; Samsung Fine Chemicals, Korea) and glacial acetic acid (analytical reagent grade; Carlo Erba, Italy) were used as solvents of the polymer. Tween40[®] (analytical reagent grade; Fluka, Germany) was used as a surfactant.

2.2. Preparation of polymer solutions for electrospinning

A CA-EA blend solution was prepared by blending two primary solutions: 20% (w/w) of CA dissolved in 85% acetic acid, and 12% (w/w) of EA dissolved in 50% formic acid. Formic acid (50% w/v) and acetic acid (85% w/v) were respectively chosen as the solvent for egg albumen and cellulose acetate with due to their ability to dissolve the respected polymer. Furthermore, formic acid was previously found to be a good solvent to initiate electrospinning of protenaceous polymers (Martin et al., 1997, Bucho et al., 1999, Ki et al., 2005, Park et al., 2004, Leeden et al., 2000, Um et al., 2001, George and Sander, 2004). A flowchart of the preparation of primary solutions and electrospun blend solutions are shown in Table 1. Briefly, CA stock solution with a concentration of 20 %(w/w) in 85% acetic acid and EA stock solution with a concentration of 12 %(w/w) in 50% formic acid were prepared. Each stock solution was gently stirred to ensure a full dissolution prior to blending together. The polymer concentration of CA to EA in the blend solution was varied as follows; 91:9, 77:23 and 66:34. The resulting blends were further stirred to obtain a homogeneous mixed solution. For CA-EA blends, Tween40[®] was added at various concentrations. The amount of Tween40[®] added was 10, 18 and 23 %(w/w) corresponding to the CA:EA blend ratio of 91:9, 77:23 and 66:34, respectively. The blend solutions referred to as blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34, were then electrospun. All solutions were prepared at an atmospheric condition of 25 °C and relative humidity of 50±5%

2.3. Electrospinning

A 30-mL syringe (TOP, JAPAN) containing 10 mL of the blend solution, and equipped with a stainless steel needle with an inner diameter of 0.69 mm (Hamilton No. 91019), was mounted on a syringe pump (New Era Pump Systems; NE1000, USA). The needle was connected to a high-voltage generator (Model ES30P-5W; Gamma High Voltage, FL, USA) operating in the positive DC mode at 15 kV. A tip-to target distance of 15 cm was used. A grounded and cleaned copper plate was used for the collection of electrospun particles (fibers or beads). The electrospinning flow rate was controlled and

kept constant at 2.2 mL/h by the syringe pump. All of the electrospun products were formed under identical atmospheric conditions (RH = 50±5 %, Temp = 25±0.5 °C).

2.4. Rheology

The apparent viscosity of the polymer solution was determined by using a rotational rheometer (Haake VT500, Germany) with a double coaxial stainless steel bob and cup (length = 61.4 mm, diameter = 10.1 mm, gap width = 1.45 mm). Shear stress (σ , Pa) of the blend solution was recorded as a function of shear rate ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) ranging between 0 and 400 s⁻¹. The temperature of the loaded sample was set at 25±0.5 °C. The reported results were averaged from triplicate measurements. The recorded data of shear stress versus shear rate were fitted to the power law model (Eq. 1) Flow behavior consistency K and flow index n were then calculated, as described by Lapasin and Pricl (1995)

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (1)$$

where σ is the shear stress, $\dot{\gamma}$ is the shear rate. The flow-behavior index n reflects the viscosity of the solution: i.e., $n = 1$ if the solution behaves Newtonian, and $n \neq 1$ if the solution behaves non-Newtonian (e.g., shear thinning or shear thickening).

2.5. Tensiometry

Surface tension of the polymer solution was determined by the Du Noüy ring method, using a digital tensiometer (Model DCT11; Dataphysics, Germany). Ring diameter was 18.7 mm. Twenty milliliters of each sample was poured into a clean measured glass having a diameter of 6.7 cm. The De Noüy ring was first submerged into the solution below the solution meniscus and then vertically pulled out of the solution. The surface tension (mN/m) was recorded at the maximum pulling force prior to the ring breaking through the solution meniscus. Measurement temperature was kept at 25±0.5 °C.

2.6. Electrical conductivity

Electrical conductivity of the polymer solution was determined by a digital conductivity meter (Model CG855; Schott, Germany). Calibration was done using NaCl standard solution (1000 µS/cm). Results are averaged from three sets of measured data and two replications of sample preparation.

2.7. Scanning electron microscopy

The morphology of the electrospun products (fibers and/or beads) was evaluated by scanning electron microscopy (SEM) (Model JSM 5800; JEOL, USA). Fibers were spun directly onto a grounded SEM brass stub that was mounted on the collector plate. After deposition of the samples, the stub was removed and sputter coated with gold using a coating condition of 2 kV, 5 mA for 2 min, with an argon backfill at 8 Pa. The average diameters of the electrospun fibers were determined by the image analysis software (Image J; NIMH, Maryland, USA).

2.8. Fourier transforms infrared spectroscopy

To determine composition and chemical characteristics of the electrospun fibers, infrared spectra of the fibers were recorded using a Fourier transform infrared spectrophotometer (Model Spectrum GX; Perkin-Elmer, USA) operated at a wave number ranging between 4000 and 400 cm^{-1} and with a resolution of 4 cm^{-1} . Each measurement was carried out from an average of 16 scans.

2.9. Thermal gravimetric analysis

Thermal gravimetric analysis (dm/dT) was performed in a PerkinElmer Pyris I TGA HT instrument, using 7-8 mg of material as a sample. The samples were heated on platinum pans at a heating rate of 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, and under a nitrogen atmosphere controlled flow rate of 20 mL/min. TGA and differential thermal gravimetric (DTG) curves were recorded from 50 to 700 $^{\circ}\text{C}$. Data shown represent an average of three scans.

