



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินที่ออกฤทธิ์เนิ่นนาน
สำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 1

ผศ.ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์

ธันวาคม 2560

สัญญาเลขที่ TRG5880213

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินที่ออกฤทธิ์เนิ่นนาน
สำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 1

ผศ.ดร.จุฑามาศ รัตนวราภรณ์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

Project Code : TRG5880213

Project Title : การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คูมินที่ออกฤทธิ์เนิ่นนานสำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 1

Investigator : ผศ.ดร.จุฑามาศ รัตนวรารณ คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

E-mail Address : Juthamas.r@chula.ac.th

Project Period : 2 ปี 6 เดือน (กรกฎาคม 2558 - ธันวาคม 2560)

ระบบนำส่งยา (drug delivery system) ที่สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยาในระยะเวลาและบริเวณที่ต้องการได้ (controlled release) ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในการนำมาประยุกต์ใช้ทางการแพทย์ เนื่องจากสามารถช่วยลดขนาด (dose) ของยาที่ต้องให้กับผู้ป่วย ลดจำนวนครั้งที่ผู้ป่วยต้องเข้ารับการรักษา หลีกเลี่ยงผลข้างเคียงจากการที่ผู้ป่วยได้รับยาเกินขนาด หรือรับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานๆ และสามารถออกแบบให้มีความจำเพาะต่อบริเวณที่ต้องการรักษา มากกว่า ทั้งยังช่วยรักษาความคงตัวของยา (stability of drug) ทำให้อยู่ในร่างกายได้นานขึ้น วัสดุที่ใช้ในการผลิตระบบนำส่งยานี้จะต้องมีคุณสมบัติสำคัญ คือ มีความเข้ากันได้กับชีวภาพในร่างกาย ไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ และสามารถย่อยสลายได้ในร่างกาย โดยสามารถควบคุมอัตราการย่อยสลายให้เหมาะสมกับอัตราการปลดปล่อยยาได้ ไพโบรอินใหม่เป็นชีววัสดุที่มีคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้นและเริ่มได้รับความสนใจในการนำมาใช้ในการแพทย์อย่างแพร่หลายโดยเฉพาะเส้นใยไหมได้ผลิตจากหนอนไหมสายพันธุ์ Bombyx mori ไหมไทยจัดเป็นวัตถุดิบที่สามารถหาได้ง่ายในประเทศไทย เนื่องจากสภาพอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของหนอนไหม ไพโบรอินที่สกัดได้จากไหมเป็นโปรตีนที่มีสมบัติทางกลที่ดีมากเมื่อเทียบกับโปรตีนและพอลิเมอร์ธรรมชาติชนิดอื่นๆ และมีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพในร่างกายช้า ดังนั้น ไพโบรอินใหม่จึงเป็นตัวเลือกสำหรับการนำมาผลิตระบบนำส่งยาที่สามารถควบคุมอัตราการปลดปล่อยยา สารละลายไพโบรอินใหม่มีสมบัติในการเกิดเจลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเบส การได้รับแรงกระทำภายนอก หรือการกระตุ้นด้วยการเติมสารบางชนิดลงไปเพื่อให้เกิดการเชื่อมขวางภายในโมเลกุล ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของสารกลุ่มสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบต่อพฤติกรรมการเกิดเจลและสมบัติของไฮโดรเจลไพโบรอินใหม่ ในปัจจุบันมีสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบบางชนิดได้รับการรับรองมาตรฐานความปลอดภัยจากองค์การอาหารและยาของประเทศ

สหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration: US-FDA) และถูกใช้อย่างแพร่หลายในด้านอาหาร ยา และเครื่องสำอาง อาทิ sodium dodecyl sulfate (SDS) และ sodium tetradecyl sulfate (STS) สำหรับงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ ได้แก่ sodium octyl sulfate (SOS) sodium dodecyl sulfate (SDS) และ sodium tetradecyl sulfate (STS) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเคมีคล้ายกัน แต่มีความยาวของสายอัลคิลและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน เพื่อเป็นระบบนำส่งและปลดปล่อยเคอร์คูมิน ซึ่งมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ และใช้กระตุ้นการหายของแผลที่เกิดการอักเสบติดเชื้อง่าย เช่น แผลในผู้ป่วยโรคเบาหวาน เป็นต้น จากการศึกษาวิจัย พบว่า สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้ในระยะเวลาแตกต่างกัน ตั้งแต่ 14 นาที ถึง 144 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่ใช้ สาร SDS และ STS ที่มีสายอัลคิลและมีค่าความเข้มข้นวิกฤตต่ำ สามารถกระตุ้นการเกิดเจลได้ภายในเวลา 14- 30 นาที นอกจากนี้ ไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปได้จากการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบแต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ยังมีสมบัติแตกต่างกันอีกด้วย โดยพบว่า ไฮโดรเจลไฟโบรอินที่ขึ้นรูปด้วยการเติม STS ที่ความเข้มข้น 0.09% มีสัดส่วนโครงสร้างเคมี β -sheet สูงที่สุด ทำให้มีอัตราการย่อยสลายช้าที่สุด และเมื่อนำไฮโดรเจลดังกล่าวไปบรรจุเคอร์คูมิน พบว่า ไฮโดรเจลสูตรนี้สามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้เนิ่นนาน และไม่เป็นพิษกับเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 10993-5 ไฮโดรเจลสูตรดังกล่าวจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้รักษาแผลในหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายของแผลกับแผลที่ไม่ได้ทำการรักษาและแผลที่รักษาด้วยไฟบรินเจลซึ่งเป็นเจลทาแผลที่ใช้แพร่หลายทางการแพทย์ ผลการทดลอง พบว่า ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่บรรจุเคอร์คูมินกระตุ้นการหายของแผลได้ดีกว่าแผลที่รักษาด้วยไฟบรินเจล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 3-7 วันหลังทำการรักษา ดังนั้น ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่บรรจุเคอร์คูมินนี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาแผลเบาหวานและแผลที่มีการอักเสบติดเชื้อง่ายต่อไปได้

Keywords : ไฟโบรอินไหมไทย เคอร์คูมิน ระบบนำส่ง ไฮโดรเจล การรักษาแผล

โครงการ : การพัฒนาระบบนำส่งเคอร์คิวมินให้ออกฤทธิ์เนิ่นนานสำหรับการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่
1

ระยะเวลาโครงการ : 2 ปี 6 เดือน (1 กรกฎาคม 2558 ถึงวันที่ 31 ธันวาคม 2560)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน : ผศ.ดร.จุฬามาศ รัตนวราภรณ์

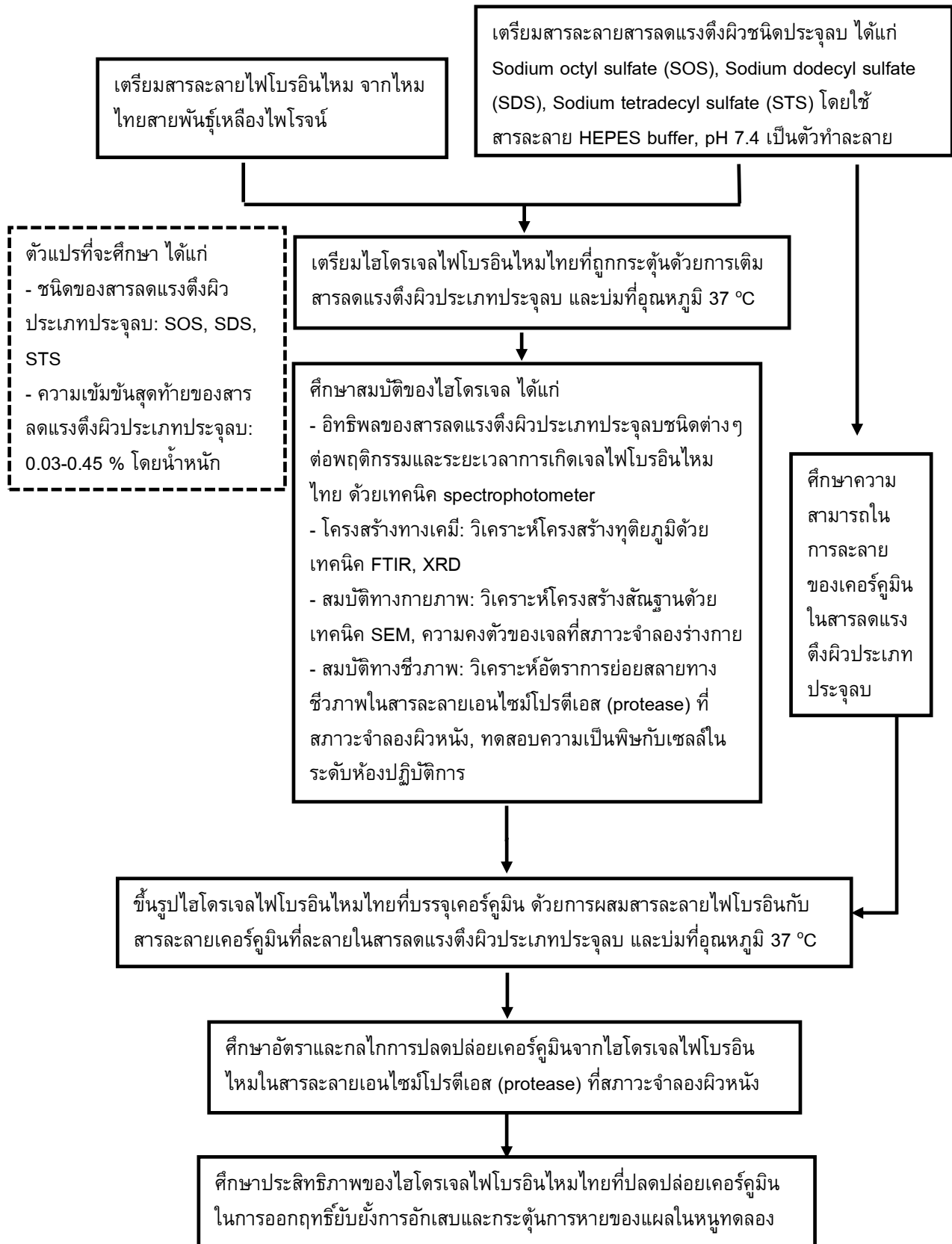
ชื่อนักวิจัยที่ปรึกษา : ศ.ดร. ศิริพร ดำรงค์ศักดิ์กุล

วัตถุประสงค์

1. พัฒนาไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยที่สามารถกักเก็บและนำส่งเคอร์คิวมินให้ออกฤทธิ์เนิ่นนาน
2. พัฒนาไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่เป็นระบบนำส่งนำส่งเคอร์คิวมินเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาแผล
อักเสบ ติดเชื้อ

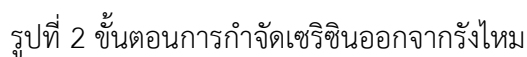
วิธีทดลอง

แผนผังการดำเนินงานวิจัย แสดงดังรูปที่ 1

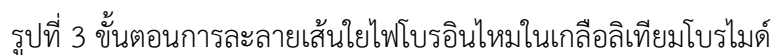


รูปที่ 1 แผนผังการดำเนินงาน

1.1 การกำจัดเซรีซิน โดยการต้มรังไหม 40 g ในสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ความเข้มข้น 0.02 M เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำรังไหมที่ต้มแล้วมาล้างในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) 4-5 ครั้ง เพื่อกำจัดเซรีซินและสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต ทำตามขั้นตอนข้างต้นซ้ำอีก 1 รอบ จากนั้นนำเส้นไหมที่ได้ไปผึ่งจนแห้ง ดังรูปที่ 2



1.2 การเตรียมสารละลายไฟโบรอินใหม่ โดยการฉีกเส้นไหมที่ผ่านขั้นตอนกำจัดเซรีซินให้ฟูๆ แล้วละลายเส้นไหมในสารละลายลิเทียมโบรไมด์ (LiBr) ความเข้มข้น 9.3 M ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักไหม 4 g ต่อปริมาตรสารละลายลิเทียมโบรไมด์ 12 ml ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังรูปที่ 3.3 แล้วจึงนำสารละลายไฟโบรอินไหมที่ได้มาไดอะไลซีในน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 3 วัน โดยขั้นแรกเปลี่ยนน้ำที่เวลา 20, 40, 60 นาที จากนั้นเปลี่ยนน้ำวันละ 3 ครั้ง เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนไดอะไลซีให้นำสารละลายไฟโบรอินไหมมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที, อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อน ความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินไหมสามารถคำนวณได้โดยการนำสารละลายไฟโบรอินไหมที่ทราบน้ำหนักไปอบแห้ง และชั่งน้ำหนักแห้ง สารละลายไฟโบรอินที่เตรียมได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 5-6% โดยน้ำหนัก



2. การเตรียมและวิเคราะห์สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ

เตรียมสารละลาย HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid) buffer ความเข้มข้น 20 mM ในน้ำปราศจากประจุ (pH 7.4) จากนั้นเตรียมสารลดแรงตึงผิวประจุลบ 3 ชนิด ได้แก่ Sodium octyl sulfate (SOS), Sodium dodecyl sulfate (SDS), Sodium tetradecyl sulfate (STS) ในสารละลาย HEPES buffer (pH 7.4) ที่ความเข้มข้นโดยน้ำหนักค่าต่างๆ

2.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration: CMC) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ

เตรียมสารลดแรงตึงผิวที่ความเข้มข้นต่างๆ ในสารละลาย HEPES buffer (pH 7.4) จากนั้นนำไปหาความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration: CMC) ซึ่งคือความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดไมเซลล์ จากการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 250 nm

2.2 การวิเคราะห์หาค่าศักย์เซต้า (Zeta potential) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ

วิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารลดแรงตึงผิว ที่ในสารละลาย HEPES buffer (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 °C ด้วยเครื่อง Zeta sizer โดยใช้เทคนิค Laser Doppler Electrophoresis (LDE)

3. การขึ้นรูปและวิเคราะห์สมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม

ผสมสารละลายไฟโบรอินไหมกับสารลดแรงตึงผิวประจุลบ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไฟโบรอินไหม 2 % โดยน้ำหนัก และความเข้มข้นสุดท้ายของสารลดแรงตึงผิว 0.03-0.45 % โดยน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C pH 7.4 สังเกตพฤติกรรมและหาระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยด้วยการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm (วัดทุก 2 นาที เป็นเวลา 120 นาที)

3.1 การวิเคราะห์โครงสร้างเคมี ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมด้วยเทคนิค Fourier Transform infrared (FTIR) spectroscopy

ศึกษาโครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม โดยนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่ได้มาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดและผสมกับโพแทสเซียมโบรไมด์ (KBr) แล้วจึงนำมาอัดขึ้นรูปเป็นเหรียญขนาดเล็ก (disc) นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Fourier

transform infrared spectroscopy (FT-IR, Spectrum GX, Perkin Elmer, UK) ด้วยโหมด Mid-Infrared (IR) spectroscopy ความละเอียด 4 cm^{-1} ที่ความยาวคลื่นในช่วง 500-4000 nm เพื่อตรวจสอบหมู่ฟังก์ชันที่บ่งชี้ถึงคุณลักษณะเฉพาะของไฟโบรอินไหม นอกจากนี้ยังนำข้อมูลช่วงความยาวคลื่น 1577-1725 nm ที่ได้มาทำ Fourier self-deconvolution (FSD) และการทำ Curve-fitting เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณของโครงสร้างทุติยภูมิของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม

3.2 การวิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมด้วยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

วิเคราะห์โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมในแนวตัดขวางด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM, JSM-5410LV, JEOL Ltd, Japan) และบันทึกภาพที่ กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อดูลักษณะพื้นผิวภายในและภายนอก และจากนั้นนำภาพที่ได้มาวิเคราะห์หารูพรุนเฉลี่ยโดยใช้โปรแกรม image J

3.3 การวิเคราะห์สัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม

วิเคราะห์สัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม โดยนำไฮโดรเจลที่ทราบน้ำหนักเริ่มต้นมาบ่มในน้ำปราศจากประจุ ที่อุณหภูมิ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ สังเกตลักษณะไฮโดรเจลและวิเคราะห์น้ำหนักที่หายไปของไฮโดรเจลเทียบกับน้ำหนักของไฮโดรเจลเริ่มต้นก่อนการบ่ม

3.4 วิเคราะห์อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่สภาวะจำลองผิวหนัง

วิเคราะห์อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลที่สภาวะจำลองร่างกาย โดยการบ่มไฮโดรเจลที่ทราบน้ำหนักเริ่มต้น ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ความเข้มข้น 3 unit/ml ที่อุณหภูมิ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ pH 5.5 โดยสารละลายเอนไซม์จะถูกเปลี่ยนทุกๆ 2 วันเพื่อรักษากิจกรรมของเอนไซม์ตลอดระยะเวลาการศึกษา จากนั้นทำการเก็บไฮโดรเจลที่ช่วงเวลาต่างๆมาล้างและวิเคราะห์น้ำหนักคงเหลือ

3.5 ศึกษาความเป็นพิษของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts) ในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO10993 Part 5

ศึกษาความเป็นพิษของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts) ในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO10993 Part 5 โดยวิธีทางอ้อม (Indirect method) การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ ได้แก่

- การเตรียมสารสกัดจากไฮโดรเจล

เริ่มจากการเตรียมไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่ปราศจากเชื้อ (Sterilization) ด้วยการกรองสารละลายไฟโบรอินไหมและสารละลายผสมของสารลดแรงตึงผิวและเคอร์คูมินผ่านเยื่อกรองที่ทำจาก cellulose acetate หรือ plastic polymer ที่มี ขนาดของรูเยื่อกรองตั้งแต่ $0.22 - 0.45\text{ }\mu\text{m}$

ซึ่งสามารถกรองเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่านี้ได้ จากนั้นนำสารละลายที่ปราศจากเชื้อข้างต้น มาขึ้นรูปไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ที่มีสถานะปลอดเชื้อ นำไฮโดรเจลที่ได้ไปแช่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ที่ไม่มีซีรั่มเป็นองค์ประกอบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารสกัดจากไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ 100% ซึ่งจะถูกนำไปเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีซีรั่มเป็นองค์ประกอบ เพื่อให้ได้สารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ

- การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ L929 ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 well-plate โดยเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นที่ความหนาแน่น 5×10^4 cell/ 1.9 cm^2 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรั่ม 10% โดยปริมาตร บ่มในตู้เพาะเชื้อที่สภาวะความดันบรรยากาศที่มี CO₂ 5 %โดยปริมาตร อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะและแผ่ตัวเป็นแบบชั้นเดียว (Monolayer) บนจานเพาะเชื้อ จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกและเติมตัวอย่างสารสกัดจากไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ที่มีความเข้มข้นต่างๆลงไปในแต่ละหลุม เพาะเลี้ยง และบ่มตามสภาวะข้างต้นเป็นเวลาอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการประเมินจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ด้วยเทคนิค (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (MTT assay) (Mosmann T.,1983)

4. ศึกษาความสามารถในการละลายของเคอร์คูมินในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ

ศึกษาความสามารถในการละลายของเคอร์คูมินในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่ความเข้มข้น 0.06-0.90 % โดยน้ำหนัก ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย โดยการนำเคอร์คูมิน 1 mg มาละลายในสารลดแรงตึงผิวปริมาตร 1 ml และบ่มที่ 37 °C, ความเร็วรอบ 200 rpm เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้เคอร์คูมินเกิดการละลายได้มากที่สุด จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงสารความเร็วรอบ 9000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และเก็บเคอร์คูมินส่วนที่ตกตะกอน (ไม่ละลายในสารลดแรงตึงผิว) ไปอบแห้งในตู้อบที่ 40 °C จนแห้งสนิท และชั่งน้ำหนักที่คงเหลือ แล้วนำไปเทกลบออกจากน้ำหนักเคอร์คูมินเริ่มต้นเพื่อคำนวณหาน้ำหนักของเคอร์คูมินส่วนที่ละลายในสารลดแรงตึงผิว และความเข้มข้นมากที่สุดของเคอร์คูมินที่ละลายได้ในสารลดแรงตึงผิวความเข้มข้นต่างๆ

5. การขึ้นรูปและศึกษาสมบัติทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ที่บรรจุเคอร์คูมิน

ทำการผสมสารละลายไฟโบรอินกับสารละลายเคอร์คูมินที่ละลายในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่มีความเข้มข้นต่างๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 5.5 จะได้ไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ที่บรรจุเคอร์คูมิน

5.1 ศึกษาอัตราและกลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่สภาวะจำลองผิวหนัง

นำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่บรรจุเคอร์คูมินมาแช่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ความเข้มข้น 1 unit/ml ในสภาวะที่สารละลายที่ใช้รองรับมีปริมาณมากกว่า 10 เท่าของปริมาตรที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอิมัลชันของสารออกฤทธิ์ เรียกว่า sink condition จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 5.5 และเก็บส่วนของสารละลายที่เวลาต่างๆ ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยออกมาจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม และคำนวณหาร้อยละการปลดปล่อยสะสมของเคอร์คูมิน (C_t) จากสูตรต่อไปนี้

$$C_i = \sum_{i=0}^t (M_i)$$

$$\text{ร้อยละการปลดปล่อยสะสม} = \frac{C_i}{C_t} \times 100$$

โดย M_i คือปริมาณเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมในช่วงเวลา i

C_i คือปริมาณของเคอร์คูมินที่ถูกปลดปล่อยจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมในแต่ละช่วงเวลา

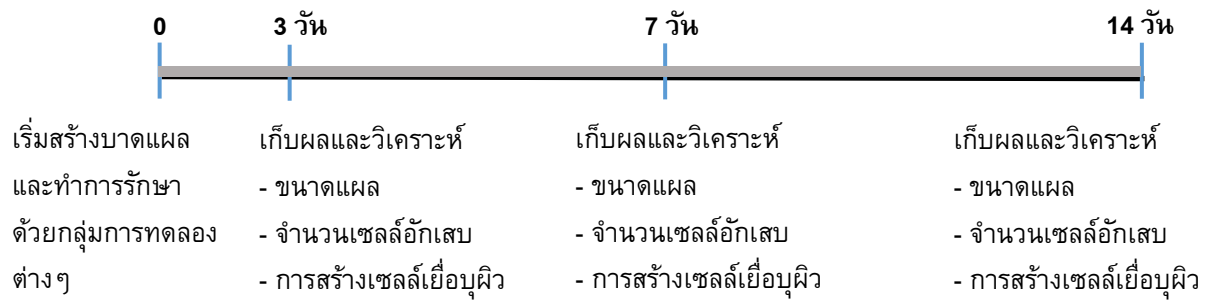
C_t คือปริมาณของเคอร์คูมินทั้งหมดที่บรรจุอยู่ในไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม

5.2 ศึกษาประสิทธิภาพของเคอร์คูมิน ที่ปลดปล่อยจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและกระตุ้นการหายของแผลในหนูทดลอง

5.2.1 สัตว์ทดลอง หนูทดลอง BALB/cMlac mice เพศผู้ น้ำหนัก 20-25 g จากศูนย์

สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (NLAC-MU) โดยเลี้ยงในระบบหนู 1 ตัวต่อกรง อุณหภูมิ 25 ± 3 °C ให้อาหารและน้ำที่ปราศจากเชื้อตลอดเวลา กำหนดให้มีช่วงกลางวัน และกลางคืนอย่างละ 12 ชั่วโมง ทั้งนี้หนูทดลองที่นำมาศึกษาวิจัยทั้งหมดผ่านการอนุมัติเห็นชอบจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2.2 การทดลองทำแผล ทำการสร้างแผลบนหลังหนู โดยเริ่มจากการฉีดยา sodium pentobarbital ความเข้มข้น 55 mg ต่อน้ำหนักตัว 1 kg เพื่อกล่อมประสาท และทำการสร้างแผลชนิดสูญเสียทั้งชั้นผิวหนัง (full-thickness wound) จำนวน 2 แผล ขนาด 0.6×0.6 cm² บนกลางหลังหนูแต่ละตัว (YAOJIONG WU et al) และทำการรักษาด้วยกลุ่มการทดลองต่างๆ ดังแสดงในแผนการทดลอง รูปที่ 4



รูปที่ 4 แผนการทดลองการรักษาแผลในหนูทดลอง

5.2.3 การแบ่งกลุ่มตัวอย่าง หนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่

กลุ่มที่ 1 หนูที่เป็นแผลและไม่ได้ทำการรักษา

กลุ่มที่ 2 หนูที่เป็นแผลและปิดบาดแผลด้วยไฟบรินเจลซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้รักษาแผลในทางการแพทย์

กลุ่มที่ 3 หนูที่เป็นแผลและปิดบาดแผลด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่ได้บรรจุเคอร์คิวมิน

กลุ่มที่ 4 หนูที่เป็นแผล และปิดบาดแผลด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่บรรจุเคอร์คิวมิน

5.2.4 การตรวจวิเคราะห์ผลการรักษา

- Wound closure เป็นการประเมินขนาดของแผลที่ปิดหลังทำการรักษา โดยถ่ายภาพในวันที่ 0, 3, 7 และ 14 และวิเคราะห์ขนาดของแผลด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 และคำนวณหาร้อยละของขนาดของแผลที่ปิดหลังทำการรักษา จากสูตร

$$\text{ร้อยละของขนาดของแผลที่ปิด} = \frac{\text{ขนาดของแผลก่อนรักษา} - \text{ขนาดของแผลหลังรักษา}}{\text{ขนาดของแผลก่อนรักษา}} \times 100$$

- วิเคราะห์จำนวนเซลล์อักเสบที่เข้ามาบริเวณเนื้อเยื่อแผล โดยทำการเก็บชิ้นเนื้อบริเวณแผลและเนื้อเยื่อข้างเคียงในวันที่ 0, 3, 7 และ 14 มาแช่ในสารละลายฟอร์มาดีไฮด์ ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัดและตรึงบนพาราฟิน ย้อมสีเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยเทคนิค Hematoxylin and Eosin Staining (H&E stain) และวิเคราะห์จำนวนเซลล์อักเสบที่เข้ามาบริเวณเนื้อเยื่อแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์และโปรแกรม Image Pro Plus 6.1

- วิเคราะห์การสร้างเซลล์เยื่อผิว (Re-epithelization) ซึ่งบ่งบอกถึงการสมานของแผลจากเนื้อเยื่อตัวอย่างที่เก็บในวันที่ 7 และ 14 และย้อมด้วยเทคนิค H&E ข้างต้น ถ่ายภาพด้วยกล้องสแตเรียโอ และวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 เพื่อคำนวณหาร้อยละการสร้างเซลล์เยื่อผิวหลังทำการรักษา จากสูตร

$$\text{ร้อยละการสร้างเซลล์เยื่อผิว} = \frac{\text{ระยะของเซลล์เยื่อผิวที่เกิดขึ้น}}{\text{ระยะของแผล}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นวิเคราะห์ความต่างทางสถิติโดยวิธี ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p\text{-value} < 0.05$)

ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการพัฒนาไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ โดยได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างได้แก่ sodium octyl sulfate (SOS) sodium dodecyl sulfate (SDS) และ sodium tetradecyl sulfate (STS) ต่อพฤติกรรมของการเกิดเจล โครงสร้างทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยเพื่อให้เกิดความเข้าใจในกลไกการเกิดเจลดังกล่าว สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิดที่เลือกมาศึกษาในงานนี้มีสูตรโครงสร้างเคมีคล้ายกัน แต่มีความยาวของสายอัลคิลและน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 1 SOS มีจำนวนหมู่อัลคิลและน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด คือเท่ากับ 7 หมู่ และ 232.27 g/mol ตามด้วย SDS ที่มีจำนวนหมู่อัลคิล 11 หมู่ และมีน้ำหนักโมเลกุล 288.38 g/mol และ STS ที่มีจำนวนหมู่อัลคิลและน้ำหนักโมเลกุลมากที่สุด คือเท่ากับ 13 หมู่ และ 316.43 g/mol ตามลำดับ

ตารางที่ 1 โครงสร้างเคมีและมวลโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ sodium octyl sulfate (SOS) sodium dodecyl sulfate (SDS) และ sodium tetradecyl sulfate (STS)

(<https://digital.lib.washington.edu/researchworks/handle/1773/24169>)

	SOS	SDS	STS
โครงสร้างเคมี	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{O}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{O}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2\text{O}-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$
สูตรเคมี	$\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{NaSO}_4$	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$	$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NaSO}_4$
จำนวนของ CH_2	7	11	13
มวลโมเลกุล (g/mol)	232.27	288.38	316.43

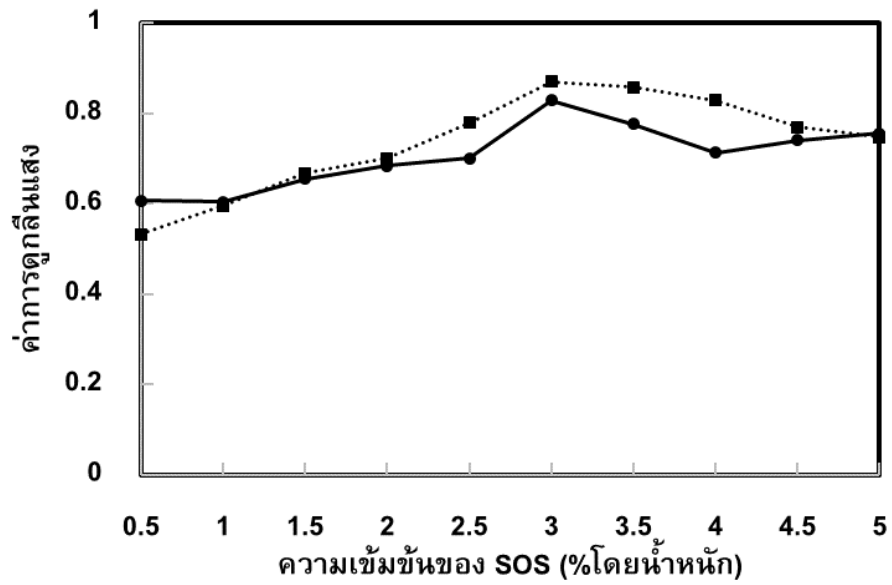
ไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยที่พัฒนาขึ้นในงานวิจัยนี้ จะถูกนำไปประยุกต์ใช้เป็นระบบนำส่งและควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินเพื่อใช้เป็นเจลทากระตุ้นการหายของแผล จึงได้ทำการศึกษาสมบัติทางชีวภาพของไฮโดรเจล ได้แก่ อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพ ความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO10993 Part 5 ประสิทธิภาพในการควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากไฮโดรเจลและประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและกระตุ้นการหายของแผลในหนูทดลอง

1 สมบัติของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

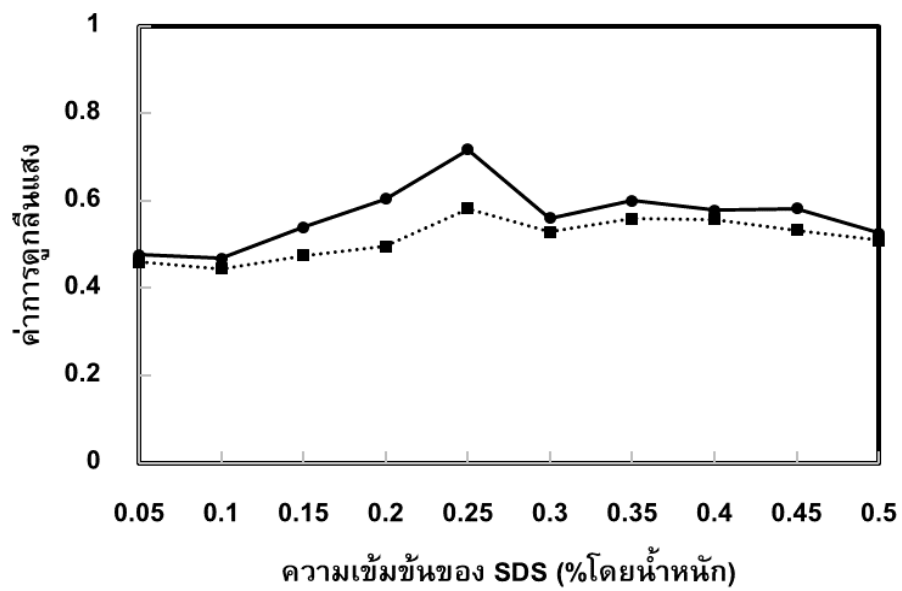
1.1 ความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration: CMC) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

ความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration: CMC) เป็นค่าที่แสดงถึงความเข้มข้นน้อยที่สุดที่ทำให้สารลดแรงตึงผิวจัดเรียงตัวเป็นไมเซลล์เมื่อละลายอยู่ในน้ำ จัดเป็นคุณสมบัติที่จำเพาะของสารลดแรงตึงผิวแต่ละชนิด การเพิ่มหรือลดปริมาณของสารลดแรงตึงผิว จะส่งผลต่อสมบัติแรงตึงผิวของสาร สามารถเร่งหรือชะลอการเกิดปฏิกิริยาของสารลดแรงตึงผิวกับสารอื่นๆได้ โดยขึ้นกับอุณหภูมิและชนิดของสารลดแรงตึงผิว (Ji Hun P. et al, 2014) การวิเคราะห์หาความเข้มข้นวิกฤต (critical micelle concentration: CMC) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SDS และ STS ที่ละลายในตัวทำละลาย 2 ชนิดคือ น้ำปราศจากไอออน (pH 6) และสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (pH 7.4) ทำโดยการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร อุณหภูมิ 37°C เพื่อหาความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ซึ่งแสดงถึงค่าความเข้มข้นวิกฤต (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดนั้นๆ (T.F. Tadros, 2005) ดังภาพที่ 1 ผลการวิเคราะห์พบว่า STS ซึ่งมีสายโซ่อัลคิลยาวที่สุด จะมีความเข้มข้นวิกฤตน้อยที่สุด เท่ากับ 0.065% โดยน้ำหนัก ถัดมาคือ SDS และ SOS ที่มีสายโซ่อัลคิลสั้นลง มีความเข้มข้นวิกฤตเท่ากับ 0.25% และ 3% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 นั่นคือ STS สามารถเกิดการเรียงตัวเป็นไมเซลล์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า SDS และ SOS. ค่าความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่า ชนิดของตัวทำละลายที่ต่างกัน ไม่มีผลกระทบต่อค่าความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้งสามชนิด กล่าวคือ ความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน (pH 6) และละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (pH 7.4) มีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ว่า ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวประเภทมีประจุ คือความยาวของสายโซ่อัลคิลหรือส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic domain) หากความยาวสายโซ่อัลคิลเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ความเข้มข้นวิกฤตลดลงในทางกลับกัน ความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ ขึ้นอยู่กับปริมาณของส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic domain) ถ้าส่วนที่ชอบน้ำลดลง ความเข้มข้นวิกฤตก็จะลดลงด้วย (T.F. Tadros, 2005) และถ้าหากเปรียบเทียบความเข้มข้นวิกฤตของสารลดแรงตึงผิวประเภทมีประจุและไม่มีประจุ จะพบว่า สารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุจะมีค่าความเข้มข้นวิกฤตน้อยกว่าสารลดแรงตึงผิวประเภทมีประจุ เนื่องจากหมู่ฟีนอล (phenyl group) ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic domain) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ จะเพิ่มคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ให้กับโมเลกุลได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสายโซ่อัลคิลของสารลดแรงตึงผิวประเภทมีประจุที่มีจำนวนคาร์บอนเท่ากัน (T.F. Tadros, 2015)

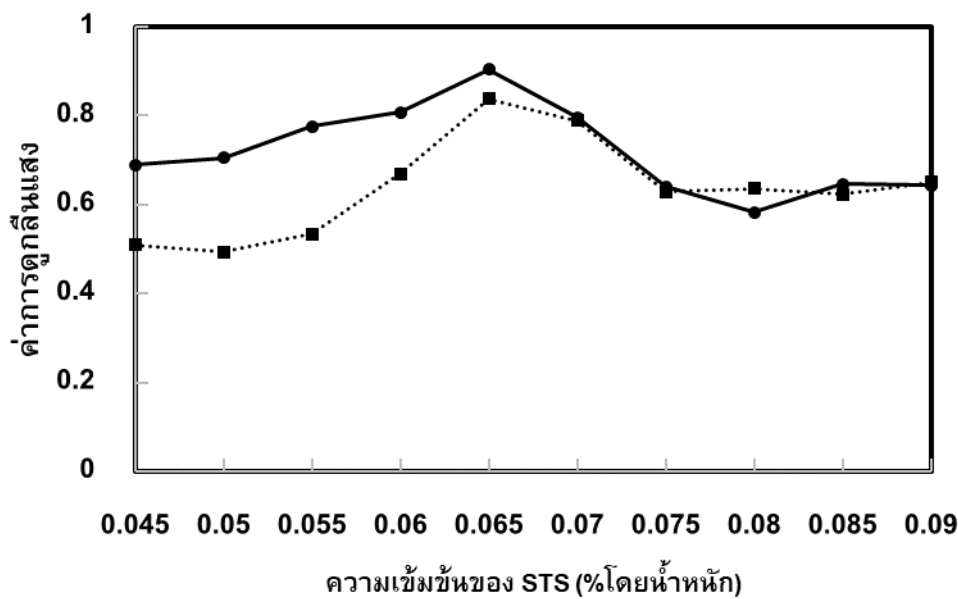
ก)



ข)



ค)



ภาพที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ ก) SOS ข) SDS ค) STS ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน (---■--- DI, pH 6) และละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ (—●— HEPES, pH 7.4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ วิเคราะห์ด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร อุณหภูมิ 37 °C

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นวิกฤตและค่าศักย์ゼต้าของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ ที่ละลายในน้ำปราศจากไอออน (DI, pH 6) และละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (pH 7.4)

	SOS	SDS	STS
ความเข้มข้นวิกฤต (% โดยน้ำหนัก) ในตัวทำละลายน้ำปราศจากไอออน, pH 6	3	0.25	0.065
ความเข้มข้นวิกฤต (% โดยน้ำหนัก) ในตัวทำละลายบัฟเฟอร์ HEPES , pH 7.4	3	0.25	0.065
Zeta potential (mv)	-23.43 ± 2.89	-52.36 ± 0.72	-68.00 ± 7.14

1.2 ค่าศักย์ゼต้า (zeta potential) ของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

ศักย์ゼต้า (Zeta Potential: ζ) คือ ความต่างศักย์ระหว่างศักย์ไฟฟ้าบริเวณพื้นผิวสเตอร์น (stern potential) กับศักย์ไฟฟ้าในชั้นสารละลายหรือศักย์ไฟฟ้าบริเวณผิวของอนุภาค ซึ่งหากศักย์ゼต้ามีค่าเป็นบวก ก็จะแสดงว่าสารละลายหรือพื้นผิวอนุภาคมีประจุรวมเป็นบวก และศักย์ゼต้ามีค่า