2.10 Statistical analysis

All the measured data were ranked and evaluated for their statistical differences using one-way analysis of variance (ANOVA) and turkey's multiples range test. A value of $p < 0.05$ was significantly different. The data were expressed as mean \pm SD.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Optimization of primary stock solution concentration of EA and CA

In a set of preliminary studies, CA solutions at a polymer concentrations of 8, 15 and 17% (w/w) in 85% acetic acid were prepared and tested for their ability to produce

electrospun nanofibers (data not shown). Scanning electron microscopy micrographs indicated that the minimum concentration of CA for fiber formation was 17% (w/v) in 85% acetic acid. This was in good agreement with Han et al. (2008) (Han et al., 2008), where pure CA electrospun fibers were successfully produced from 17% (w/v) of CA in 85% acetic acid. However, electrospinning of the CA solution blended with the primary solution of EA (having a concentration of 5% (w/w) in 85% formic acid) failed to obtain fibers for all the studied ratios of CA:EA (i.e., 91:9, 77:23 and 66:34). The flow properties of the blend suggested that their entanglements, measured in terms of the solution's zero-shear viscosity, were too low (data not shown here), causing a failure in fiber formation.

The failure could also be explained in terms of the critical chain overlap concentration (c^*) of the polymer solution; the crossover between the dilute and the semi-dilute concentration regimes was used to determine the degree of polymer entanglement that is an important key of fiber formation (Gupta et al., 2005). Our recent work (Wongsasulak et al., 2007b) reported that the concentration exponent for EA solution in formic acid was approximately 1.32 ($\eta \sim c^{1.32}$). The exponent value of 1.32 indicates the semi-dilute unentangled solutions of polymers with respect to the determined values of Gupta et al.(2005). Accordingly, the concentration of EA in the primary solution was increased from 5% to 12% (w/w) whilst that of CA primary solution was increased from 17% to 20% (w/w). Nevertheless, because of the higher EA concentration, the formic acid concentration had to be reduced from 85% to 50%, in order to avoid gelation of the EA solution. Preliminary results indicated production of fibrous structures of the CA-EA blend at these elevated concentrations; 12 %(w/w) of EA in 50% formic acid and 20 %(w/w) of CA in 85% acetic acid. The concentrations of 12 %(w/w) of EA in 50% formic acid and 20 %(w/w) of CA in 85% acetic acid were thus used for the preparation of the primary stock solutions throughout the remainder of this study.

3.2 Solution properties of CA-EA blend solutions

Viscosity, surface tension and electrical conductivity of the blend solutions were measured, and are shown in Table 1. The apparent viscosity of the pure CA solution at a shear rate of 100 s^{-1} ($\eta_{a,100}$) was $3.10 \pm 0.07 \text{ Pa}\cdot\text{s}$, while that of the EA was $0.37 \pm 0.04 \text{ Pa}\cdot\text{s}$. As the ratio of EA increased, the viscosity of the blends decreased; however, surface tension and electrical conductivity increased. Electrical conductivity of the primary EA

solution was very high (5.75 mS/cm) compared with the primary solution of CA (0.02 mS/cm). The electrical conductivity of the blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34, increased from 0.17 to 0.69 and 1.05 mS/cm, respectively. This was due to the increase of EA in the blend from 9 to 34 percents. With respect to the fiber-forming ability of the blends, SEM micrographs revealed that only the pure solution of CA yielded beaded fibers or fibers with some bead defects but EA and blend solutions failed to form fibers (data not shown here). This could be attributed to the fact that EA in 50% formic acid possesses a very high surface tension with high electrical conductivity (Table 1). The high surface tension might counteract electrostatic forces and prevented the successful ejection of a steady polymer jet from the tip of syringe.

3.3 Solution properties of CA-EA blend solutions in the presence of Tween40®

A food-grade non-ionic surfactant (Tween40®) was added to the blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34 for 10, 18 and 23 %(w/w), respectively. Addition of surfactant to polymer solution has previously been reported to aid in the electrospinning process (Kriegel et al., 2009, Peng et al., 2008). The effect of Tween40® on the electrical conductivity, surface tension and viscosity of the blend solutions was shown in Table 2. The apparent viscosities of the CA-EA blends containing Tween40®, at a shear rate of 100 s^{-1} ($\eta_{a,100}$), decreased slightly to 2.73 ± 0.06 , 1.32 ± 0.01 and $1.19\pm0.09\text{ Pa}\cdot\text{s}$, which corresponds to the blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34, respectively. Adding Tween40® considerably lowered the surface tension and electrical conductivity of the blends, whilst their viscosities were not notably affected. As previously indicated, the reduction in surface tension of the polymer blend is a key factor in EA-CA blend fiber formation (Fig. 1). To form fibers, the supplied voltage should be sufficient to overcome the surface tension at the tip of the Taylor cone to initiate the electrospinning jet. The entanglement of the polymer solution should thus be high enough to resist the coulombic repulsive forces (Reneker et al., 2000). However, the viscosity of EA was low and Tween40® should be added to reduce the surface tension of the blends thereby inducing successful fiber formation. This result agreed well with the study of Peng et al. (2008) who reported the important role of surfactants in modulating the morphology of electrospun fibers. The authors stated that poly(L-lactic acid) electrospun fibers with smaller and more uniform diameters were obtained when certain concentrations of surfactant were added to the PLLA solutions. Similarly, in a study on the influence of

surfactant on electrospun fiber morphology of Jung et al. (2005) reported that morphologies and diameters of poly(vinyl alcohol) electrospun fibers were evidently affected by types (e.g. anionic, cationic and non-ionic) and concentration of surfactant added to the polymer solutions. The study revealed that addition of amphoteric surfactants not only significantly decreased fiber diameters but also created a point-bonded junction structure of the PVA non-woven fiber mat. Here, the reduction in electrical conductivity upon addition of the non-ionic surfactant (Tween40[®]) to the CA-EA blend might potentially be explained by binding of surfactant monomers to the backbone of EA thereby reducing its ability to act as a polyelectrolyte. This possibility was recently discussed by Khun et al. (1998), Klinkesorn and Namatsila (2009), Mun et al. (2006) and Tradós (2009).