เป็นลบ ก็จะแสดงว่าสารละลายหรือพื้นผิวอนุภาคมีประจุรวมเป็นลบ ปัจจัยที่มีผลต่อศักย์เซต้า ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-เบส (pH), ค่าการนำไฟฟ้า (conductivity) เป็นต้น (Robert J. Hunter, 2013) จากผลการวิเคราะห์ค่าศักย์เซต้าของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิด พบว่า STS แสดงค่าศักย์เซต้าเป็นลบสูงที่สุด เท่ากับ -68 mV ในขณะที่ SDS และ SOS มีค่าศักย์เซต้าเป็นลบน้อยกว่าคือเท่ากับ -52.36 และ -23.43 mV ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางเคมีของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้งสามชนิด พบว่าค่าศักย์เซต้ามีแนวโน้มที่จะเป็นลบมากขึ้นเมื่อความยาวของสายโซ่อัลคิลของโมเลกุลเพิ่มขึ้น (Bengt K et al, 2014) โดย SOS มีค่าศักย์เซต้า น้อยกว่า SDS และ STS อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจาก SOS มีหมู่อัลคิลเพียง 7 หมู่ ในขณะที่ SDS และ STS มีหมู่อัลคิลจำนวน 11 และ 13 หมู่ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ค่าศักย์เซต้าของ SDS และ STS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากหมู่อัลคิลของ SDS กับ STS มีจำนวนใกล้เคียงกัน

2 อิทธิพลของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ และสารละลายไฟโบรอินไหมไทยต่อระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย

การทดลองนี้เป็นการศึกษาช่วงความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบและสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เหมาะสมต่อการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย โดยเลือกใช้ STS เป็นตัวแทนของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบอีก 2 ชนิด ระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยจะวิเคราะห์จากการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ตารางที่ 3 แสดงระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF) ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2% โดยน้ำหนัก กับสารละลาย STS ความเข้มข้น 0.01, 0.03, 0.04, 0.06% โดยน้ำหนัก และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C โดยติดตามผลภายในระยะเวลา 120 นาที พบว่า ระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยขึ้นอยู่กับทั้งความเข้มข้นของทั้งสารละลายไฟโบรอินไหมไทย และ STS โดยพบว่า สารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 0.5% โดยน้ำหนัก เมื่อผสมกับสารละลาย STS ที่ความเข้มข้น 0.01, 0.03, 0.04, 0.06% โดยน้ำหนัก ไม่เกิดเจลภายในระยะเวลา 120 นาทีที่ศึกษา เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเป็น 1, 1.5, 2% โดยน้ำหนัก และผสมกับสารละลาย STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.04 และ 0.06% โดยน้ำหนัก สามารถเกิดเจลได้ภายในเวลา 25-90 นาที นอกจากนี้ ยังสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะเนื้อเจลที่ได้จากการเตรียมสารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยพบว่า เจลที่เตรียมจากสายละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 0.5 และ 1% โดยน้ำหนัก จะมีลักษณะไม่คงรูป จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาต่อ ในงานนี้ จึงเลือกไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 1.5 และ 2% โดยน้ำหนักไปผสมกับสารละลาย STS ที่ความเข้มข้นในช่วงที่กว้างขึ้น ได้แก่ 0.01, 0.03, 0.04, 0.06, 0.07, 0.09, 0.10, 0.12% โดยน้ำหนัก เพื่อศึกษาระยะเวลาและพฤติกรรมการกระตุ้นการเกิดเจลเพิ่มเติม ดังแสดงในตารางที่ 4 สารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 1.5% โดยน้ำหนักเมื่อผสมกับสารละลาย STS ความเข้มข้น 0.03-0.12% โดยน้ำหนัก สามารถเกิดเจลได้ในเวลา 20-95

นาที่ สารละลาย STS ที่ความเข้มข้น 0.09-0.10% โดยน้ำหนัก สามารถกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้เร็วที่สุด ภายใน 20 นาที เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเป็น 2% โดยน้ำหนัก และผสมกับสารละลาย STS ความเข้มข้น 0.04-0.12% โดยน้ำหนัก พบว่าจะเกิดเจลได้ภายในเวลา 25-40 นาที และเกิดเจลเร็วที่สุดภายใน 25 นาทีเมื่อผสมกับสารละลาย STS ที่ความเข้มข้น 0.07-0.09% โดยน้ำหนัก จากผลการศึกษาของการทดลองนี้พบว่าช่วงความเข้มข้นของสารละลาย STS ในการกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย ใกล้เคียงกับช่วงความเข้มข้นของ SDS ที่กระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหม (1-33 mM) ที่รายงานในการศึกษาวิจัยของ X. Wu และคณะ ในปี 2012

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของความยาวสายอัลคิล ประจุและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ 3 ชนิด ได้แก่ SOS, SDS และ STS ต่อระยะเวลาและกลไกการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย โดยได้ทำการศึกษาโครงสร้างทางเคมี และสมบัติทางกายภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยเพื่อสนับสนุนความเข้าใจในกลไกการเกิดเจลให้มากยิ่งขึ้น

ตารางที่ 3 ระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหม้ไทย เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหม้ไทย (SF) ความเข้มข้น 0.5, 1, 1.5, 2% โดยน้ำหนัก กับสารละลายสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิด STS ความเข้มข้น 0.01, 0.03, 0.04, 0.06% โดยน้ำหนัก โดยศึกษาภายในระยะเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 7.4

ความเข้มข้น SF (%โดยน้ำหนัก)	ความเข้มข้น STS (%โดย น้ำหนัก)	ระยะเวลาการเกิดเจล (นาที)
0.05%	-	N/A
	0.01%	N/A
	0.03%	N/A
	0.04%	N/A
	0.06%	N/A
1%	-	N/A
	0.01%	N/A
	0.03%	55
	0.04%	35
	0.06%	30
1.5%	-	N/A
	0.01%	N/A
	0.03%	90
	0.04%	60
	0.06%	25
2%	-	N/A
	0.01%	N/A
	0.03%	N/A
	0.04%	75
	0.06%	30

*N/A = เกิดเจลไม่สมบูรณ์ในระยะเวลา 120 นาที

ตารางที่ 4 ระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหม้ไทย เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหม้ไทย (SF) ความเข้มข้น 1.5 และ 2% โดยน้ำหนัก กับสารละลายสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิด STS ความเข้มข้น 0.01-0.12% โดยน้ำหนัก โดยศึกษาภายในระยะเวลา 120 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C, pH 7.4

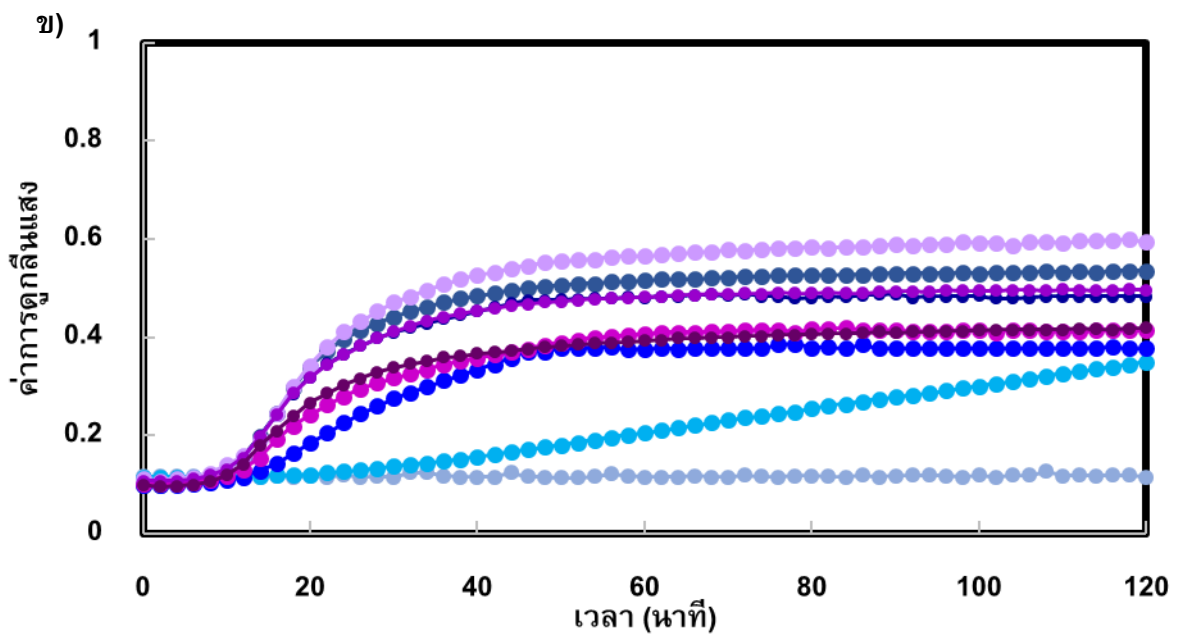
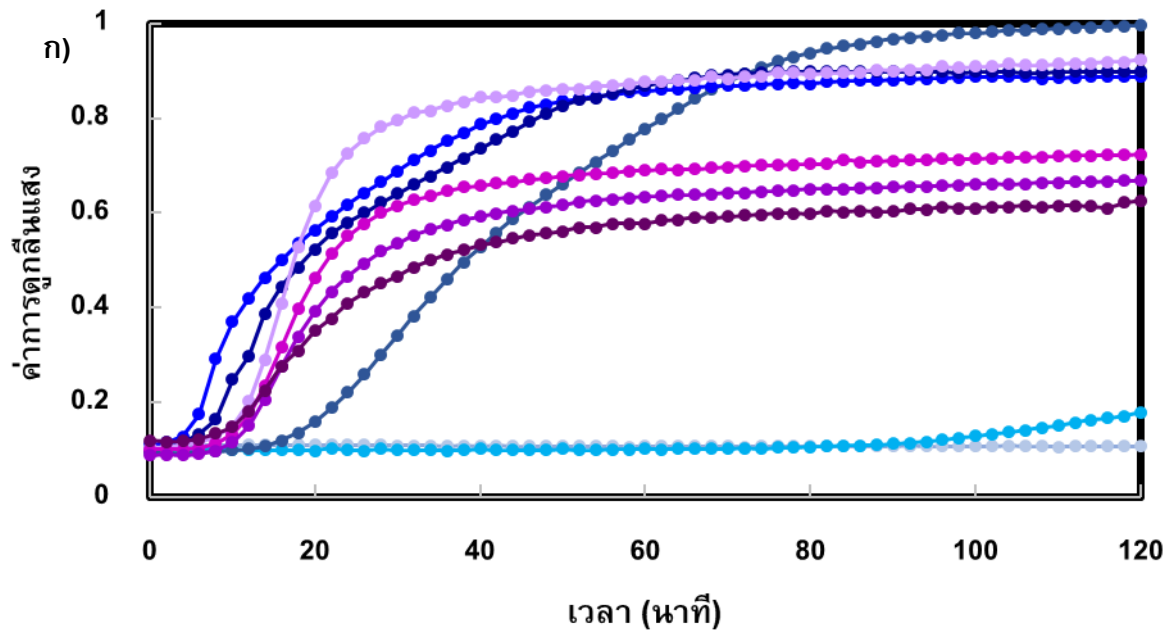
ความเข้มข้น SF (%โดยน้ำหนัก)	ความเข้มข้น STS (%โดยน้ำหนัก)	ระยะเวลาการเกิด เจล (นาที)
1.5%	-	N/A
	0.01%	N/A
	0.03%	95
	0.04%	50
	0.06%	25
	0.07%	25
	0.09%	20
	0.10%	20
	0.12%	30
2%	-	N/A
	0.01%	N/A
	0.03%	N/A
	0.04%	40
	0.06%	30
	0.07%	25
	0.09%	25
	0.10%	30
	0.12%	40

*N/A = เกิดเจลไม่สมบูรณ์ในระยะเวลา 120 นาที

3 อิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ ต่อระยะเวลาและกลไกการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย ณ อุณหภูมิ 37 °C, pH 7.4

ในการทดลองนี้ ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ต่อระยะเวลาและกลไกการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.4 โดยวิเคราะห์ระยะเวลาการเกิดเจลจากการวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยทุกสูตรที่เติม SDS และ STS ค่อยๆเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ส่งผลให้กราฟที่ได้มีลักษณะชันขึ้น จนกระทั่งถึง ณ เวลาหนึ่งๆ ค่าการดูดกลืนแสงจะค่อยๆคงที่ ดังภาพที่ 2 การเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงนี้ แสดงให้เห็นถึงค่าความขุ่นที่เพิ่มขึ้นเมื่อสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเปลี่ยนแปลงไปเป็นเจล ระยะเวลาการเกิดเจลสามารถวิเคราะห์ได้จากการหาค่า half-maximum value ของการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสง ดังแสดงผลในตารางที่ 5 จากผลการทดลองพบว่า SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.09-0.45% โดยน้ำหนักสามารถกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้ภายในช่วงเวลา 14-42 นาที ในขณะที่ SOS ใช้เวลา 113-144 ชั่วโมงในการกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย ระยะเวลาการเกิดเจลขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ เมื่อพิจารณาชนิดของสารลดแรงตึงผิว โครงสร้างโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิดแตกต่างกันที่ความยาวของสายโซ่อัลคิล ซึ่งเป็นส่วนไม่ชอบน้ำของโมเลกุล (hydrophobic domain) ซึ่งน่าจะเป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย โดยพบว่า SOS ซึ่งมีความยาวของสายโซ่อัลคิลสั้นที่สุด ใช้เวลาในการกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยนานกว่า SDS และ STS ซึ่งมีความยาวของสายโซ่อัลคิลยาวกว่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งสามารถอธิบายเพิ่มเติมได้ว่าความยาวของสายโซ่อัลคิลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบมีผลกระทบต่อการเกิดเจล เพราะเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยชักนำให้เกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมด้วยตัวเอง ผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) (Ji Hun P., 2012) อีกทั้งสายโซ่อัลคิลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบยังสามารถที่จะเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) กับโมเลกุลของไฟโบรอินไหมได้อีกด้วย (X. Wu et al, 2012)

เมื่อพิจารณาผลกระทบของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ พบว่า SDS ที่ความเข้มข้น 0.15% โดยน้ำหนัก กระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้เร็วที่สุดในเวลา 14 นาที และ STS ที่ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก กระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้เร็วที่สุดในเวลา 20 นาที ในขณะที่ SDS และ STS ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปจะชะลอการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากการเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ จะไปเพิ่มปริมาณประจุลบให้มีมากเกินไปจนเกิดแรงผลักทางไฟฟ้า (repulsive force) ระหว่างโมเลกุลประจุลบของไฟโบรอินไหมไทยกับโมเลกุลประจุลบของสารลดแรงตึงผิว ทำให้ชะลอการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมได้ (X. Wu et al, 2012)



ภาพที่ 2 ค่าการดูดกลืนแสงของสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดย น้ำหนักและสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ ก) SDS ข) STS ในสารละลายบัฟเฟอร์ HEPES (pH 7.4) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (— 0%, — 0.03, — 0.09, — 0.15, — 0.21, — 0.27, — 0.33, — 0.39, — 0.45) วิเคราะห์ด้วยเทคนิค spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 cm^{-1} อุณหภูมิ 37°C ใน ระยะเวลา 120 นาที

ตารางที่ 5 ระยะเวลาการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย เมื่อผสมสารละลายไฟโบรอินไหมไทย (SF) ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ความเข้มข้น 0.03-0.045% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.4

ความเข้มข้น สารละลายไฟโบรอิน ไหมไทย (SF, % โดยน้ำหนัก)	ความเข้มข้นสารลดแรง ตึงผิวประเภทประจุลบ (% โดยน้ำหนัก)	ระยะเวลาการเกิดเจล (นาที)		
		SOS*	SDS**	STS**
2%	-	-	-	-
	0.03%	~144 ชม	N/A***	N/A***
	0.09%	~135 ชม	42	20
	0.15%	~128 ชม	14	30
	0.21%	~127 ชม	18	28
	0.27%	~113 ชม	18	24
	0.33%	~119 ชม	20	30
	0.39%	~119 ชม	20	30
	0.45%	~121 ชม	24	30

*SOS ระยะเวลาการเกิดเจล วิเคราะห์ด้วยการสังเกตด้วยตา

**SDS, STS ระยะเวลาการเกิดเจล วิเคราะห์ด้วยเทคนิค spectrophotometer

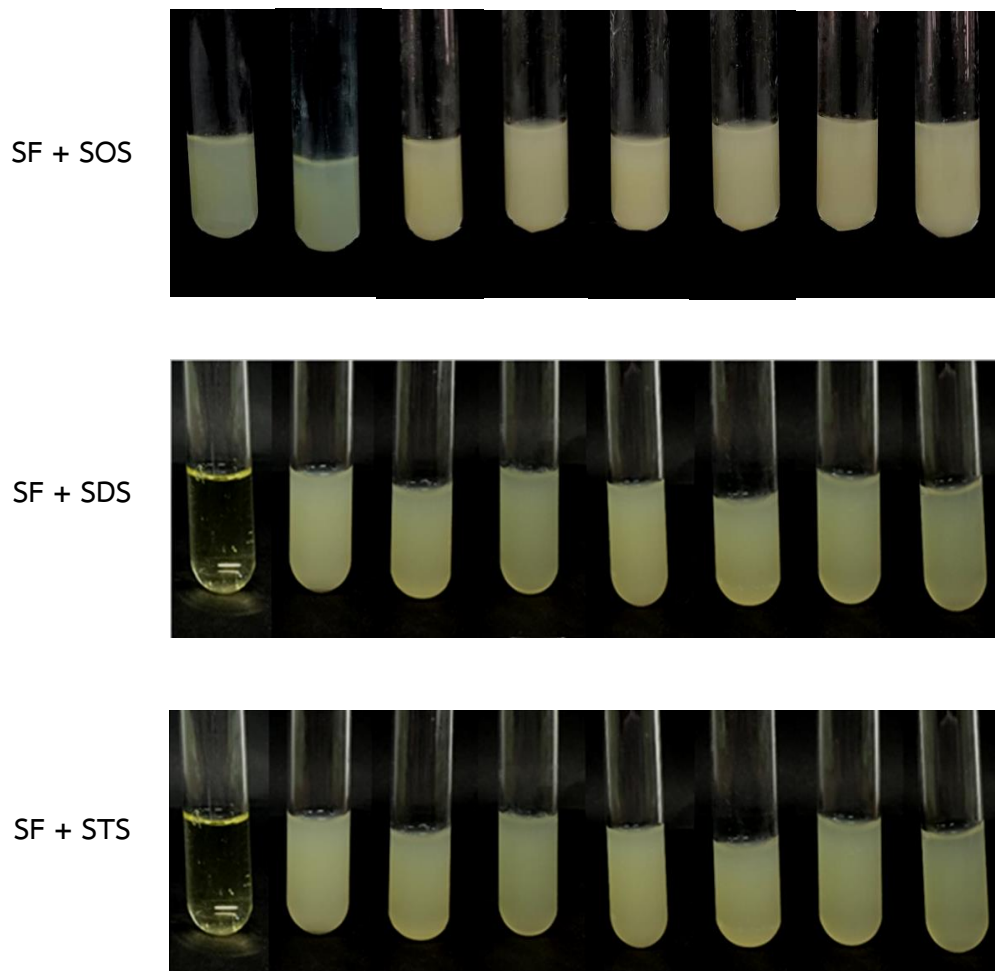
***N/A = เกิดเจลไม่สมบูรณ์ในระยะเวลา 120 นาที เมื่อตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิค spectrophotometer

4. ลักษณะทางกายภาพและโครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยกับสารลดแรงตึงผิวประจุลบชนิดต่างๆ

ลักษณะทางกายภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.21, 0.27, 0.33, 0.39, 0.45% โดยน้ำหนัก ณ อุณหภูมิ 37 °C, pH 7.4 แสดงดังภาพที่ 3 (ภาพแสดงลักษณะของไฮโดรเจลหลังเกิดการเจล โดยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติม SDS และ STS สังเกตที่เวลา 120 นาที ในขณะที่ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติม SOS สังเกตที่เวลาประมาณ 113-144 ชั่วโมง) พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ได้จะมีลักษณะคล้ายวุ้น สีขุ่น มีน้ำเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก เมื่อทดสอบด้วยการพลิกกลับด้านจะไม่ไหล (Vial

test) ใน 30 วินาที (Kim U.J. et al, 2004) และยังสังเกตได้ว่าระดับความขุ่นของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยแต่ละสูตร มีความแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่เติม

ชนิดของ	ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (% โดยน้ำหนัก)							
ไฮโดรเจล	0.03	0.09	0.15	0.21	0.27	0.33	0.39	0.45

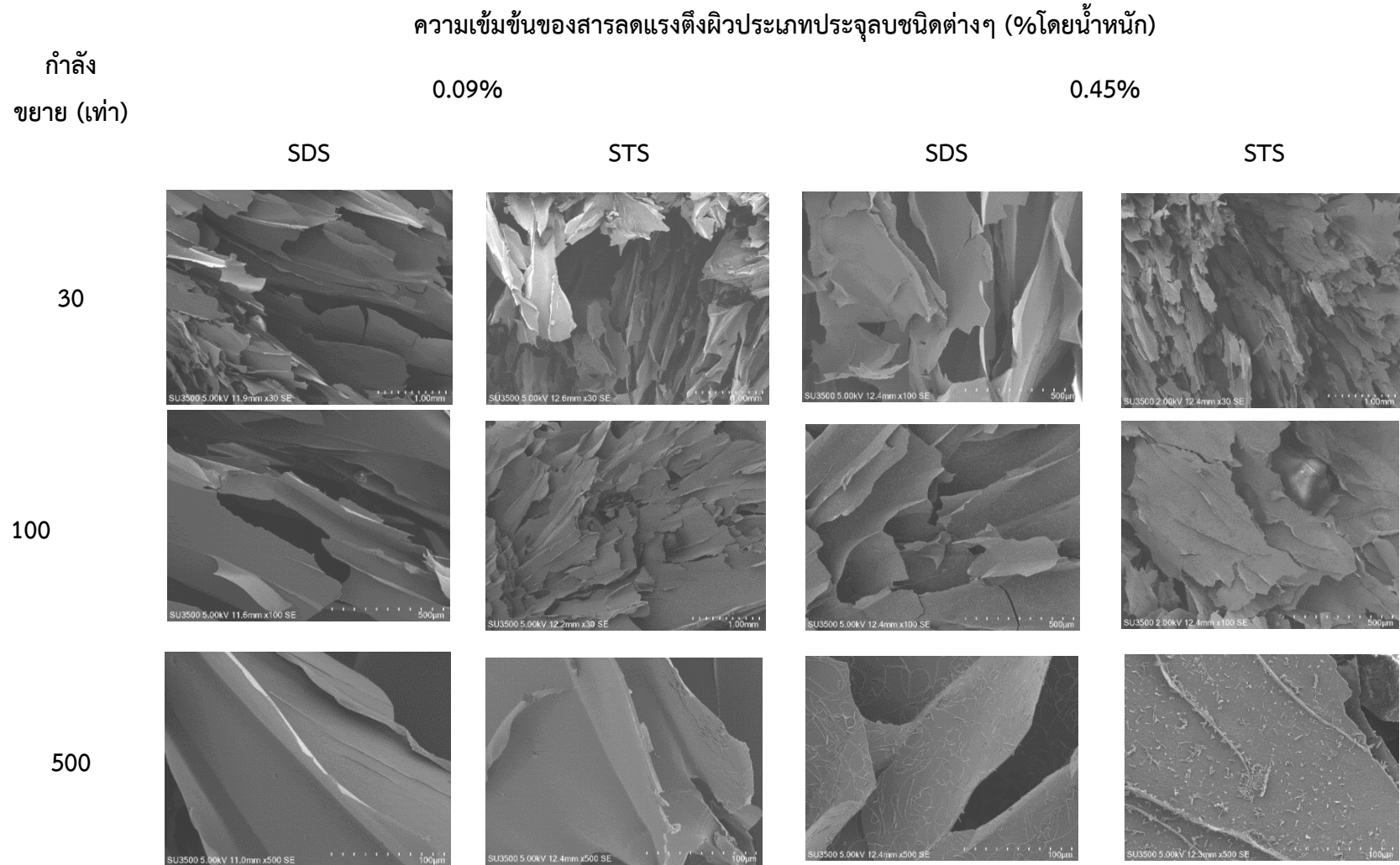


ภาพที่ 3 ลักษณะทางกายภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.21, 0.27, 0.33, 0.39, 0.45% โดยน้ำหนัก ณ อุณหภูมิ 37 C°, pH 7.4

โครงสร้างสัณฐานภายในไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF) ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.09, 0.45% โดยน้ำหนัก แสดงดังภาพที่ 4 พบว่า โครงสร้างภายในไฮโดรเจลมีลักษณะคล้ายกับผนัง (wall-like structure) จำนวนมากและเชื่อมโยงกันเป็นโครงข่าย ไม่พบความแตกต่างระหว่างไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SDS และ STS แต่หากพิจารณาที่

ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่เติม พบว่า ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติม SDS และ STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีผนังเรียบ เป็นเนื้อเดียว ในขณะที่ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นการเติม SDS และ STS ความเข้มข้น 0.45% โดยน้ำหนัก ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ มีผนังไม่เรียบ เกิดเส้นใยหรือตะกอนบนพื้นผิวผนังของไฮโดรเจล ซึ่งจะเห็นได้ชัดที่กำลังขยาย 500 เท่า เส้นใยหรือตะกอนนี้อาจเป็นผลจากการเกิดแรงผลักทางไฟฟ้า (repulsive force) ระหว่างโมเลกุลประจุลบของไฟโบรอินไหมไทยกับโมเลกุลประจุลบของสารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้นสูงๆ ทำให้โมเลกุลบางส่วนของไฟโบรอินไหมไทยเกิดการตกตะกอนแยกออกมา (Ung-Jin K. et al, 2004; Akira M. et al, 2006)

C. Deng และคณะ ในปี 2013 ได้กล่าวถึงลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวว่า มีลักษณะโครงสร้างรูพรุนที่มีผนังขนาดใหญ่ (macropore wall) รูปร่างเป็นแผ่นที่แยกออกจากกัน (separate lamellar structures) ขนาดประมาณ 20-100 nm ซึ่งคล้ายเส้นใย extracellular matrix (ECM) ที่พบในสิ่งมีชีวิต นอกจากนี้งานวิจัยของ Ji Hun P. และคณะ ในปี 2012 ได้อธิบายไว้ว่า ลักษณะโครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวมีลักษณะคล้ายใบไม้ (leaf-like morphologies) และมีรูพรุนเชื่อมต่อกัน (interconnected pores) โดยขนาดของรูพรุนของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวจะมีขนาดใหญ่กว่ารูพรุนของไฟโบรอินไหมไทยที่เจลตามธรรมชาติ



ภาพที่ 4 โครงสร้างพื้นฐานของไฮโดรไฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.09, 0.45% โดยน้ำหนัก ถ่ายภาพที่กำลังขยายต่างๆ วิเคราะห์โดยเทคนิค Scanning electron microscope (SEM)

5 ค่าศักย์เซต้า (zeta potential) ของสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

เนื่องจากประจุลบของสารลดแรงตึงผิวอาจมีผลกระทบต่อกลไกการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาค่าศักย์เซต้า (zeta potential) ของสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักและสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.4 ดังแสดงผลในตารางที่ 6 สารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ยังไม่ได้ผสมกับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ มีค่าศักย์เซต้าเป็นลบ เท่ากับ -2.98 ± 0.31 mV และหลังจากผสมกับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิดจะส่งผลให้ค่าศักย์เซต้าเป็นลบมากขึ้น และมีค่าอยู่ในช่วงระหว่าง -4 ถึง -25 mV ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ โดยสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและ STS จะแสดงค่าศักย์เซต้าเป็นลบมากที่สุด (-9 ถึง -25 mV) รองลงมาคือ สารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและ SDS (-7 ถึง -24 mV) และสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและ SOS แสดงค่าศักย์เซต้าเป็นลบน้อยที่สุด (~ -4 mV) ตามลำดับ และพบว่าในกรณีของ SDS และ STS ค่าศักย์เซต้าของสารผสมเป็นลบมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่เพิ่มขึ้น โดยสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและ SDS หรือ STS ที่ความเข้มข้น 0.15-0.45% โดยน้ำหนัก มีค่าศักย์เซต้าของสูงกว่าสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยและ SDS หรือ STS ที่ความเข้มข้น 0.03% โดยน้ำหนัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นของ SDS และ STS ช่วงหนึ่งๆ ค่าศักย์เซต้าของสารผสมมีค่าเป็นลบสูงขึ้นอย่างชัดเจน ยกตัวอย่าง SDS ที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.09-0.15% โดยน้ำหนัก ค่าศักย์เซต้าของสารผสมเป็นลบมากขึ้นจาก -7.9 เป็น -22.90 mV เป็นต้น ซึ่งช่วงความเข้มข้นของ SDS และ STS ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงค่าศักย์เซต้าของสารผสมอย่างมากระหว่างนี้ ค่อนข้างใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 2 ชนิดที่กระตุ้นการเกิดเจลได้เร็วที่สุด (ตารางที่ 5) ผลค่าศักย์เซต้าของสารผสมนี้น่าจะแสดงถึงอิทธิพลของประจุลบต่อระยะเวลาในการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้ กล่าวคือ สารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ผสมกับ SDS ความเข้มข้น 0.15% โดยน้ำหนัก หรือ STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก อาจจะเป็นจุดที่เกิดสมดุลระหว่างอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ภายในโมเลกุลของสารผสม ทำให้สารละลายไฟโบรอินไหมไทยเกิดเจลได้เร็วที่สุด ในขณะที่เมื่อความเข้มข้นของ SDS และ STS มีค่าสูงกว่านี้ อาจส่งผลให้มีประจุลบภายในระบบมากขึ้น และเกิดแรงผลักของอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต ซึ่งชะลอการเกิดเจลได้ นอกจากนี้ ผลจากศักย์เซต้าที่เป็นลบมากของ STS ทำให้เกิดแรงผลักทางไฟฟ้าระหว่างโมเลกุลในสารผสมมากกว่ากรณีของ SDS ที่มีประจุลบน้อยกว่า จึงทำให้การเกิดเจลช้ากว่าเมื่อกระตุ้นด้วย SDS ที่ความเข้มข้นเดียวกัน เช่น สารลดแรงตึงผิวที่มีความเข้มข้น 0.33% โดยน้ำหนัก สารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย SDS เกิดเจลที่เวลา 20 นาที ในขณะที่ สารละลายไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS เกิดเจลที่เวลา 30 นาที เป็นต้น

จากงานวิจัยของ X. Wu และคณะ ในปี 2012 ได้ศึกษาค่าศักย์เซต้าของสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินใหม่ความเข้มข้น 4% โดยน้ำหนัก และสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิด SDS ความเข้มข้น 2-24 mM พบว่า ศักย์เซต้าของสารละลายผสมในช่วงความเข้มข้นของ SDS ระหว่าง 2-12 mM มีค่าอยู่ในช่วง -1.53 ถึง -1.43 mV และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสาร SDS ให้มากกว่า 12 mM ค่าศักย์เซต้าของสารผสมจะเป็นลบมากขึ้นอย่างชัดเจน นับว่าจุดเปลี่ยนอย่างฉับพลัน (turning point) ของระบบ ซึ่งเป็นจุดที่ทำให้โมเลกุลภายในของไฟโบรอินเกิดการแรงผลักทางไฟฟ้าขึ้น ดังนั้นที่ความเข้มข้นของ SDS สูงกว่านี้ การเกิดเจลไฟโบรอินใหม่จะช้าลง ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบในงานวิจัยนี้ ที่พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบให้มากเกินไปจนกว่าจุดที่เกิดสมดุลระหว่างอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ภายในโมเลกุลของสารผสม หรือจุดที่เกิดเจลเร็วที่สุด ประจุลบที่เพิ่มมากขึ้น สามารถชะลอระยะเวลาการเกิดเจลได้

ตารางที่ 6 ค่าศักย์เซต้าของสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทย (SF) ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนักและสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.4

สารละลายไฟโบรอินใหม่ไทย (SF)	ชนิดของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ	ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (% โดยน้ำหนัก)				
		0	0.03	0.09	0.15	0.45
2%	SOS		-4.71±0.39	-4.89±0.32	-4.92±0.06	-4.61±0.30
	SDS	-2.98±0.31	-7.56±0.76	-7.90±1.13	-22.90±7.65*	-24.93±1.10*
	STS		-9.54±0.63	-18.13±7.38	-24.40±3.24*	-25.20±1.73*

(* = ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%, $p < 0.05$)

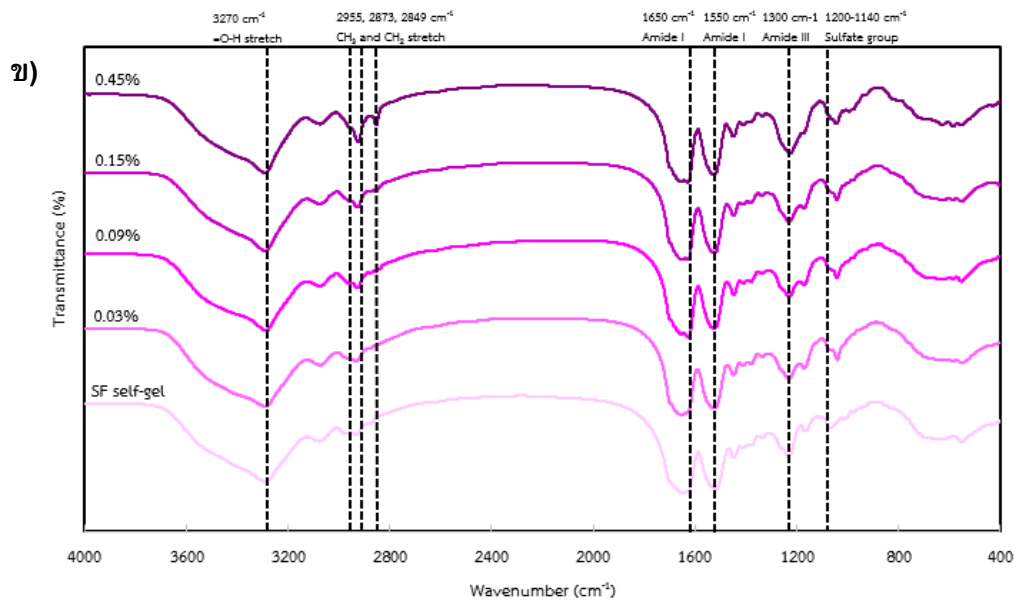
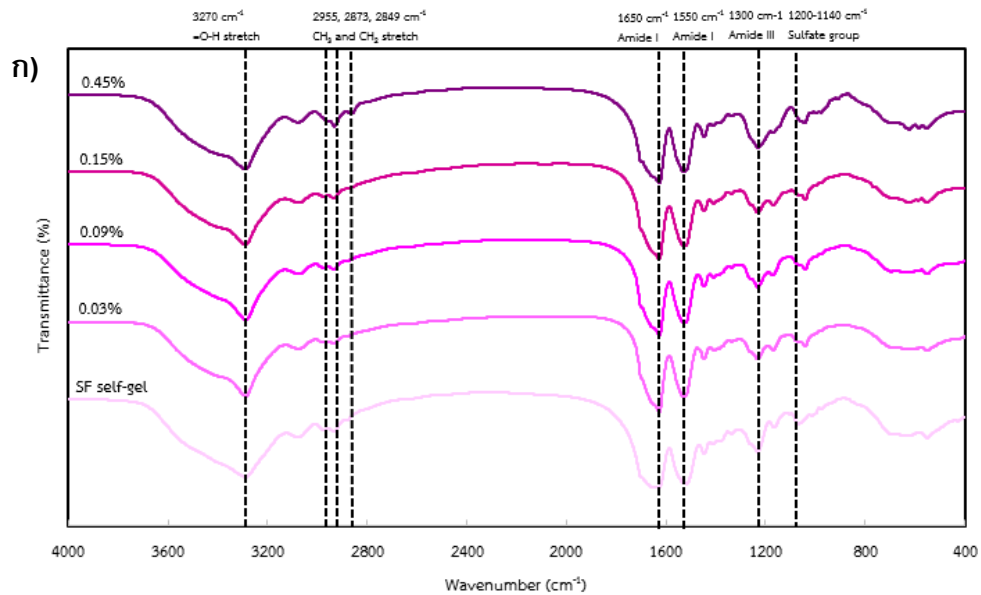
6 โครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยกับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

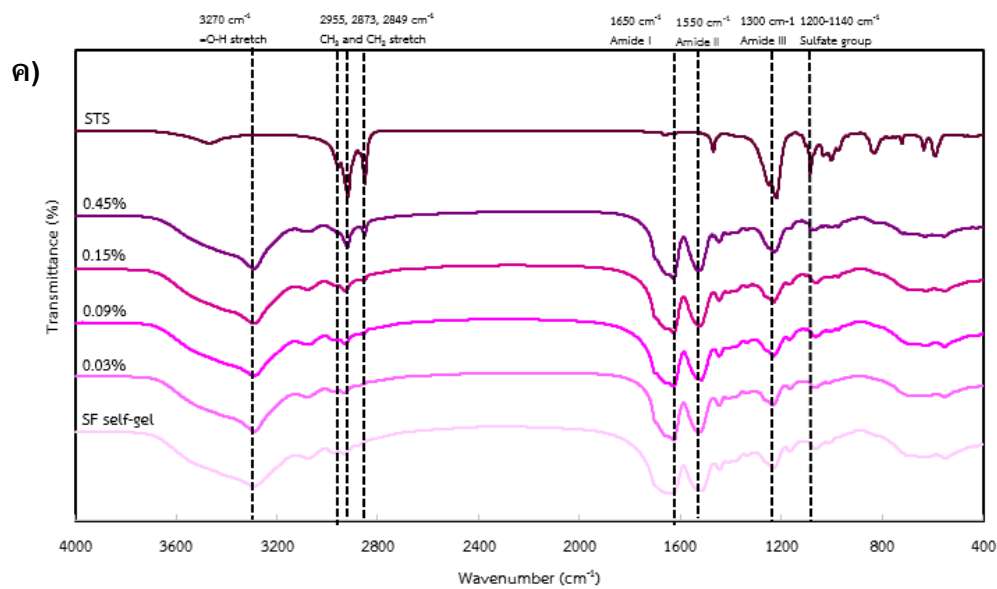
สารละลายไฟโบรอินใหม่ไทยที่ถูกเตรียมด้วยการทำลายพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลมีโครงสร้างทุติยภูมิแบบ random coil เมื่อถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ จะเกิดเป็นเจลที่มีโครงสร้างทุติยภูมิเปลี่ยนแปลงเป็นแบบ β sheet ที่เรียงตัวกันเป็นระเบียบแข็งแรงมากขึ้น โครงสร้างทางเคมีของไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยนี้สามารถตรวจวิเคราะห์ได้โดยใช้เทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโตรสโกปี (FT-IR spectroscopy) โดยเปรียบเทียบกับโครงสร้างไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยที่เจลตามธรรมชาติ (self-gelled SF) ภาพที่ 5 แสดงสเปกตรัมของไฮโดรเจลไฟโบรอินใหม่ไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก ที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดย

น้ำหนัก พบว่าสเปกตรัมของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยทุกสูตรแสดงพีคที่จำเพาะของโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน ได้แก่ amide I, II, และ III ที่เลขคลื่น 1650, 1550 และ 1300 cm^{-1} ตามลำดับ (Hu, X., Kaplan, D., Cebe, P, 2008) และแสดงพีคจำเพาะของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ ได้แก่ หมู่อัลคิล CH_3 และ CH_2 ที่เลขคลื่น 2955, 2873, 2849 cm^{-1} และหมู่ซัลเฟต (sulfate group) ที่เลขคลื่น 1200-1140 cm^{-1} (Rommel B. V. et al, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ จะทำให้เกิดพีคของหมู่อัลคิลที่เด่นชัดขึ้น เนื่องจากพีค Amide I ซึ่งเป็นพีคหลักที่ใช้ในการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน มีลักษณะกว้าง จึงไม่สามารถศึกษาโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนได้อย่างละเอียด ต้องใช้โมเดลทางคณิตศาสตร์ Fourier self-deconvolution (FSD) ใช้ในการวิเคราะห์ร่วมด้วย โดยพีคที่เกิดขึ้นในช่วงความยาวคลื่นต่างๆ สามารถที่จะจำแนกชนิดของโครงสร้างทุติยภูมิของไฟโบรอินไหมไทย ได้แก่ โครงสร้าง β sheet (1590-1605, 1697-1700 cm^{-1}), tyrosine (1590-1605 cm^{-1}), random coil (1638-1653 cm^{-1}), alpha helix (1654-1659 cm^{-1}) และ β turn (1660-1696 cm^{-1}) (Lu. Q et al, 2010) ตารางที่ 7 แสดงร้อยละของโครงสร้างทุติยภูมิของไฮโดรไฟโบรอินไหมไทย (SF) ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก จากการศึกษาพบว่าโครงสร้างทุติยภูมิที่พบมากที่สุดในไฟโบรอินไหมไทยที่เจลตามธรรมชาติ คือ โครงสร้าง β sheet พบประมาณ 33.17% ส่วนโครงสร้างอื่นๆ ได้แก่ tyrosine, random coil, alpha helix และ β turn จะพบ 3.86, 9.00, 9.31 และ 24.59% ตามลำดับ ในขณะที่ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบพบว่า มีร้อยละของโครงสร้าง β sheet เพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 35-49% ขึ้นกับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิดมีแนวโน้มที่จะกระตุ้นการเกิดไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่มีโครงสร้าง β sheet มากขึ้นกว่ากรณีไฟโบรอินไหมไทยที่เจลตามธรรมชาติ (Akira M. et al, 2006) เป็นที่น่าสังเกตว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ STS ที่ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีร้อยละโครงสร้าง β sheet มากที่สุด คือ 49.15% ซึ่งน่าจะแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมไทยด้วยกันเอง รวมถึงการเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำระหว่างโมเลกุลไฟโบรอินไหมไทยกับสายโซ่อัลคิลของ STS ภายในไฮโดรเจลชนิดนี้

งานวิจัยของ Ji Hun P. และคณะ ในปี 2012 ได้อธิบายถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมจาก random coil เป็น β sheet จากการปรากฏของพีคที่เลขคลื่น 1631 cm^{-1} หลังจากกระตุ้นการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุที่เวลา 15 ชั่วโมง โดยอธิบายไว้ว่า ในสารละลายไฟโบรอินไหมมีน้ำเป็นส่วนประกอบเป็นจำนวนมาก เมื่อเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุลงไป จะเกิดการดึงน้ำออก (dehydration) จากโครงสร้าง

ไฟโบรอินไหม และเพิ่มโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหม ส่งผลให้สารละลายไฟโบรอินไหมเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิให้เสถียรขึ้นคือโครงสร้าง β sheet และเกิดการฟอร์มเจล





ภาพที่ 5 สเปกตรัมของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (ก) SOS (ข) SDS และ (ค) STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก วิเคราะห์โดยใช้เทคนิค FT-IR spectroscopy

ตารางที่ 7 ร้อยละของโครงสร้างทุติยภูมิของไฮโดรโฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฮโดรโฟโบรอินไหมไทย ความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก วิเคราะห์โดยเทคนิค Fourier self-deconvolution (FSD) จากพีค Amide I (เลขคลื่น 1650 cm^{-1}) ของสเปกตรัมของไฮโดรเจลโฟโบรอินไหมไทย

เลขคลื่น (cm^{-1})	โครงสร้างทุติยภูมิ	ร้อยละของโครงสร้างทุติยภูมิ (%)												
		ไฮโดรโฟโบรอินไหมไทยที่เจลตามธรรมชาติ	ไฮโดรเจลโฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ											
			ความเข้มข้นของ SOS (%โดยน้ำหนัก)				ความเข้มข้นของ SDS (%โดยน้ำหนัก)				ความเข้มข้นของ STS (%โดยน้ำหนัก)			
			0.03	0.09	0.15	0.45	0.03	0.09	0.15	0.45	0.03	0.09	0.15	0.45
1590-1605	tyrosine	3.86	2.13	1.11	1.61	0.60	6.46	3.69	1.92	3.15	5.26	1.00	7.52	6.10
1608-1637 1697-1700	β sheet	33.17	36.78	38.17	36.72	38.11	36.95	37.06	39.32	35.57	35.54	49.15	38.66	39.05
1638-1653	random coil	9.00	11.27	10.37	10.47	9.57	21.16	20.40	10.20	12.55	13.23	10.67	9.27	9.25
1654-1662	alpha helix	9.31	10.44	25.56	15.97	19.88	0.57	12.61	20.03	17.88	20.28	11.13	19.21	19.73
1663-1696	beta turn	24.59	39.38	24.78	35.22	31.83	34.85	26.24	28.53	30.85	22.36	24.11	25.34	25.88

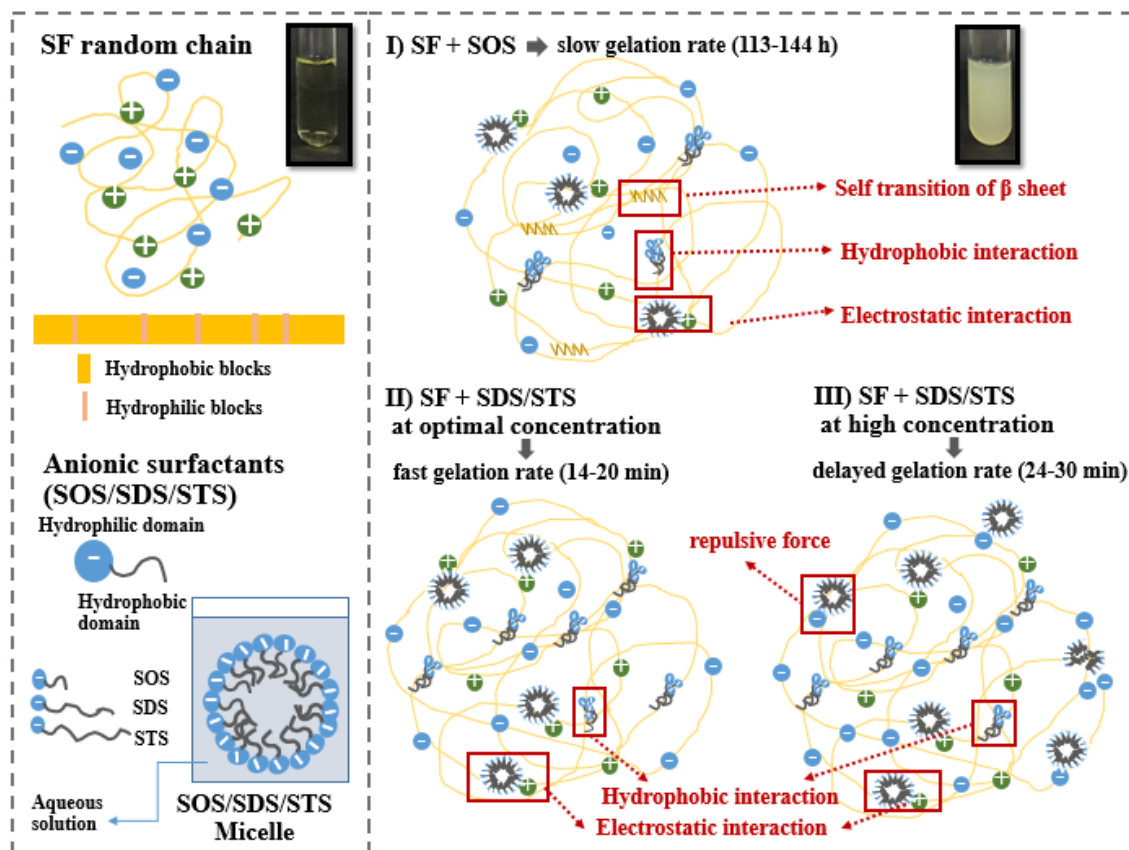
จากผลการทดลองข้างต้น สามารถที่จะอธิบายถึงกลไกการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมไทยที่เติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS, SDS และ STS ได้ดังภาพที่ 6 ไฟโบรอินไหมไทยที่อยู่ในสภาวะสารละลาย โครงสร้างภายในสายโซ่ประกอบด้วยส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic domain) ในสัดส่วนที่มากกว่าส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic domain) สายโซ่โมเลกุลเกี่ยวพันกันเป็นโครงข่ายที่ไม่เป็นระเบียบ โดยโครงสร้างทุติยภูมิที่พบมากที่สุด คือโครงสร้างแบบ random coil ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบเมื่อละลายในน้ำที่ความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นวิกฤต จะเกิดการจัดเรียงตัวเป็นไมเซลล์ (micelle) โดยหมู่ซัลเฟต (SO_4) เป็นส่วนที่ชอบน้ำหรือส่วนหัว จะหันออกสัมผัสกับน้ำโดยรอบ และสายโซ่อัลคิลซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำหรือส่วนหางของโมเลกุลจะหันเข้าด้านในโครงสร้าง เมื่อผสมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิดที่มีความยาวสายโซ่อัลคิลและประจุแตกต่างกัน ด้วยความเข้มข้นต่างๆ กับสารละลายไฟโบรอินไหมไทย คาดว่าจะเกิดปรากฏการณ์กระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทย โดยแบ่งได้เป็น 3 กรณี ดังต่อไปนี้

1) เมื่อผสมสารลดแรงตึงผิว SOS ที่มีสายโซ่อัลคิลสั้นและมีประจุลบน้อยที่สุด กับสารละลายไฟโบรอินไหมไทย การกระตุ้นการเกิดเจลจะเกิดขึ้นอย่างช้าๆ ระยะเวลาการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมไทยอยู่ในช่วงประมาณ 113-144 ชั่วโมง การเกิดเจลในกรณีนี้สามารถอธิบายได้จาก 3 กลไก ได้แก่ (1) การเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมกับสายโซ่อัลคิลของ SOS ซึ่งกระตุ้นให้โครงสร้างทุติยภูมิของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างแบบ random coil เป็นโครงสร้างแบบ β sheet (2) การเกิดอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ระหว่างประจุลบของหมู่ซัลเฟตของ SOS กับโมเลกุลประจุบวกของสายโซ่ไฟโบรอินไหมไทย และ (3) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยจากโครงสร้างแบบ random coil เป็นโครงสร้างแบบ β sheet ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (self-transition of β sheet) และเนื่องจากความยาวสายโซ่อัลคิลและประจุลบของ SOS น้อยกว่า SDS และ STS จึงมีโอกาสดังกลไกที่ 1 และ 2 ได้น้อย ทำให้สารละลายไฟโบรอินไหมไทยเกิดเป็นเจลขึ้นอย่างช้าๆ ใช้ระยะเวลาการเกิดเจลนานถึง 113-144 ชั่วโมง จึงมีโอกาสดังกลไกที่ 3 รวมได้

2) เมื่อผสมสารลดแรงตึงผิว SDS หรือ STS ที่มีสายโซ่อัลคิลยาวกว่าและมีประจุลบมากกว่า SOS ด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมกับสารละลายไฟโบรอินไหมไทย การกระตุ้นการเกิดเจลจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ระยะเวลาการเกิดเจลจะอยู่ในช่วงประมาณ 14-20 นาที การเกิดเจลในกรณีนี้สามารถอธิบายได้จาก 2 กลไก ได้แก่ (1) การเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมกับสายโซ่อัลคิลของ SOS ซึ่งกระตุ้นให้โครงสร้างทุติยภูมิของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างแบบ random coil เป็นโครงสร้างแบบ β sheet (2) การเกิดอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ระหว่างประจุลบของหมู่ซัลเฟตของ SOS กับโมเลกุลประจุบวกของสายโซ่ไฟโบรอินไหมไทย และเนื่องจากความยาวสายโซ่อัลคิลและประจุลบของ SDS และ STS มากกว่า SOS จึงมีโอกาสดังกลไกที่ 1 และ 2 ได้

มากกว่ากรณีของ SOS ทำให้เกิดการกระตุ้นสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเกิดเป็นเจลขึ้นอย่างรวดเร็ว จนไม่น่าจะพบ Self-transition of β sheet ตามธรรมชาติเกิดร่วม

3) เมื่อผสมสารลดแรงตึงผิว SDS หรือ STS ที่มีสายโซ่อัลคิลยาวกว่าและมีประจุลบมากกว่า SOS ด้วยความเข้มข้นที่สูงเกินไป กับสารละลายไฟโบรอินไหมไทย การกระตุ้นการเกิดเจลจะเกิดขึ้นภายใน 24-30 นาที ซึ่งล่าช้ากว่าการเกิดเจลในกรณีที่ 2 การเกิดเจลในกรณีนี้สามารถอธิบายได้จาก 2 กลไกเช่นเดียวกับในกรณีที่ 2 แต่ความเข้มข้นของ SDS และ STS ที่เพิ่มขึ้นจะไปทำให้ประจุลบมากขึ้นจนอาจเกิดแรงผลัทางไฟฟ้า (repulsive force) กับโมเลกุลประจุลบของไฟโบรอินไหมไทย และชะลอการเกิดเจลได้



ภาพที่ 6 กลไกการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมไทยที่ผสมกับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS, SDS, STS

งานวิจัยของ X. Wu และคณะ ในปี 2012 ได้อธิบายกลไกการเกิดเจลของไฟโบรอินด้วยการกระตุ้นจากสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบไว้ว่า เมื่อสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบละลายในน้ำ จะเกิดการจัดเรียงตัวให้มีรูปร่างแบบไมเซลล์ (micelle) โดยสายโซ่อัลคิลภายในโมเลกุลเป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic domain) และหมู่ซัลเฟต (SO_4) เป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic domain) ซึ่งส่วนซัลเฟต (SO_4) ที่ชอบน้ำนี้จะช่วยดึงน้ำออกจากโมเลกุลของไฟโบรอินไหม ทำให้ไปเพิ่มสมบัติความไม่ชอบน้ำของโมเลกุลของไฟโบรอินไหมให้มากยิ่งขึ้น จึงสนับสนุนการเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่

ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมให้มากขึ้นด้วย อีกทั้ง ส่วนที่ไม่ชอบน้ำของโมเลกุลไฟโบรอินไหมยังสามารถเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) กับสายโซ่อัลคิลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ กระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิจาก random coil เป็น β sheet ซึ่งทำให้โครงสร้างมีการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากยิ่งขึ้น

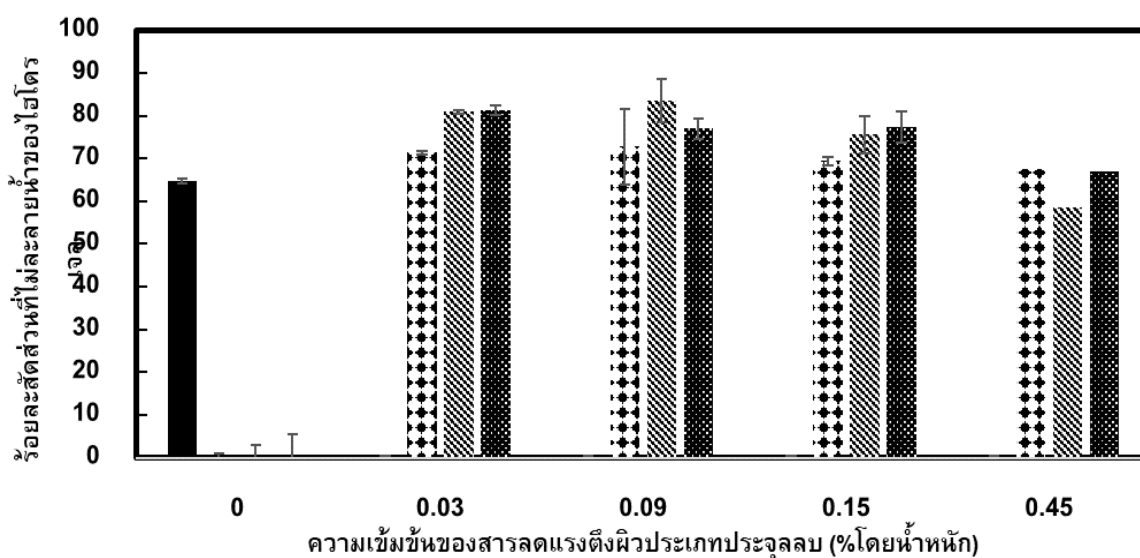
นอกจากนี้งานวิจัยของ Ji Hun P. และคณะ ในปี 2012 ได้อธิบายถึงผลของสารลดแรงตึงผิวประเภทต่างๆ ได้แก่ สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (anionic surfactant) สารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุ (non-ionic surfactants) และสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุบวก (cationic surfactants) ต่อการกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหม พบว่ากลไกที่ทำให้สารละลายไฟโบรอินไหมเกิดเจล เกิดจากการที่สารลดแรงตึงผิวไปทำให้เกิดการดึงน้ำ (dehydration) ออกจากสายโซ่ของไฟโบรอินไหม ส่งผลให้เกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ภายในโมเลกุลมากขึ้น ไฟโบรอินไหมจึงเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิจาก random coil เป็น β -sheet โดยพบว่าสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบสามารถกระตุ้นการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมได้เร็วกว่ากว่าสารลดแรงตึงผิวประเภทไม่มีประจุถึง 10 เท่า ในขณะที่สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุบวก ทำให้ไฟโบรอินไหมตกตะกอนแยกชั้นออกมาโดยไม่เกิดเป็นเจล เนื่องจากเกิดอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ที่แข็งแรงระหว่างประจุบวกของสารลดแรงตึงกับประจุลบของสายโซ่ไฟโบรอินไหม

งานวิจัยของ C. Deng และคณะ ในปี 2013 ได้ศึกษาผลของสารลดแรงตึงผิวประเภทต่างๆ ในการกระตุ้นให้สารละลายไฟโบรอินไหมเกิดเจล พบว่า สารลดแรงตึงผิวสามารถเร่งระยะเวลาการเกิดเจลของไฟโบรอินไหมให้เร็วขึ้นเมื่อเทียบกับการปล่อยให้เกิดเจลตามธรรมชาติ โดยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบสามารถเร่งการเกิดเจลของสารละลายไฟโบรอินไหมได้เร็วที่สุด โดยที่การเกิดเจลของไฟโบรอินไหมเป็นผลจากการจัดเรียงตัวที่เป็นระเบียบมากขึ้นของโมเลกุลภายใน (crystalline structure)