As mentioned previously, the viscosity was not significantly affected by the addition of surfactant suggesting that the presence of Tween40[®] might not interfere in polymer-polymer entanglement processes and instead aided in dispersing polymer molecules (Klinkesorn and Namatsila, 2009, Tradós, 2009). A similar result was reported by Kriegel et al. (2009) in that addition of nonionic surfactants had little influence on solution viscosity of chitosan-PEO blends. In contrast, addition of ionic surfactant may lead to substantial changes in solution viscosity due to alteration in polymer-surfactant interaction (Kriegel et al., 2009, Jung et al., 2005).

3.2. Electrospinning of CA-EA blend nanofibers and morphology of the electrospun blend fibers containing Tween40[®]

In this study, pure CA and CA-EA blends containing Tween40[®] were successfully electrospun at a tip-to-target distance of 15 cm with an applied voltage of 15 kV at a flow rate of 2.2 mL/h (tip's inner diameter ~0.69 mm). Fig. 1 shows the SEM micrographs at a magnification of 5000 \times that illustrate the morphologies of electrospun products (fibers/particles). Electrospinning of pure EA solution resulted in deposition of submicron particles, while electrospinning of pure CA solution yielded nanofibers with an average diameter of 265 \pm 48 nm (Fig. 1A). For the blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34, the average diameters of their fiber were 242 \pm 32, 384 \pm 54 and 410 \pm 38 nm (Fig. 1B-D), respectively. SEM micrographs thus showed that the addition of EA increased the average diameters and also improved the continuity of the blend fibers. Some surface cracking of the fibers was also observed. The surfaces of the CA fibers seemed to be generally

smoother than those of the CA-EA blend fibers. Nevertheless, the smoothness of the blend fibers increased with increasing concentration of EA (Fig. 1B-D). This could be because EA potentially accumulated on the surface of the CA-EA blend electrospon jet. However, additional experiments using atomic force microscopy or x-ray photon spectroscopy would be needed to gain an insight into the surface composition of the fibers.

3.3 Compositional analysis of CA-EA electrospun blend nanofiber by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and Differential Thermal Gravimetry (DTG)

Infrared spectra of nanofibers electrospun from CA and EA indicated that electrospun fibers were composed of both CA and EA (Fig. 2). FTIR spectra of electrospun particles of EA had characteristic peaks at about 34.00 and 16.00 μm^{-1} indicative of amine and carboxylic acid groups, respectively (Stuart, 2004). Characteristic peaks for pure CA fibers were located at about 3500 1750, 1250 and 1050 cm^{-1} . The absorption peak at 3500 cm^{-1} can be attributed to the presence of a hydroxyl group, while the peaks at 1750, 1250 and 1050 cm^{-1} indicated the presence of carbonyl group, ether group, and $-\text{C}-\text{O}-$ bond of $-\text{CH}_2-\text{OH}$ group, respectively (Brandenburg and Seydel, 1996).

Thermal gravimetric analysis of electrospun fibers or particles subjected to a temperature ramp of between 50 to 700 $^{\circ}\text{C}$ is shown in Fig. 3. Differential analysis of the TGA data confirmed that electrospun blend fibers were indeed composed of both CA and EA. Thermal degradation of pure CA electrospun fibers was observed at $\sim 370^{\circ}\text{C}$, while degradation of pure EA electrospray occurred in the ranges of 170-250 $^{\circ}\text{C}$ and 270-350 $^{\circ}\text{C}$. The char content at 700 $^{\circ}\text{C}$ for the electrospun pure CA fibers was about 5% while that of pure EA electrospray was about 15%. The characteristic weight loss revealed an improvement in the thermal stability of the electrospun blended fibers. Fig. 4 shows the composition of the composite electrospun fibers as well as that of polymer solution obtained from deconvolution of the dTGA spectra of Fig. 3 followed by integration of the peak areas. Electrospun composite fibers produced from solutions of blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34 contained 21.3%, 48.3% and 59.1% of EA, respectively, which was noticeably higher than the concentration in the electrospinning solution. It is interesting to note that egg albumen was preferentially electrospun since the proteins has a globular structure and thus did not readily entangle to form a continuous fiber, as evidenced by the

fact that pure EA could not be electrospun into fibers. EA like many proteins is surface active and thus readily accumulates at surfaces and interfaces (Mun et al., 2006, Tadros, 2009). The preferential adsorption of EA at the surface of the to-be-spun solution could thus be a contributing factor to the increased concentrations of EA found in the fibers. In addition, preferential accumulation of protein at the surface of the ejected polymer jet might occur.