งานวิจัยของ Akira M. และคณะในปี 2006 รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงสถานะของสารละลายไฟโบรอินเป็นไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม เป็นผลจากการอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction), พันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) และอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ภายในโมเลกุลของไฟโบรอิน ส่งผลให้โมเลกุลเริ่มเข้าสู่เสถียรภาพ เกิดโครงสร้างทุติยภูมิแบบ β -sheet มากขึ้น และโครงสร้างทุติยภูมิแบบ random coil ลดลง ทำให้มีโครงสร้างมีความแข็งแรงขึ้น การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะเป็นแบบผันกลับไม่ได้ (irreversible) ซึ่งอัตราเร็วของการเกิดเจล ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายไฟโบรอิน และสารเคมีเติมแต่งเพื่อกระตุ้นการเกิดเจล

7 สัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (gel fraction) ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยกับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์สัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำของไฮโดรเจล จะบ่งบอกถึงความสามารถในการเกิดพันธะหรือเกิดโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำภายในไฮโดรเจล ภาพที่ 7 แสดงร้อยละสัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SOS SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.03, 0.09, 0.15, และ 0.45% โดยน้ำหนัก พบว่า ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่เจลาตามธรรมชาติมีสัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำ $64.79 \pm 0.55\%$ ในขณะที่ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยกับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ มีสัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำอยู่ในช่วงตั้งแต่ 58.41 ± 4.44 ถึง $83.53 \pm 0.52\%$ ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ โดยภาพรวม การเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบมีแนวโน้มเพิ่มสัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย ซึ่งค่อนข้างสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์โครงสร้างทุติยภูมิของไฮโดรเจลในหัวข้อ 4.4 ที่พบว่าการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิดมีแนวโน้มที่จะกระตุ้นการเกิดไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่มีโครงสร้าง β sheet มากขึ้น ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ไม่ละลายน้ำ

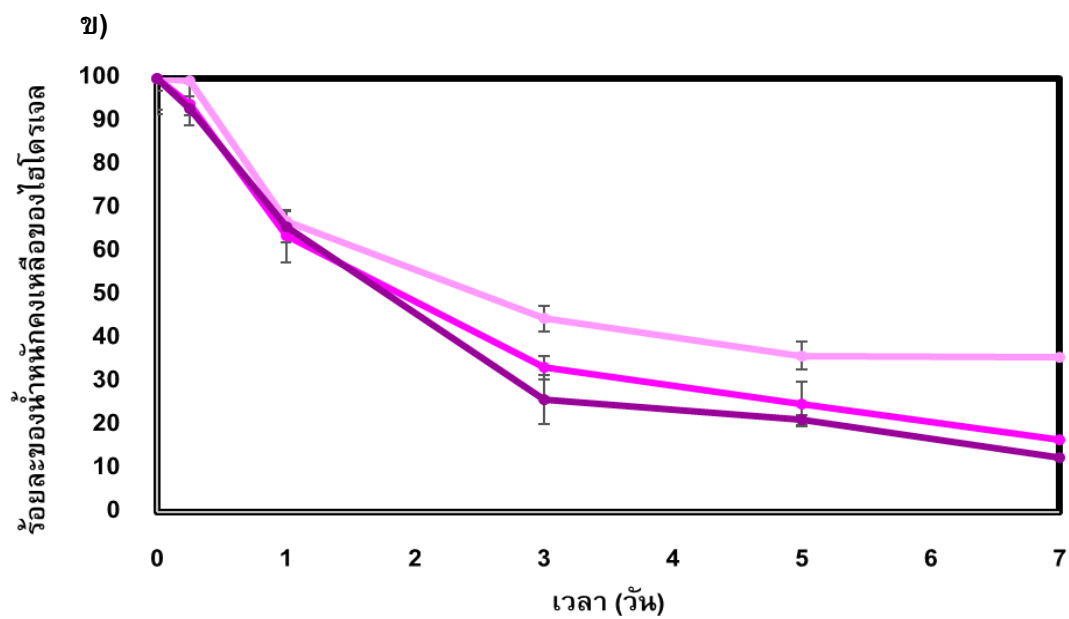
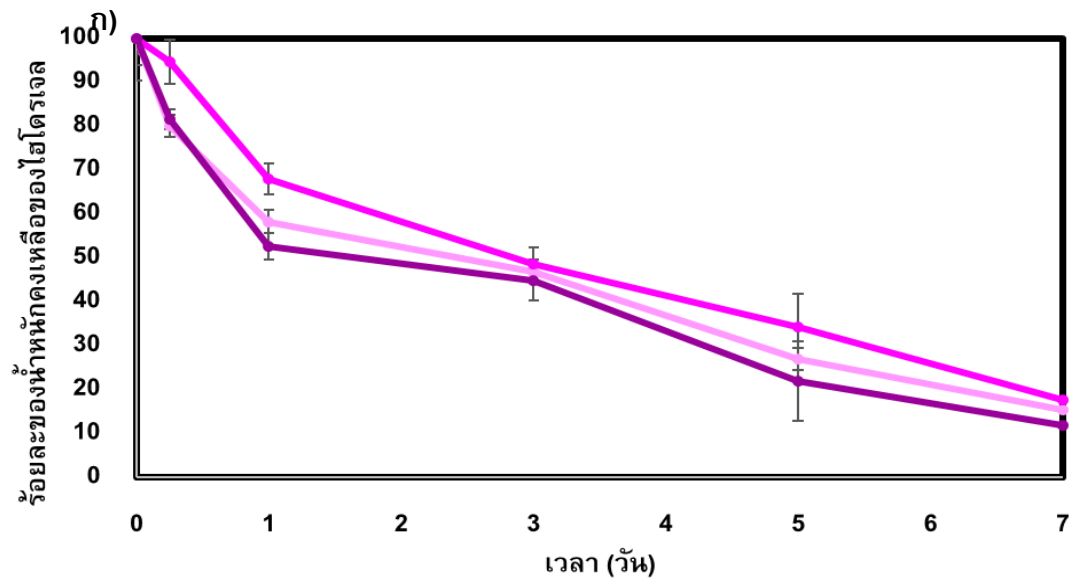


ภาพที่ 7 ร้อยละสัดส่วนที่ไม่ละลายน้ำของของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (■SF, ▨SOS, ▤SDS, ▩STS) ที่ความเข้มข้น 0, 0.03, 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก

8 อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่สภาวะจำลองผิวหนัง (pH 5.5)

การศึกษาอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่สภาวะจำลองผิวหนังนี้ ทำให้ทราบถึงระยะเวลาที่ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยจะย่อยสลายเมื่อนำไปประยุกต์ใช้เป็นเจลทาแผล อีกทั้งช่วยในการวิเคราะห์กลไกการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากไฮโดรเจลได้อีกด้วย อัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิด SDS และ STS ที่ความเข้มข้น 0.09, 0.15 และ 0.45% โดยน้ำหนัก ประเมินจากร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย ภายหลังแช่ในสารละลาย normal saline pH 5.5 ที่มีเอนไซม์ protease ความเข้มข้น 3 unit/ml อุณหภูมิ 37 °C ที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง, 1 วัน, 3 วัน, 5 วัน และ 7 วัน ดังภาพที่ 8 ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย SOS ไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากไม่มีความคงตัวหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) จากผลการทดลอง ไฮโดรเจลทุกสูตรย่อยสลายได้อย่างต่อเนื่องในสภาวะดังกล่าว โดยมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือเพียง 10-35% หลังจากผ่านไป 7 วัน เมื่อพิจารณาไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย SDS ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือของทั้ง 3 สูตร ในขณะที่ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS พบว่า ไฮโดรเจลที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนักมีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือมากกว่าไฮโดรเจลที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.15 และ 0.45% โดยน้ำหนัก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่เวลา 7 วัน ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือเท่ากับ 35.67 ± 3.21 ไฮโดรเจลที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.15 และ 0.45% โดยน้ำหนัก มีร้อยละน้ำหนักแห้งคงเหลือเพียง 12-16

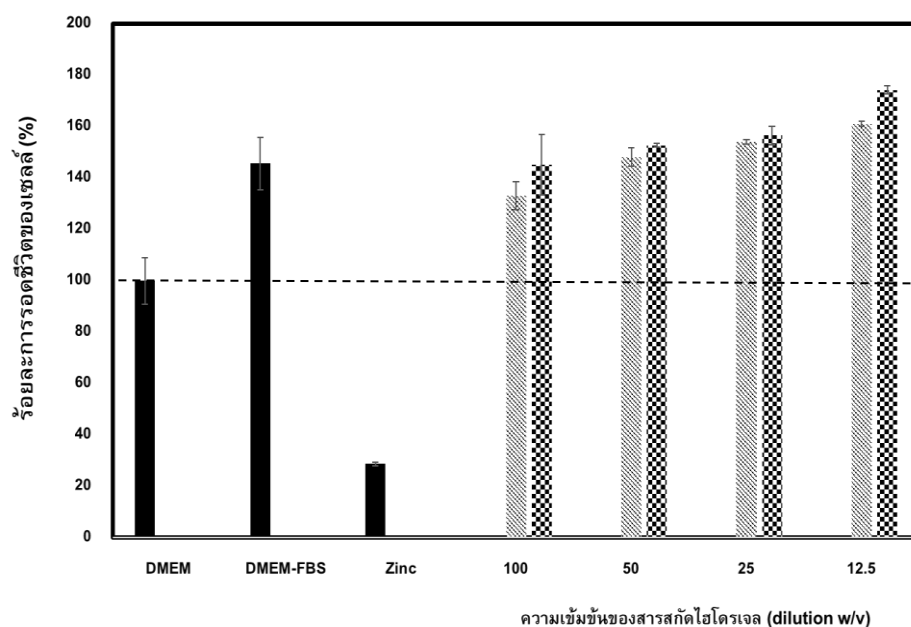
ผลอัตราการย่อยสลายของไฮโดรเจลนี้สอดคล้องกับผล FTIR spectra deconvolution ในหัวข้อ 4.6 ที่พบว่า โครงสร้างทุติยภูมิชนิด beta sheet ของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีปริมาณมากที่สุด โครงสร้าง beta sheet จัดเป็นโครงสร้างทุติยภูมิที่แข็งแรง ถูกย่อยสลายทางชีวภาพด้วยเอนไซม์โปรตีเอสได้ยากกว่าโครงสร้างชนิดอื่นเช่น random coil จึงทำให้ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก ย่อยสลายในอัตราที่ช้าที่สุดเมื่อเทียบกับไฮโดรเจลสูตรอื่นที่มีปริมาณ beta sheet ในโครงสร้างน้อยกว่า และสอดคล้องกับรายงานของ Yang C., Bochu W. ในปี 2009 ที่กล่าวไว้ว่าอัตราการย่อยสลายของไฮโดรเจลไฟโบรอินขึ้นอยู่กับปริมาณของโครงสร้างทุติยภูมิชนิด beta sheet ของไฟโบรอิน



ภาพที่ 8 ร้อยละน้ำหนักรั้งคงเหลือของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ ก) SDS ข) STS ความเข้มข้น 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนักรั้งในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส ที่สภาวะจำลองผิวหนัง (pH 5.5 อุณหภูมิ 37 °C)

9. ความเป็นพิษของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆกับเซลล์ผิวหนังหนู (L929 mouse fibroblasts) ในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO10993 Part 5

เนื่องจากจะนำไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบไปประยุกต์ใช้ในการนำส่งเคอร์คิวมินเพื่อรักษาแผลในหนูทดลอง จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการของไฮโดรเจลตามมาตรฐาน ISO10993 Part 5 ก่อน ผลร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนังของหนูเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ แสดงภาพที่ 9 โดยพบว่า สารสกัดจากไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ SDS และ STS ทุกความเข้มข้น ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์สูงถึง 140-160% เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่มี (DMEM+10%FBS) และไม่มีซีรัมเป็นส่วนประกอบ (DMEM) ในทางตรงข้าม เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการเติมซิงค์อะซิเตด (Zinc acetate) มีร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์เพียง 25% นั้นแสดงให้เห็นว่า ซิงค์อะซิเตดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย SDS และ STS จึงมีความปลอดภัยสำหรับการนำไปศึกษาต่อในหนูทดลอง

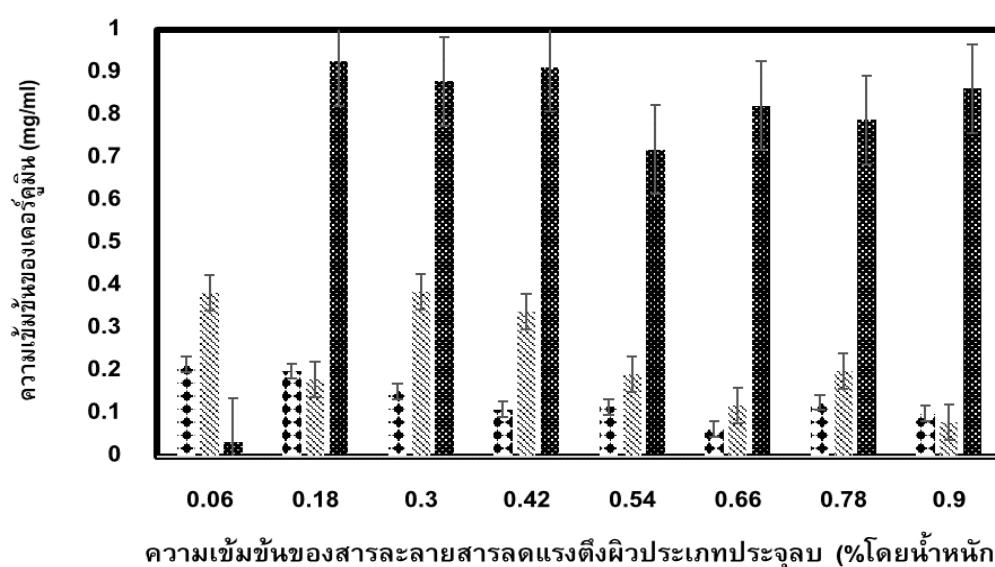


ภาพที่ 9 ร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ผิวหนังของหนู (L929 mouse fibroblasts) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทย (SF) ที่เตรียมจากสารผสมระหว่างสารละลายไฟโบรอินไหมไทยความเข้มข้น 2% โดยน้ำหนัก กับสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (SDS และ STS) ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับ (■) DMEM without FBS, DMEM+10%FBS และ Zinc.

10 ความสามารถในการละลายของเคอร์คูมินในสารละลายกรดตั้งผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ

ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่พัฒนาขึ้นนี้จะนำไปประยุกต์ใช้ในการนำส่งเคอร์คูมินซึ่งมีสมบัติละลายน้ำต่ำ มีรายงานว่าสารลดแรงตึงผิวสามารถเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำของเคอร์คูมินได้ โดยการเกิดเป็นไมเซลล์ของสารลดแรงตึงผิวที่หันหัวส่วนที่ชอบน้ำออกหาโมเลกุลน้ำ และหางส่วนที่ไม่ชอบน้ำเข้าหากันและบรรจุโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำไว้ข้างใน (Li Liu Lu Sun et al, 2013) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการละลายเคอร์คูมินในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่ความเข้มข้นเคอร์คูมินสูงสุดก่อน จากนั้นจะนำเคอร์คูมินที่ละลายในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบนี้ไปผสมกับสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเพื่อกระตุ้นการเกิดเจลไปพร้อมๆกับการบรรจุเคอร์คูมินในไฮโดรเจล จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความสามารถในการละลายสูงสุดของเคอร์คูมินในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง SOS, SDS และ STS ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.06, 0.18, 0.3, 0.42, 0.54, 0.66, 0.78 และ 0.9 % โดยน้ำหนัก ดังภาพที่ 10

ซึ่งเป็นความเข้มข้นเริ่มต้นของสารลดแรงตึงผิวก่อนผสมกับสารละลายไฟโบรอินไหมไทย ผลการทดลอง พบว่า STS ในช่วงความเข้มข้น 0.18-0.9% โดยน้ำหนักสามารถละลายเคอร์คูมินได้มากที่สุด คือประมาณ 0.72-0.93mg/ml ในขณะที่ SDS และ SOS ทุกความเข้มข้นละลายเคอร์คูมินได้ไม่เกิน 0.4 mg/ml เท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นวิกฤต (CMC) ของสารลดแรงตึงผิวทั้ง 3 ชนิดที่แสดงในตารางที่ 2 STS มีความเข้มข้นวิกฤตน้อยที่สุด นั่นคือสามารถเกิดไมเซลล์ที่ความเข้มข้นต่ำกว่า SOS และ SDS ซึ่งความสามารถในการเกิดไมเซลล์นี้จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของเคอร์คูมินได้ (Li X. et al, 2014)

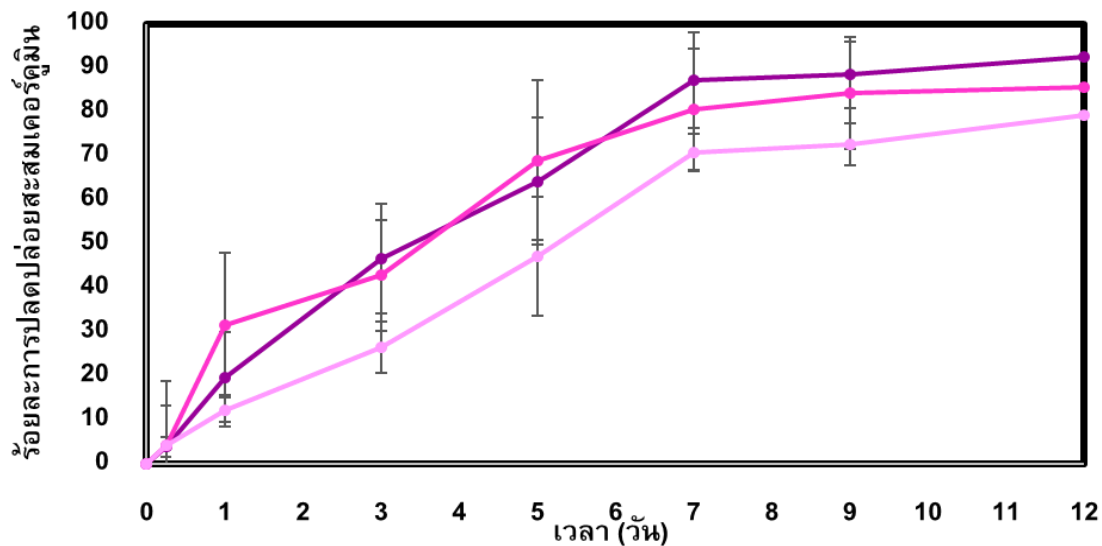


ภาพที่ 10 ความเข้มข้นของเคอร์คูมินที่ละลายในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ (●●) SOS (▨) SDS และ (■) STS) ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.18, 0.3, 0.42, 0.54, 0.66, 0.78 และ 0.9% โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37°C, pH 7.4

11 อัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ ในสารละลายเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ที่สภาวะจำลองผิวหนัง (pH 5.5)