4. CONCLUSION

This study demonstrated a successful fabrication of *edible* electrospun fibrous thin film. The blend fibers were electrospun from two well-known food biopolymers, CA and EA. The blend fibers were electrospun from solutions of CA (20 wt% in 85% acetic acid) and EA (12 wt% in 50% formic acid). Due to the low entanglement and very high surface tension of the EA solution, nanofibers were unable to form. Unlike CA, the pure CA nanofibers were electrospun at a condition with a tip-to-target distance of 15 cm, an applied voltage of 15 kV, and a flow rate of 2.2 mL/h (tip's inner diameter ~ 0.69 mm).

Initially, the mixing of egg albumen with cellulose acetate did not induce fiber production, but after addition of Tween40®, a food emulsifier, to the blend electrospun composite fibers were successfully obtained. Our study highlights that while the use of food biopolymers in electrospinning may be challenging, variations in solution composition and addition of surfactant to modulate the solution properties are viable options to induce electrospinning. While the fibers produced in this study are fundamentally edible; the high concentrations of the acids that were utilized for electrospinning process still pose a problem. Ultimately, the fibers would need to undergo a washing process in order to become a completely acceptable product for use in food and pharmaceuticals. Since both EA and CA are water soluble, an additional crosslinking step may be required to prevent the dissolution of fibers during the washing step. Despite these remaining challenges, edible polysaccharide-protein composite ultrafine fibers could find applications in food packaging materials contributing to an increased safety and quality of foods. In the future, the fibers could also be used for the encapsulation of bioactive compounds and act as a pharmaceutical carrier for controlled release in the gastrointestinal tract.

5. ACKNOWLEDGEMENT

This research project was fully financially supported by a grant from the Thailand Research Fund (TRF; grant number TRG 508008).

REFERENCES

- Aguilera, J.M., 2005. Why food microstructure?, *Journal of Food Engineering*, 67(1-2), 3-11.
- Agarwal, S., Wendorff, J.H., Greiner, A., 2008. Use of electrospinning technique for biomedical applications. *Polymer*, 49(26), 5603–21.
- Brandenburg, K., Seydel, U., 1996. Fourier transform infrared spectroscopy of cell surface polysaccharides. In: H.H. Mantsch, D. Chapman (Eds.). *Infrared spectroscopy of biomolecules* (pp. 207–216). John Wiley & sons, New York.
- Bucho, C.J., Chen, L.C., Shen, Y., Martin, D.C., 1999. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. *Polymer*, 40(26), 7397–7407.
- Chew, S.Y., Wen, J., Yim, E.K., Leong, K.W., 2005. Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules*, 6(4), 2017–24.
- Deitzel, J.M., Kleinmeyer, J.D., Hirvonen, J.K., Beck Tan, N.C., 2001. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer*, 42(19), 8163–8170.
- George, L., Sander, W., 2004. Matrix isolation infrared and ab initio study of the hydrogen bonding between formic acid and water. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60(13), 3225–3232.
- Gunasekaran, S., Ko, S. and Xiao L., 2007. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications. *Journal of Food Engineering*, 83(1), 31-40.
- Gupta, P., Elkins, C., Long, T.E., Wilkes, G.L., 2005. Electrospinning of linear homopolymers of poly(methyl methacrylate): exploring relationships between fiber formation, viscosity, molecular weight and concentration in a good solvent. *Polymer*, 46(13), 4799–4810.
- Han, S.O., Youk, J.H., Min, K.D., Kang, Y.O., Park, W.H., 2008. Electrospinning of cellulose acetate nanofibers using a mixed solvent of acetic acid/water: Effects of solvent composition on the fiber diameter. *Materials Letters*, 62(4-5), 759–762.
- Jung, Y.H., Kim, H.Y., Lee, D.R., Park, S.Y., 2005. Characterization of PVOH Nonwoven Mats Prepared from Surfactant-Polymer System via Electrospinning. *Macromolecular research*, 13(5), 385–390.

- 1 Karp, J.M., Langer R., 2007. Development and therapeutic applications of advanced
2 biomaterials. *Current Opinion in Biotechnology*, 18(5), 454–459.
- 3 Kenawy, E.R., Bowlin, G.L., Mansfield, K., Layman, J., Simpson, D.G., Sanders, E.H.,
4 Wnek, G.E., 2002. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun
5 poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *Journal of Controlled*
6 *Release*, 81(1-2), 57–64.
- 7 Kenawy, E.R., Abdel-Hay, F.I., El-Newehy, M.H., Wnek, G.E., 2009. Processing of
8 polymer nanofibers through electrospinning as drug delivery systems. *Materials*
9 *Chemistry and Physics*, 113(1), 296–302.
- 10 Ki, C.H., Baek, D.H., Gang, K.D., Lee, K.H., Um, I.C., Park, Y.H., 2005. Characterization
11 of gelatin nanofiber prepared from gelatin–formic acid solution. *Polymer*, 46(14),
12 5094–5102.
- 13 Klinkesorn, U., Namatsila, Y., 2009. Influence of chitosan and NaCl on physicochemical
14 properties of low-acid tuna oil-in-water emulsions stabilized by non-ionic surfactant.
15 *Food Hydrocolloid*, 23(5), 1374-1380.
- 16 Kriegel, C., Kit, K.M., McClements, D.J., Weiss, J., 2009. Electrospinning of chitosan–
17 poly(ethylene oxide) blend nanofibers in the presence of micellar surfactant solutions.
18 *Polymer*, 50(1), 189-200.
- 19 Kuhn, P.S., Levin, Y., Barbosa, M.C., 1998. Complex formation between polyelectrolytes
20 and ionic surfactants. *Chemical Physics Letters*, 298(1-3), 51–6.
- 21 Lapasin, R., Prici, S., 1995. *Secondary and tertiary structure of polysaccharides in*
22 *solutions and gels: rheology of industrial polysaccharides – theory and applications*.
23 Blackie Academic and Professional Publishers, Melbourne.
- 24 Leeden, V.D.M.C., Rutten, A.A.C.M., Frens, G.J., 2000. How to develop globular
25 proteins into adhesives. *Journal of Biotechnology*, 79(3), 211–221.
- 26 Li-Chan, E.C., Powrie, W.D., Nakai, S., 1995. The chemistry of eggs and egg products.
27 In: W.J. Stadelman, O.J. Cotterill, (Eds.), *Egg science and technology*; 4th ed.
28 (pp.105–175). Food Product Press, New York.
- 29 Ma, Z., Kotaki, M., Ramakrishna, S., 2005. Electrospun cellulose nanofiber as affinity
30 membrane. *Journal of Membrane Science*, 265(1-2), 115–123.

- 1 Martin, D.C., Jiang, T., Buchko, J., 1997. *Protein-based materials*. Birkhauser, Boston.
- 2 Mun, S., Decker, E.A., McClements, D.J., 2006. Effect of molecular weight and degree of
3 deacetylation of chitosan on the formation of oil-in-water emulsions stabilized by
4 surfactant–chitosan membranes. *Journal of colloid and Interface Science*, 296(2),
5 581–590.
- 6 Park, W.H., Jeong, L., Yoo, D., Hudson, S., 2004. Effect of chitosan on morphology and
7 conformation of electrospun silk fibroin nanofibers. *Polymer*, 45(21), 7151–7157.
- 8 Peng, H., Zhou, S., Guo, T., Li, Y., Li, X., Wang, J., Weng, J., 2008. In vitro degradation
9 and release profiles for electrospun polymeric fibers containing paracetamol. *Colloids
10 and Surfaces B: Biointerfaces*, 66(2), 206–212.
- 11 Ranganath, S.H., Wang, C.H., 2008. Biodegradable microfiber implants delivering
12 paclitaxel for post-surgical chemotherapy against malignant glioma. *Biomaterials*,
13 29(20), 2996–3003.
- 14 Reneker, D.H., Chun, I., 1996. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by
15 electrospinning. *Nanotechnology*, 7(3), 216–223.
- 16 Reneker, D.H., Yarin, A.L., Fong, H., Koombhongse, S., 2000. Bending instability of
17 electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *Journal of
18 Applied Physics*, 87(9), 4531–47.
- 19 Sill, T.J., von Recum, A., 2008. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue
20 engineering. *Biomaterials*, 29(13), 1989–2006.
- 21 Son, W.K., Youk, J.H., Park, W.H., 2006. Antimicrobial cellulose acetate nanofibers
22 containing silver nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 65(4), 430–434.
- 23 Stuart, B.H., 2004. *Organic Molecules: Infrared Spectroscopy: Fundamentals and
24 Applications* (pp. 71–93). John Wiley & Sons, New Jersey.
- 25 Suwantong, O., Opanasopit, P., Ruktanonchai, U., Supaphol, P., 2007. Electrospun
26 cellulose acetate fiber mats containing curcumin and release characteristic of the
27 herbal substance. *Polymer*, 48(26), 7546–7557.
- 28 Tadros, T., 2009. Polymeric surfactants in disperse systems. *Advances in Colloid and
29 Interface Science*, 147–148(Special issue), 281–299.

- 1 Taepaiboon, P., Rungsardthong, U., Supaphol, P., 2007. Vitamin-loaded electrospun
2 cellulose acetate nanofiber mats as transdermal and dermal therapeutic agents of
3 vitamin A acid and vitamin E. *European Journal of Pharmaceutics and*
4 *Biopharmaceutics*, 67(2), 387–397.
- 5 Tungprapa, S., Jangchud, I., Supaphol, P., 2007. Release characteristics of four model
6 drugs from drug-loaded electrospun cellulose acetate fiber mats. *Polymer*, 48(17),
7 5030–5041.
- 8 Uchegbu, F.I., Schätzlein, G.A., 2006. *Polymer in drug delivery*. Florida: CRC Press
9 Taylor & Francis Group.
- 10 Um, I.C., Kweon, H.Y., Park, Y.H., Hudson, S., 2001. Structural characteristics and
11 properties of the regenerated silk fibroin prepared from formic acid. *International*
12 *Journal of Biological Macromolecules*, 33(2), 91–97.
- 13 Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., Bhumiratana, S., Hongsprabhas, P., 2007a. Physical
14 properties of egg albumen and cassava starch composite network formed by a salt-
15 induced gelation method. *Food research international*, 40(2), 249–256.
- 16 Wongsasulak. S., Kit, K.M., McClements, D.J., Yoovidhya, T., Weiss, J., 2007b. The
17 effect of solution properties on the morphology of ultrafine electrospun egg albumen–
18 PEO composite fibers. *Polymer*, 48(2), 448–457.
- 19 Xu, X., Yang, L., Xu, X., Wang, X., Chen, X., Liang, Q., 2005. Ultrafine medicated fibers
20 electrospun from W/O emulsions, *Journal Controlled Release*, 108(1), 33–42.
- 21 Yarin, A.L., Koombhongse, S., Reneker, D.H., 2001. Taylor cone and jetting from liquid
22 droplets in electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Physics*, 90(9),
23 4836–4846.
- 24 Zeng, J., Xu, X., Chen, X., Liang, Q., Bian, X., Yang, L., Jing, X., 2003. Biodegradable
25 electrospun fibers for drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 92(3), 227–231.
- 26 Zong, X.H., Kim, K., Fang, D.F., Ran, S.F., Hsiao, B.S., Chu, B., 2002. Structure and
27 process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer*,
28 43(16), 4403–12.