จากผลการศึกษาความสามารถในการละลายของเคอร์คูมินในสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิดต่างๆ พบว่า STS สามารถละลายเคอร์คูมินได้มากที่สุด ดังนั้น ในการทดลองต่อจากนี้ จะเลือก STS ความเข้มข้น 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก มาละลายเคอร์คูมินและผสมกับสารละลายไหมไทย เพื่อขึ้นรูปไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่บรรจุเคอร์คูมิน โดยความเข้มข้นเคอร์คูมินที่เลือกมาศึกษาคือ 0.7 mg/ml เนื่องจากความเข้มข้นเคอร์คูมินสูงกว่านี้ เกิดการตกตะกอนของเคอร์คูมินในไฮโดรเจล ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ที่ความเข้มข้น 0.09, 0.15, 0.45% โดยน้ำหนัก ภายหลังแช่ในสารละลาย normal saline pH 5.5 ที่มีเอนไซม์ protease ความเข้มข้น 3 unit/ml อุณหภูมิ 37 °C ที่ช่วงเวลา 6 ชั่วโมง, 1 วัน, 3 วัน, 5 วัน, 7 วัน, 9 วัน และ 12 วัน แสดงดังภาพที่ 11 พบว่า เคอร์คูมินถูกปลดปล่อยจากไฮโดรเจลทั้ง 3 สูตรอย่างต่อเนื่อง ในช่วง 6 ชั่วโมงแรก ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของทั้ง 3 สูตร และหลังจากวันที่ 1 เป็นต้นไป พบว่าไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีร้อยละการปลดปล่อยเคอร์คูมินน้อยกว่าไฮโดรเจลอีก 2 สูตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเข้าสู่วันที่ 7 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของทั้ง 3 สูตร เริ่มช้าลงและเข้าสู่สภาวะคงที่ ที่เวลา 12 วัน ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมน้อยที่สุด เท่ากับ 79... ในขณะที่ไฮโดรเจลอีก 2 สูตร มีร้อยละการปลดปล่อยสะสมประมาณ 85-92 ผลร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินนี้เป็นไปในทางเดียวกันกับอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพของไฮโดรเจลในหัวข้อ 4.8 ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก มีอัตราการย่อยสลายทางชีวภาพช้าที่สุด จึงทำให้ปลดปล่อยเคอร์คูมินได้ในอัตราช้าที่สุดเช่นกัน

จากงานวิจัยของ Kasoju N และ Bora U. ในปี 2012 และ Vishal G. et al ในปี 2009 รายงานว่าเคอร์คูมินสามารถที่จะเกิดอันตรกิริยาไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) กับโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินไหม โดยสามารถเห็นพิศคุณลักษณะของเคอร์คูมินที่เกาะอยู่ในโครงสร้างทุติยภูมิแบบ beta-sheet ของไฟโบรอินไหมได้จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค NMR และเทคนิคย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ ดังนั้นอัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินขึ้นกับปริมาณของส่วนที่ไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินไหม และปริมาณของอันตรกิริยาไม่ชอบน้ำที่เกิดขึ้นระหว่างโมเลกุลเคอร์คูมินกับโครงสร้างที่ไม่ชอบน้ำของไฟโบรอินไหม ในงานวิจัยนี้ ที่พบว่า STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก สามารถกระตุ้นการเกิดไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่มีปริมาณโครงสร้าง beta sheet มากที่สุด จึงอาจทำให้เพิ่มโอกาสในการเกิดอันตรกิริยาไม่ชอบน้ำกับโมเลกุลเคอร์คูมินมากขึ้น กอปรกับอัตราการย่อยสลายที่ช้าที่สุด จึงเป็นเหตุให้อัตราการปลดปล่อยเคอร์คูมินจากไฮโดรเจลนี้ช้าที่สุด



ภาพที่ 11 ร้อยละการปลดปล่อยสะสมเคอร์คูมินของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วยสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบชนิด STS ความเข้มข้น 0.09, 0.15, 0.45 % โดยน้ำหนักรักษาที่สภาวะจำลองผิวหนัง (pH 5.5 อุณหภูมิ 37 °C)

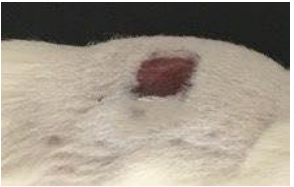
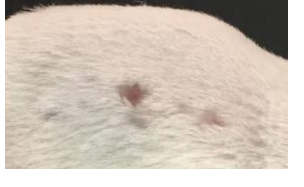
12 ประสิทธิภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ปลดปล่อยเคอร์คูมิน ในการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและการกระตุ้นการหายของแผลในหนูทดลอง

จากผลการศึกษาสมบัติของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยสูตรต่างๆข้างต้น ผู้วิจัยได้เลือกไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนักรักษาที่บรรจุเคอร์คูมิน ไปไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบและการกระตุ้นการหายของแผลในหนูทดลอง เนื่องจากเป็นสูตรที่สามารถบรรจุเคอร์คูมินได้มากที่สุด มีความคงตัวในสภาวะจำลองผิวหนังมากที่สุด (อัตราการย่อยสลายช้าที่สุด) และสามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คูมินได้เป็นเวลานานที่สุด และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ L929 ในระดับห้องปฏิบัติการที่ทดสอบตามมาตรฐาน ISO10993 Part 5

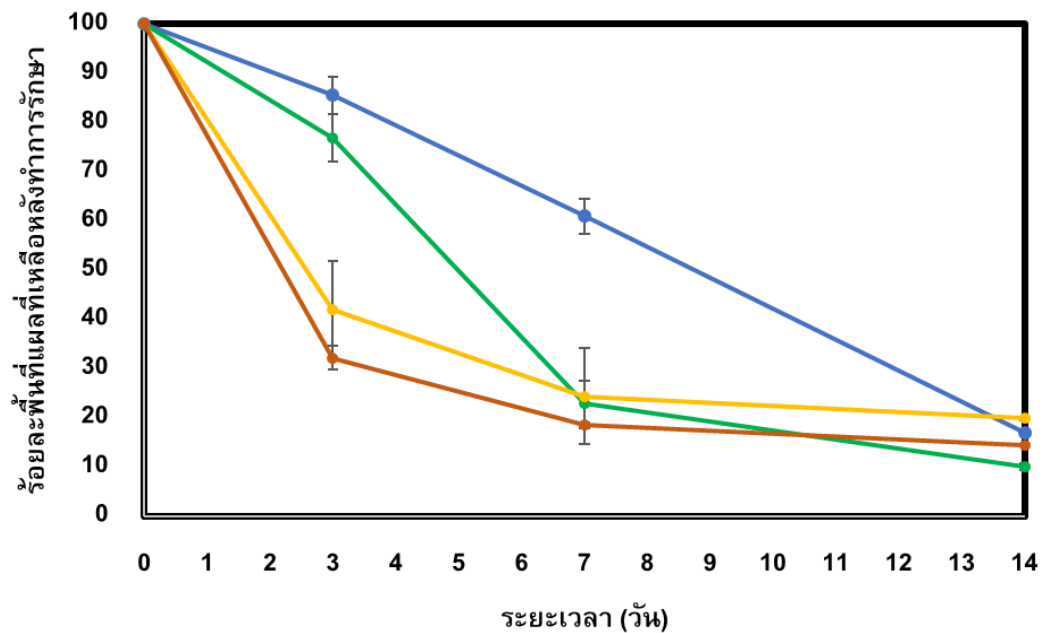
4.12.1 ร้อยละพื้นที่ของแผลที่ปิดหลังทำการรักษา

การทดลองนี้ หนูทดลองจะถูกทำให้เป็นแผลและทำการรักษาโดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดสอบ ได้แก่ (1) กลุ่มที่ไม่ทำการรักษา (2) กลุ่มที่รักษาด้วยไฟโบรอินเจลซึ่งเป็นเจลรักษาแผลที่ใช้ทางการแพทย์ (3) กลุ่มที่รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนักรักษา และไม่บรรจุเคอร์คูมิน และ (4) กลุ่มที่รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ถูกกระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนักรักษา ที่บรรจุเคอร์คูมิน การศึกษาประสิทธิภาพของไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ปลดปล่อยเคอร์คูมินในการกระตุ้นการหายของแผล ทำโดยการประเมินพื้นที่แผลหลังทำการรักษาในช่วงเวลาต่างๆ ได้แก่ วันที่ 3, 7 และ 14 จากการถ่ายภาพและวิเคราะห์ร้อยละพื้นที่แผลด้วยโปรแกรม Image Pro Plus 6.1 ภาพที่ 12 แสดงลักษณะและขนาดของแผลของกลุ่มการทดสอบต่างๆที่เวลา 0, 3, 7 และ 14 วันพบว่า ในวันที่ 3 หลังทำการรักษา ลักษณะบาดแผลในหนูทดลองของ

กลุ่มที่ไม่ทำการรักษา จะมีลักษณะเปื่อยขึ้น และ มีสีแดงสด เนื่องจากแผลยังไม่ปิดแต่ไม่พบการเกิดหนองหรือการอักเสบใดๆ ในขณะที่บาดแผลของอีกสามกลุ่มมีลักษณะแห้ง ไม่เปื่อยขึ้น แต่แผลยังไม่ปิดทั้งหมดไม่พบการเกิดหนองหรือการอักเสบใดๆเช่นเดียวกัน หากพิจารณาร้อยละพื้นที่บาดแผลเมื่อเทียบกับพื้นที่แผลเริ่มต้น ดังภาพที่ 13 พบว่า ที่เวลา 3 วัน กลุ่มที่ไม่ทำการรักษามีพื้นที่แผลเหลือมากถึงร้อยละ 85 ของพื้นที่แผลเริ่มต้น รองลงมาคือ กลุ่มที่รักษาด้วยไฟบรินเจล มีพื้นที่แผลเหลือร้อยละ 76 ในขณะที่กลุ่มที่รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ไม่บรรจุและที่บรรจุเคอร์คูมิน มีร้อยละพื้นที่แผลเหลือเพียง 32-42 ซึ่งน้อยกว่าอีก 2 กลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 7 พบว่าลักษณะบาดแผลทุกกลุ่มยกเว้นกลุ่มที่ไม่ทำการรักษา จะมีลักษณะแห้ง และเล็กลงจากเดิมอย่างชัดเจน พบการเกิดของสะเก็ดแผลในกลุ่มที่รักษาด้วยไฟบรินเจล โดยกลุ่มที่รักษาด้วยไฟบรินเจล และไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่ไม่บรรจุและที่บรรจุเคอร์คูมิน มีร้อยละพื้นที่แผลเหลือประมาณ 18-24 ทั้ง 3 กลุ่มนี้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ทำการรักษาเหลือพื้นที่แผลมากที่สุดถึง ร้อยละ 60 ซึ่งมากกว่าอีก 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตาม ในวันที่ 14 พบว่าในทุกกลุ่มการรักษา แผลมีลักษณะแห้ง และปิดเกือบจะสนิท เหลือเพียงรอยจางๆ และไม่พบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของร้อยละพื้นที่แผลของทั้ง 4 กลุ่มการทดสอบ

วันที่	กลุ่มการทดสอบ			
	ไม่ได้ทำการรักษา	ไฟบรินเจล	ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม ไทยที่ไม่บรรจุเคอร์คูมิน	ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหม ไทยที่บรรจุเคอร์คูมิน
0				
3				
7				
14				

ภาพที่ 12 ลักษณะและพื้นที่ของแผลหลังทำการรักษาด้วยกลุ่มการทดสอบ 4 กลุ่ม ได้แก่ (1) กลุ่มที่ไม่ทำการรักษา (2) กลุ่มที่รักษาด้วยไฟบรินเจลซึ่งเป็นเจลรักษาแผลที่ใช้ทางการแพทย์ (3) กลุ่มที่รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่กระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก และไม่บรรจุเคอร์คูมิน และ (4) กลุ่มที่รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่กระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก ที่บรรจุเคอร์คูมิน ที่เวลา 0, 3, 7 และ 14 วัน



ภาพที่ 13 ร้อยละพื้นที่แผลที่เหลือเมื่อเทียบกับพื้นที่แผลเริ่มต้น หลังทำการรักษาด้วยกลุ่มการทดสอบ 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ไม่ทำการรักษา, รักษาด้วยไฟบรินเจล, รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่กระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก และไม่บรรจุเคอร์คูมิน และ รักษาด้วยไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมไทยที่กระตุ้นด้วย STS ความเข้มข้น 0.09% โดยน้ำหนัก ที่บรรจุเคอร์คูมิน เป็นเวลา 3, 7 และ 14 วัน

เอกสารอ้างอิง

- สิงห์คำ ธิมา และคณะ. 2551. เคอร์คิวมินอยดัยยับยั้งยีนวิลมทูเมอร์วันในมะเร็งเม็ดเลือดขาว สงขลา นครินทร์เวชสาร, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- Adeeb et.al. (2011). Curcumin in inflammatory diseases. Bio Factors 39(1): 69-77
- Aimee E. et al (2015). Curcumin-encapsulated nanoparticles as innovative antimicrobial and wound healing agent. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine 11: 195–206
- Akira M et al (2006). Mechanisms of Silk Fibroin Sol-Gel Transitions. Phys. Chem. B 110: 21630-21638
- Anuchapreeda S., Tima S., Duangrat C, Limtrakul P. (2008). Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on WT1 gene expression in leukemic cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 62(4):585-594

- Banani H., Roatti B., Ezzahi B., Giovannini O., Gessler G., Pertot I., et al. (2014). Characterization of resistance mechanisms activated by *Trichoderma harzianum* T39 and benzothiadiazole to downy mildew in different grapevine cultivars. Plant Pathol. 63: 334–343
- Bengt K et al (2014). Surface Chemistry of Surfactants and Polymers: 257-262
- Bharat B. et al (2006). Turmeric: The Genus *Curcuma*. Curcumin Biological and Medicinal Properties 26: 297-366
- Carey C., Koretsky P. (1979). Spectrophotometric determination of the critical micellar concentration of bile salts using bilirubin monoglucuronide as a micellar probe. Biochem. J 179: 675-685
- Chuang et al. (2002). Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. Bipolar Disorders 4: 129-136
- Chunmin D. et al. (2013) Surfactant-induced Nanofibrous Architecture of Silk Fibroin Hydrogels. Materials Science Forum 745-746: 453-458
- Debjit B., Harish G. et al (2012). Controlled Release Drug Delivery Systems. Journal The Pharma Innovation 1(10): 24-32
- Dikshit M. et al (1995). Prevention of ischaemia-induced biochemical changes by curcumin & quinidine in the cat heart. Indian. J. Med. Res 101: 31–35
- Esther W. et al (2011). Silk fibroin as a vehicle for drug delivery applications. Journal of Controlled Release 150: 128–141
- FangJ Y et al (2006). Characterization and Evaluation of Silk Protein Hydrogels for Drug Delivery. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 54: 156-162
- Fatemeh M. et al (2015). Silk fibroin nanoparticle as a novel drug delivery system. Journal of Controlled Release 206: 161–176
- Gemma V. et al (2012). Polymers and Drug Delivery Systems. Current Drug Delivery 9(4): 1-27
- Goodman L. et al (2006). Pharmacokinetics and Pharmacodynamics: The Dynamics of Drug Absorption, Distribution, Action, and Elimination. The Pharmacological Basis of Therapeutics 8: 137-317
- Gokhan E. et al (2017). The Effects of Curcumin on Wound Healing in a Rat Model of Nasal Mucosal Trauma. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2017: 1-6
- Hofmann S. et al (2006). Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug

- delivery. Journal of Controlled Release 111: 219–227
- Hu, X., Kaplan, D., Cebe, P (2008). Dynamic Protein–Water Relationships during β -Sheet Formation. Macromolecules 41: 3939–3948
- Hyung Woo J. et al (2016). Silk Nanofiber-Networked Bio-Triboelectric Generator: Silk Bio-TEG. Advanced Energy Materials 6(8)
- Inano et al. (1999). Chemoprevention by curcumin during the promotion stage of tumorigenesis of mammary gland in rats irradiated with gamma-rays. Carcinogenesis 20: 1011–1018
- Ji Hun P. et al (2014). Effect of surfactants on sol–gel transition of silk fibroin. J Sol-Gel Sci Technol 71: 364–371
- Joydip K et al (2012). Silk fibroin/poly(vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs. Acta Biomaterialia 8: 1720–1729
- Karageorgiou V. et al (2004). Bone morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells. J Biomed Mater Res 71A: 528–537
- Kasoju N. et al (2012). Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin scaffold. Biomaterials research 100B: 1854–1866.
- Keiji N. et al (2012). Biocompatible and Biodegradable Dual-Drug Release System Based on Silk Hydrogel Containing Silk Nanoparticles. Biomacromolecules 13: 1383–1389
- Kinam P. et al (2014). Controlled drug delivery systems: Past forward and future back. Journal of Controlled Release 190: 3–8
- Kim U.J et al (2005). Three-dimensional aqueous-derived biomaterial scaffolds from silk fibroin. Biomaterials 16: 2775–2785.
- Lee K. et al (1998). Effect of surface properties on the antithrombogenicity of silk fibroin/ Scarboxymethyl kerateine blend films. J Biomater Sci Polym Ed 9: 905–914
- Leng-Duei K. et al (2015). Structures, mechanical properties and applications of silk fibroin materials Progress. Polymer Science 46: 86–110
- Le-Ping Y. et al (2012) Development of silk-based scaffolds for tissue engineering of bone from human adipose derived stem cells. Acta Biomater 8(7): 2483–2492
- Lingshuang W. et al (2013). The Cytocompatibility of Genipin-Crosslinked Silk Fibroin Films. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology 4: 213–221

- Litwinienko G. et al (2004). Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstraction. 2. Resolution of the curcumin antioxidant controversy. The role of sequential proton loss electron transfer. J Org Chem 69(18): 5888-5896.
- Liu L. et al (2013). Curcumin loaded polymeric micelles inhibit breast tumor growth and spontaneous pulmonary metastasis. Int J Pharm 443(1-2): 175-82.
- Li X. et al (2014). Preparation of curcumin micelles and the in vitro and in vivo evaluation for cancer therapy. J Biomed Nanotech nol. 10(8): 1458-68.
- Lydia T. et al (2017). Development of Curcumin loaded chitosan polymer based nanoemulsion gel: In vitro, ex vivo evaluation and in vivo wound healing studies. International Journal of Biological Macromolecules 101: 569–579
- Manikandan P. et al (2006). Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. Molecular and Cellular Biochemistry 290: 87–96
- Mariana A. et al (2015). Formation of silk fibroin hydrogel and evaluation of its drug release profile. Journal of Applied Polymer Science 132
- Min B M. et al (2004). Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro. Biomaterials 25: 1289–1297
- Motterlini et al (2000). Curcumin, an antioxidant and anti-inflammatory agent, induces heme oxygenase-1 and protects endothelial cells against oxidative stress. Free Radic Biol Med 28(8):1303-1312
- Nirmala and Puvanakrishnan (1996). Protective role of curcumin against isoproterenol induced myocardial infarction in rats. Mol. Cell. Biochem 159: 85-93
- Nirmala et al. (1999). Curcumin treatment modulates collagen metabolism in isoproterenol induced myocardial necrosis in rats. Mol. Cell. Biochem 197: 31-37
- Pornngarm L. et al (2002). Modulation of human multidrug-resistance MDR-1 gene by natural curcuminoids. BMC Cancer 4(13): 507-520
- Riyaz Ahmed K. et al (2015). DESIGN AND IN VITRO EVALUATION OF DICLOFENAC SODIUM MATRIX TABLETS. International Journal of Pharmacy 5(1):98-106
- Robert J. Hunter et al (2013). Chapter 1 – Introduction. Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications: 98-106

- Rommel B. et al (2012). Infrared Spectroscopy of Anionic, Cationic, and Zwitterionic Surfactants. Advances in Physical Chemistry: 1-12
- Rui-Juan X. et al (2008). The Preparation of Silk Fibroin Drug-loading Microspheres. Journal of Fiber Bioengineering and Informatics 40: 2345-2350
- Ruji somnapa J. (2007). Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin nanocurcumin: a novel strategy for human cancer therapy. J Nanobiotechnology 17: 291-293
- Rustem I. et al (2012). The α -Helix to β -Sheet Transition in Stretched and Compressed Hydrated Fibrin Clots. Journal Biophysical 103(5): 1020-1027
- Sharma et al. (2001). Pharmacodynamic and pharmacokinetic study of oral Curcuma extract in patients with colorectal cancer. Clin Cancer Res 7(7):1894-1900
- Tanaka et al. (2004). The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor-alpha through nuclear factor-kappa B, and by 17beta-estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. J Biol Chem 275: 25781-25790.
- Thaloor et al (1999). Systemic administration of the NF- κ B inhibitor curcumin stimulates muscle regeneration after traumatic injury. Am J Physiol 277: 320-329
- Tharwat F. T. (2005). Chapter 2 Physical Chemistry of Surfactant Solutions. Applied Surfactants: Principles and Applications: 19-50
- Tima S. et al (2008). Effect of pure curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin on WT1 gene expression in leukemic cell lines. Cancer Chemother Pharmacol 62(4): 585-594
- Todd R. et al (2008). Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. Polymer 49: 1993-2007
- Tonnesen H. et al (1986). Studies on curcumin and curcuminoids VIII. Photochemical stability of curcumin. Z Lebe-sm Unters Forsch 183(2): 116-122
- Tuna Y. et al (2009). Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels. Biophys J 97:2044.
- Ung-Jin K. et al (2004). Structure and Properties of Silk Hydrogels. Biomacromolecules 5: 786-792
- Vishal G. et al (2009). Fabrication and characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy. International Journal of Nanomedicine 4: 115-122

- William S. et al (1988). Spectrophotometric determination of the critical micellar concentration of bile salts using bilirubin monoglucuronide as a micellar probe. Biochem. J 252: 275-281
- Wong Po Foo C. et al (2006). Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery. Journal of Controlled Release 111: 219–227
- Xiaoqin W. et al (2011). Lyophilized Silk Fibroin Hydrogels for the Sustained Local Delivery of Therapeutic Monoclonal Antibodies. Biomaterials 32(10): 2642–2650
- Xilong W. et al (2012). Sodium dodecyl sulfate-induced rapid gelation of silk fibroin. Acta Biomaterialia 8: 2185–2192
- Xinfang L. et al (2014). Chapter 3: Silk Fiber — Molecular Formation Mechanism. Structure-Property Relationship and Advanced Applications. Oligomerization of Chemical and Biological Compounds: 69-100
- Xin C. et al (2009). Silk Fibers Extruded Artificially from Aqueous Solutions of Regenerated Bombyx mori Silk Fibroin are Tougher than their Natural Counterparts. Advance Material 21: 366–370
- Xinyi D. et al (2017). Nano-formulated curcumin accelerates acute wound healing through Dkk-1-mediated fibroblast mobilization and MCP-1-mediated anti-inflammation. NPG Asia Materials 9: 1-14
- Yang C., Bochu W. (2009). Biodegradation of Silk Biomaterials. Molecular Sciences 10: 1514-1524
- Yaojiong W. et al (2007). Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. STEM CELLS 25: 2648 –2659
- Yuji et al (2005). Mechanical Strain-Stimulated Remodeling of Tissue-Engineered Blood Vessel Constructs. Journal of Biomedical materials 40: 764–768.