1 **NOMENCLATURES**

2	c^*	Critical chain overlap concentration
3	K	Flow behavior consistency
4	n	Flow-behavior index
5	σ	Shear stress (Pa)
6	$\dot{\gamma}$	Shear rate (s ⁻¹)
7	η_a	Apparent viscosity (Pa·s)

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

Figure 1

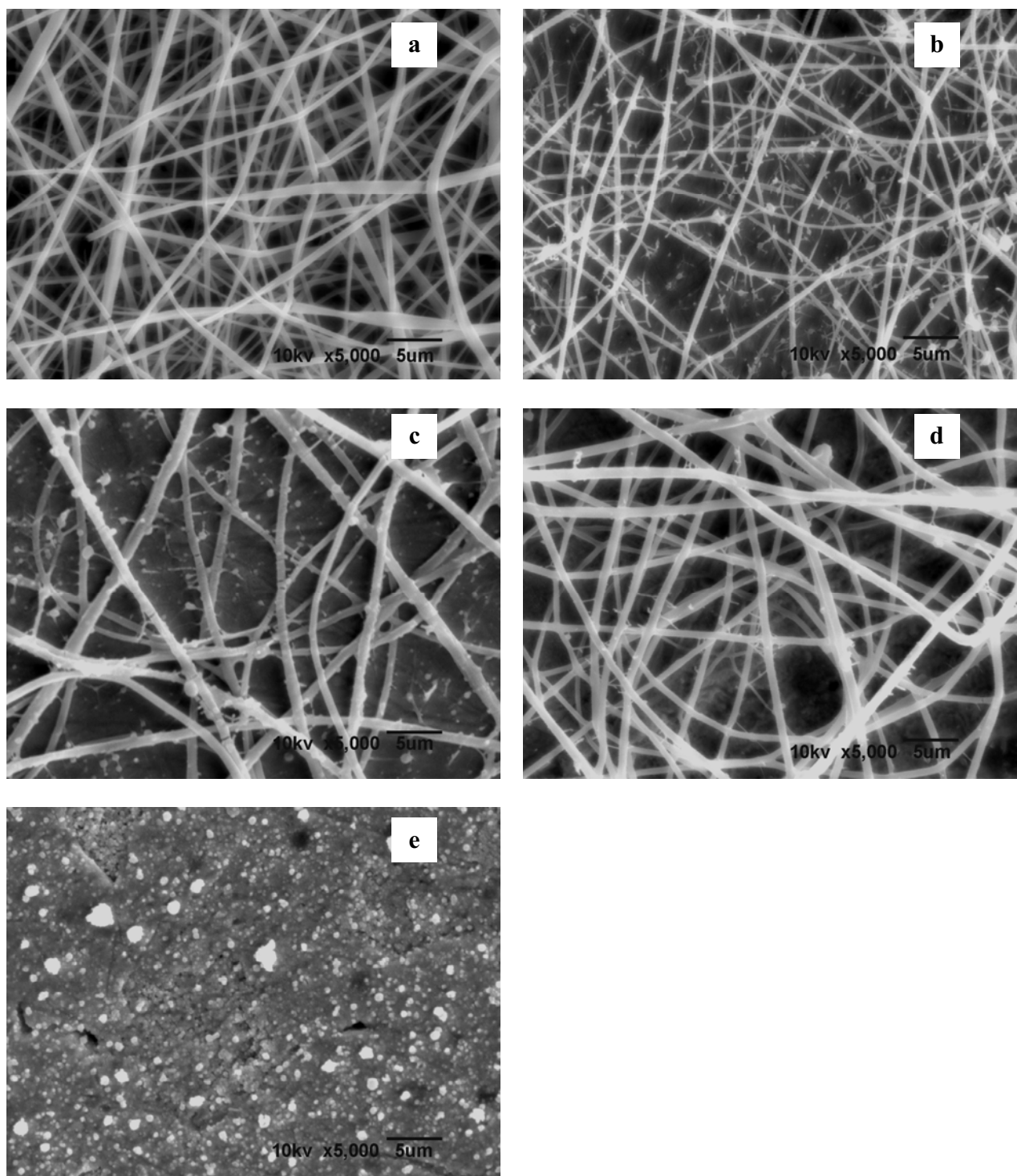


Figure 1. SEM micrographs of the electrospun nanofibers or electrospun particles from mixed solution of CA (20 wt% in 85% acetic acid) and EA (12 wt% in 50% formic acid). The micrographs from (A) to (D) were the morphology of (A) pure CA, (B) blend 91/9, (C) blend 77/23, (D) blend 66/34 and (E) pure EA. The bar scale is 5 μm.

Figure 2

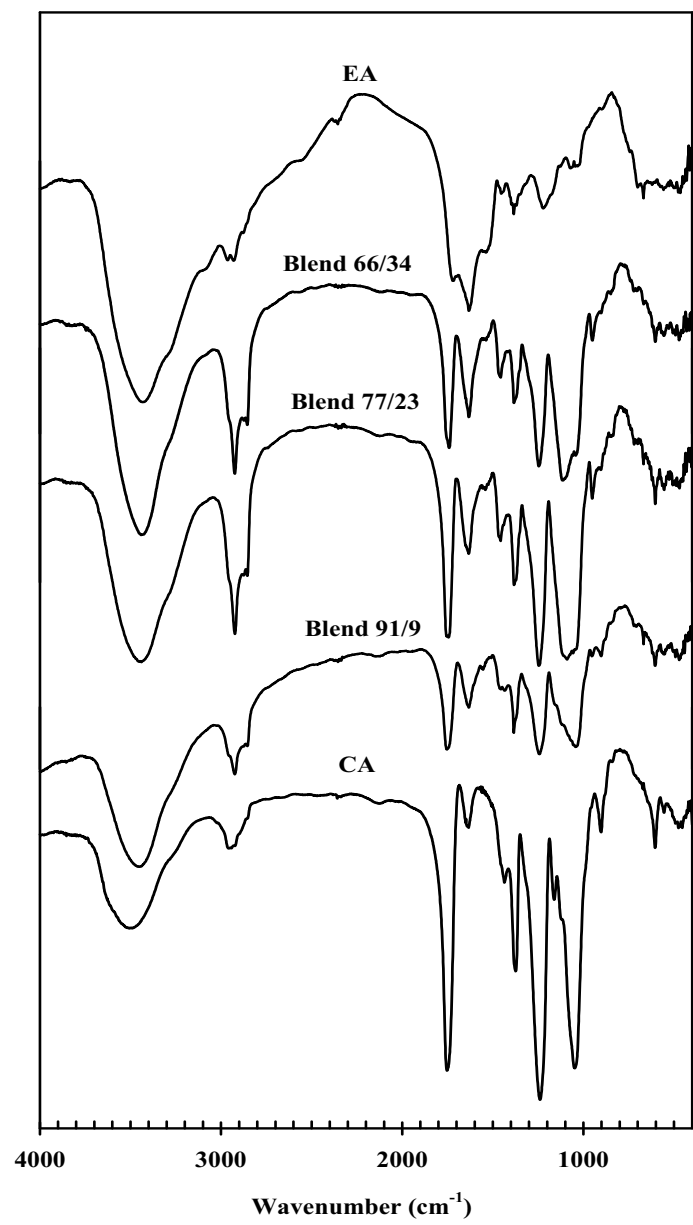


Figure 2. Infrared spectra of the electrospun fibers of CA, CA-EA blends (i.e, blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34) and electropsun particles of EA at wave numbers ranging between 4000-400 cm⁻¹.

Figure 3

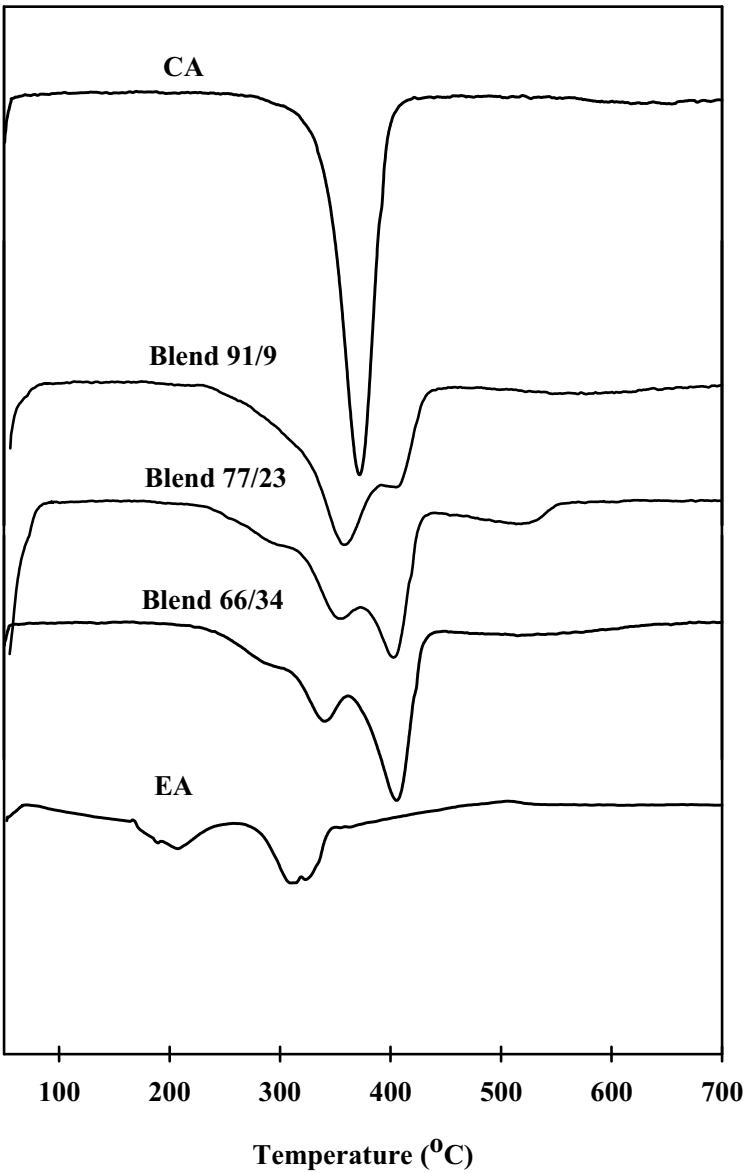


Figure 3. Differential thermo gravimetric curve dm/dT in $mg/^{\circ}C$ as a function of the oven temperature (T) for electrospun fibers of CA, CA-EA blends (i.e, blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34) and electrospun particles of EA.

Figure 4

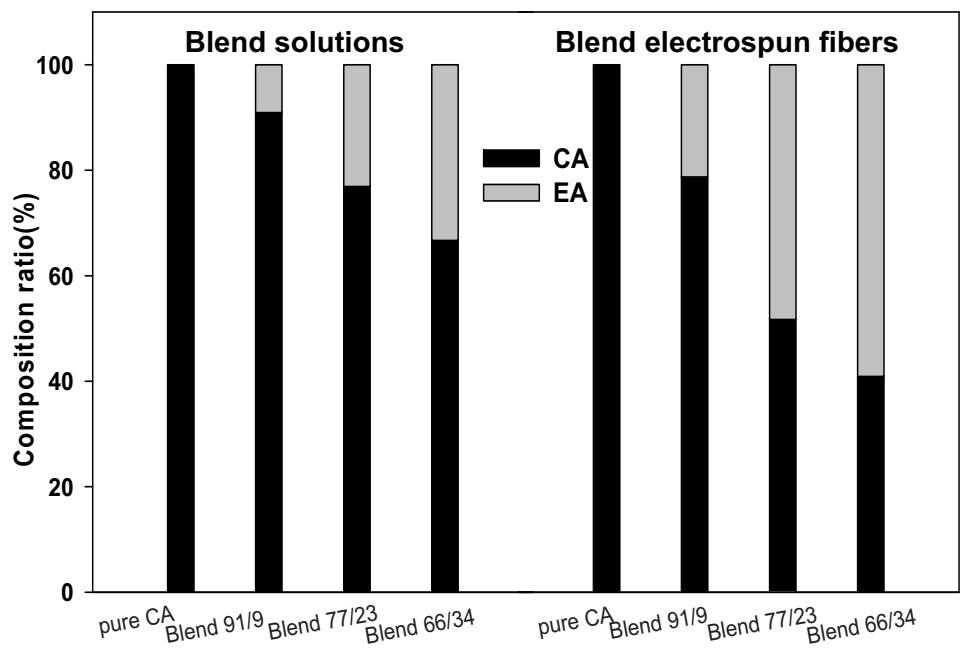


Figure 4. Comparison of cellulose acetate (CA):egg albumen (EA) composition ratio in the blend solution and that of blend electrospun fiber. The shown values were calculated from the thermogravimetric analysis of the samples; pure CA, blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34.

CAPTION OF FIGURES

Figure 1. SEM micrographs of the electrospun nanofibers or electrospun particles from mixed solution of CA (20 wt% in 85% acetic acid) and EA (12 wt% in 50% formic acid). The micrographs from (A) to (D) were the morphology of (A) pure CA, (B) blend 91/9, (C) blend 77/23, (D) blend 66/34 and (E) pure EA. The bar scale is 5 μm .

Figure 2. Infrared spectra of the electrospun fibers of CA, CA-EA blends (i.e, blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34) and electrospun particles of EA at wave numbers ranging between 4000-400 cm^{-1} .

Figure 3. Differential thermo gravimetric curve dm/dT in $\text{mg}/^\circ\text{C}$ as a function of the oven temperature (T) for electrospun fibers of CA, CA-EA blends (i.e, blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34) and electrospun particles of EA.

Figure 4. Comparison of cellulose acetate (CA):egg albumen (EA) composition ratio in the blend solution and that of blend electrospun fiber. The shown values were calculated from the thermogravimetric analysis of the samples; pure CA, blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34.

Table 1. Preparation step and blending ratios of CA-EA blend electrospun solutions; blend 91/9, blend 77/23 and blend 66/34

Preparation step of			Components	
Stock solution of CA; stock CA			CA powder	20.0 g
			85% acetic acid	80.0 g
Stock solution of EA; stock EA			EA powder	12.0 g
			50% formic acid	88.0 g
CA-EA blending solutions			Stock solution blending volume ratio CA:EA	
Samples	polymer weight ratio (CA:EA)	Total polymer conc. (% w/w)	Stock CA (g)/stock EA (g)/Tween40®(g)	
Pure CA	100:0	20.0	20.00/-/-	
Blend 91/9	91:9	19.25	3.64/0.36/0.40	
Blend 77/23	77:23	18.25	3.08/0.92/0.72	
Blend 66/34	66:34	17.25	2.64/1.36/0.92	
Pure EA	0:100	12.00	-/ 20.00/-	

(The concentrations of stock solution were prepared as obtained from the study result reported in topic#3.1)

1 **Table 2.** Solution properties of the polymer blends *with no Tween40[®] added* for electrospinnig.

Percentage ratio (CA:EA)	Apparent viscosity $\eta_{a,100}$ (Pa·s)	Power law consistency coefficient (K)	Power law flow-behavior index (n)	Surface tension (mN/m)	Electrical conductivity (mS/cm)
100:0	3.10±0.07	4.33±0.20	0.93±0.01	29.68±0.06	0.02±0.00
91:9	2.8±0.02	5.43±0.12	0.92±0.01	30.44±0.03	0.17±0.00
77:23	1.48±0.04	5.63±0.04	0.83±0.02	31.25±0.10	0.69±0.00
66:34	1.36±0.04	5.42±0.11	0.79±0.01	32.03±0.10	1.05±0.00
0:100	0.37±0.04	6.85±0.37	0.37±0.02	34.28±0.06	5.75±0.01

1 **Table 3.** Solution properties of the polymer blends *with Tween40[®]* added for electrospinning.

Percentage ratio (CA:EA)	Apparent viscosity $\eta_{a,100}$ (Pa·s)	Power law consistency coefficient (K)	Power law flow-behavior index (n)	Surface tension (mN/m)	Electrical conductivity (mS/cm)
91:9	2.73±0.06	5.42±0.23	0.85±0.01	28.69±0.02	0.14±0.01
77:23	1.32±0.01	5.81±0.17	0.68±0.01	29.16±0.05	0.42±0.00
66:34	1.19±0.09	3.51±0.26	0.77±0.01	29.28±0.05	0.73±0.01

2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12