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัย พบว่า สารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบทั้ง 3 ชนิด สามารถกระตุ้นการเกิดเจลไฟโบรอินไหมไทยได้ในระยะเวลาแตกต่างกันตั้งแต่ 14 นาที ถึง 144 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบที่ใช้ สาร SDS และ STS ที่มีสายอัลคิลยาว มีประจุลบสูงและมีค่าความเข้มข้นวิกฤตต่ำกว่า SOS สามารถกระตุ้นการเกิดเจลได้ภายในเวลา 14- 30 นาที โดยกลไกการเกิดเจลน่าจะมาจากการเกิดอันตรกิริยาของส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) ระหว่างโมเลกุลของไฟโบรอินไหมกับสายโซ่อัลคิลของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบ ซึ่งกระตุ้นให้โครงสร้างทุติยภูมิของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยเปลี่ยนแปลงจากโครงสร้างแบบ random coil เป็นโครงสร้างแบบ β sheet นอกจากนี้ ยังอาจเกิดอันตรกิริยาของไฟฟ้าสถิต (electrostatic interaction) ระหว่างประจุลบของหมู่ซัลเฟตของสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบกับโมเลกุลประจุบวกของสายโซ่ไฟโบรอินไหมไทย ในขณะที่ อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของสารละลายไฟโบรอินไหมไทยจากโครงสร้างแบบ random coil เป็นโครงสร้างแบบ β sheet ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (self- transition of β sheet)-ขึ้นร่วมด้วยในกรณีของ SOS ที่การเกิดเจลเกิดขึ้นอย่างช้าๆ งานวิจัยนี้ยังพบว่า ไฮโดรเจลที่ขึ้นรูปได้จากการเติมสารลดแรงตึงผิวประเภทประจุลบแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ มีสมบัติแตกต่างกันอีกด้วย โดยไฮโดรเจลไฟโบรอินที่ขึ้นรูปด้วยการเติม STS ที่ความเข้มข้น 0.09% มีสัดส่วนโครงสร้างเคมี β -sheet สูงที่สุด ทำให้มีอัตราการย่อยสลายช้าที่สุด และเมื่อนำไฮโดรเจลดังกล่าวไปบรรจุเคอร์คิวมิน พบว่า ไฮโดรเจลสูตรนี้สามารถควบคุมการปลดปล่อยเคอร์คิวมินได้นาน และไม่เป็นพิษกับเซลล์ในระดับห้องปฏิบัติการตามมาตรฐาน ISO 10993-5 ไฮโดรเจลสูตรดังกล่าวจึงถูกนำไปประยุกต์ใช้รักษาแผลในหนูทดลองเพื่อเปรียบเทียบการกระตุ้นการหายของแผลกับแผลที่ไม่ได้ทำการรักษาและแผลที่รักษาด้วยไฟบรินเจลซึ่งเป็นเจลทาแผลที่ใช้แพร่หลายทางการแพทย์ ผลการทดลอง พบว่า ไฮโดรเจลไฟโบรอินไหมที่บรรจุเคอร์คิวมินกระตุ้นการหายของแผลได้ดีกว่าแผลที่รักษาด้วยไฟบรินเจล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วง 3-7 วันหลังทำการรักษา อย่างไรก็ตาม ในวันท้ายๆของการรักษา ไฮโดรเจลมีการหลุดลอกออกไปจากบริเวณบาดแผลและไม่ได้มีการทาไฮโดรเจลซ้ำลงบนแผล การหายของแผลในแต่ละกลุ่มจึงให้ผลไม่แตกต่างกัน ดังนั้นหากจะพัฒนาไฮโดรเจลต่อยอด ควรต้องมีการทาไฮโดรเจลซ้ำที่ช่วงเวลาต่างๆระหว่างการรักษาเพื่อให้เห็นประสิทธิภาพของไฮโดรเจลนี้ในการกระตุ้นการหายของแผล ตั้งแต่ระยะแรกจนกระทั่งแผลปิดสนิท

ข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

งานวิจัยถัดไปที่ผู้วิจัยจะต่อยอดในอนาคตคือการประยุกต์ใช้ไฮโดรเจลนี้ในการรักษาแผลเบาหวานและแผลที่มีการอักเสบติดเชื้อ เนื่องจากโมเดลหนูทดลองที่เป็นโรคเบาหวานใช้เวลาในการกระตุ้นการเกิดโรคเบาหวานรวมถึงการรักษาแผลยาวนานกว่า 4-6 เดือน จึงไม่สามารถทำการทดลองให้เสร็จจุลวงได้ทันภายในกำหนดเวลาของโครงการวิจัยนี้

Output จากโครงการวิจัย

การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

1. Nattakan Chantong, Siriporn Damrongsakkul, Suthiluk Patumraj, and Juthamas Ratanavaraporn. Effect of anionic surfactants on the gelation of silk fibroin and solubility of curcumin for controlled release application. Proceeding in the 5th Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology 2017, February 28- March 2, 2017, Maruay Garden Hotel, Bangkok, Thailand

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

1. Nattakan Chantong, Siriporn Damrongsakkul, and Juthamas Ratanavaraporn. Gelation process and physico-chemical properties of Thai silk fibroin hydrogels induced by various anionic surfactants for controlled release of curcumin. Submitted to *Materials Science and Engineering: C* on 24/Nov/2017

ภาคผนวก

Manuscript Details

Manuscript number	MSEC_2017_4175
Title	Gelation process and physico-chemical properties of Thai silk fibroin hydrogels induced by various anionic surfactants for controlled release of curcumin
Article type	Research Paper

Abstract

Thai silk fibroin (SF), a protein derived from cocoons of Bombyx Mori silkworm, was introduced to form hydrogel by the induction of various anionic surfactants including sodium octyl sulfate (SOS), sodium dodecyl sulfate (SDS), and sodium tetradecyl sulfate (STS) which have similar chemical structure but different alkyl chain lengths (hydrophobic molecules) and charges. The effects of types of anionic surfactant and their concentrations on gelation mechanism and time of SF were systematically investigated. We found that SDS and STS which have long alkyl chain lengths and high negative charges could accelerate the gelation of SF to occur within 14-42 min in a concentration dependent manner. The optimal concentrations of SDS at 0.15%wt and STS at 0.09%wt induced the SF gelation to the fastest rate at 14 and 20 min, respectively. The higher concentrations of SDS and STS delayed the gelation to 18-30 min, possibly due to the repulsive force of negative charges between anionic surfactant and SF molecules. SOS which has short alkyl chain length and low negative charge slowly induced SF to gel at around 113-144 h. The mechanisms of SF gelation induced by these 3 anionic surfactants were supposed to be combination of hydrophobic and electrostatic interactions, as well as the self-transition of beta sheet (only in case of SOS). FTIR analysis presented that the SF +0.09%wt STS hydrogel showed a significant increase in beta sheet percentage in its secondary structure when compared to that of self-gelled SF. The SF+STS hydrogels were further employed to encapsulate curcumin for the controlled release application. The SF+0.09%wt STS hydrogel encapsulating curcumin showed slow rate of degradation while sustained the release of curcumin. This hydrogel can be applied as a minimal invasive injectable hydrogel or as hydrogel for topical treatment of diseases.

Keywords	silk fibroin; anionic surfactant; sodium tetradecyl sulfate; gelation; hydrogel; curcumin
Corresponding Author	Juthamas Ratanavaraporn
Corresponding Author's Institution	Chulalongkorn University
Order of Authors	Nattakan Chantong, Siriporn Damrongsakkul, Juthamas Ratanavaraporn
Suggested reviewers	Habibur Rahman, Won Ho Park

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter (Ratanavaraporn et al).doc [Cover Letter]

Highlights (Ratanavaraporn et al).docx [Highlights]

Graphical abstract (Ratanavaraporn et al).tif [Graphical Abstract]

Manuscript.doc [Manuscript File]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

Professor Michelle Oyen

Editor-in-Chief

Materials Science and Engineering: C

24 November 2017

Dear Professor Michelle Oyen,

We would like to submit our manuscript entitled “Gelation process and physico-chemical properties of Thai silk fibroin hydrogels induced by various anionic surfactants for controlled release of curcumin” for publication as an original research paper in Materials Science and Engineering: C.

In this study, silk fibroin hydrogels were formed by the induction of various anionic surfactants which have similar chemical structure but different alkyl chain lengths and charges. The effects of alkyl chain length, charges, and concentrations of anionic surfactants on the silk fibroin gelation time were shown. The proposed mechanisms of gelation of silk fibroin induced by anionic surfactants were demonstrated to be the combination of hydrophobic and electrostatic interactions, as well as the self-transition of beta sheet. The hydrogels were used to encapsulate and controlled release of curcumin. The hydrogels can be further applied as a minimal invasive injectable hydrogel or as hydrogel for topical treatment of diseases.

We confirm that this manuscript has not been published elsewhere and is not under consideration by another journal. All authors have approved the manuscript and agree with submission to Materials Science and Engineering: C. The study was supported by the Thailand Research Fund (TRG5880213) and Chulalongkorn University. The authors have no conflicts of interest to declare.

Please address all correspondence to:

Juthamas Ratanavaraporn, Ph.D.

Assistant Professor

Biomedical Engineering Program, Faculty of Engineering, Chulalongkorn University Tel.: +662 218 6793

E-mail address: juthamas.r@chula.ac.th

We look forward to hearing from you at your earliest convenience.

Yours sincerely,

Juthamas Ratanavaraporn

Highlights

- Thai silk fibroin hydrogels were formed by the induction of anionic surfactants.
- Effects of 3 anionic surfactants on silk fibroin gelation mechanism were reported.
- Type and concentration of surfactants affect properties of silk fibroin hydrogels.
- Silk fibroin hydrogels were formed by hydrophobic and electrostatic interactions.
- The silk fibroin hydrogels can encapsulate and sustain the release of curcumin.

SF random chain



Hydrophobic blocks

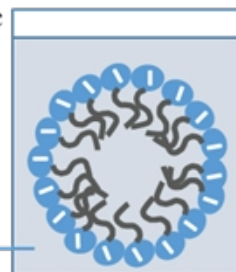
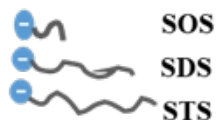
Hydrophilic blocks

Anionic surfactants (SOS/SDS/STS)

Hydrophilic domain



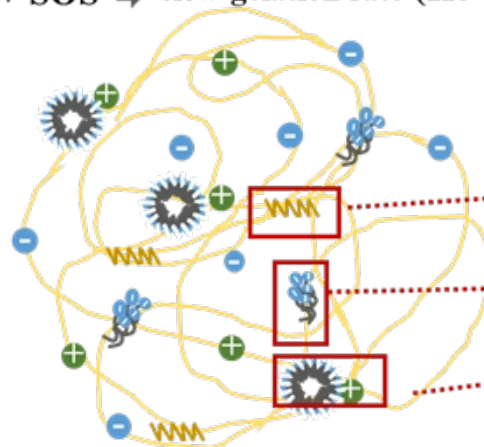
Hydrophobic domain



Aqueous solution

SOS/SDS/STS
Micelle

I) SF + SOS $\Rightarrow$ slow gelation rate (113-144 h)



Self transition of β sheet

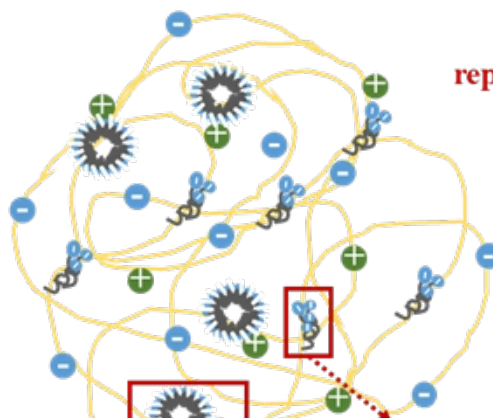
Hydrophobic interaction

Electrostatic interaction



II) SF + SDS/STS at optimal concentration

fast gelation rate (14-20 min)

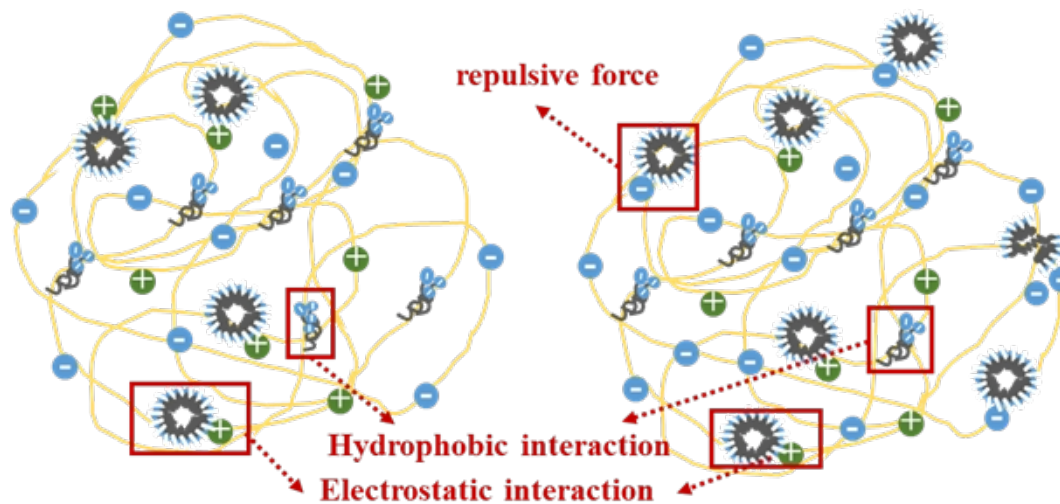


Hydrophobic interaction

Electrostatic interaction

III) SF + SDS/STS at high concentration

delayed gelation rate (24-30 min)



**Gelation process and physico-chemical properties of Thai silk fibroin hydrogels induced
by various anionic surfactants for controlled release of curcumin**

Nattakan Chantong^a, Siriporn Damrongsakkul^b, and Juthamas Ratanavaraporn ^{a*}

^a *Biomedical Engineering Program, Faculty of Engineering,*

^b *Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering,*

Chulalongkorn University, PhayaThai Road, Bangkok, 10330, Thailand

**Corresponding Author: juthamas.r@chula.ac.th; Tel.: +662 218 6793*

Abstract

Thai silk fibroin (SF), a protein derived from cocoons of *Bombyx Mori* silkworm, was introduced to form hydrogel by the induction of various anionic surfactants including sodium octyl sulfate (SOS), sodium dodecyl sulfate (SDS), and sodium tetradecyl sulfate (STS) which have similar chemical structure but different alkyl chain lengths (hydrophobic molecules) and charges. The effects of types of anionic surfactant and their concentrations on gelation mechanism and time of SF were systematically investigated. We found that SDS and STS which have long alkyl chain lengths and high negative charges could accelerate the gelation of SF to occur within 14-42 min in a concentration dependent manner. The optimal concentrations of SDS at 0.15%wt and STS at 0.09%wt induced the SF gelation to the fastest rate at 14 and 20 min, respectively. The higher concentrations of SDS and STS delayed the gelation to 18-30 min, possibly due to the repulsive force of negative charges between anionic surfactant and SF molecules. SOS which has short alkyl chain length and low negative charge slowly induced SF to gel at around 113-144 h. The mechanisms of SF gelation induced by these 3 anionic surfactants were supposed to be combination of hydrophobic and electrostatic interactions, as well as the self-transition of beta sheet (only in case of SOS). FTIR analysis presented that the SF+0.09%wt STS hydrogel showed a significant increase in beta sheet percentage in its secondary structure when compared to that of self-gelled SF. The SF+STS hydrogels were further employed to encapsulate curcumin for the controlled release application. The SF+0.09%wt STS hydrogel encapsulating curcumin showed slow rate of degradation while sustained the release of curcumin. This hydrogel can be applied as a minimal invasive injectable hydrogel or as hydrogel for topical treatment of diseases.

Keywords SF; anionic surfactant; sodium tetradecyl sulfate; gelation; hydrogel; curcumin

Introduction

Silk is a natural protein produced by silkworms, spider, or other insects. Silk derived from the cocoons of *Bombyx mori* silkworms consists of two main proteins, fibroin and sericin. Recently, silk fibroin (SF) has been widely used in biomedical field particularly of tissue engineering and drug delivery system since it is biocompatible, biodegradable, non-immunogenic, and easy to be fabricated into various forms [1-3]. Furthermore, SF has beta sheet secondary structure that is formed by the strong hydrogen bond, resulting in a robust mechanical properties and slow degradation rate comparing to other natural polymers [1]. Generally, SF is dissolved in neutral salts, such as lithium bromide or calcium chloride, to prepare the regenerated SF solution which can be further fabricated into various forms using different techniques. Our previous researches demonstrated the fabrication techniques and applications of various SF-based materials obtained from regenerated SF solution and its blends with gelatin, for example, film, hydrogel, scaffold, tube, microsphere, and fiber [4-10]. Among various formulations, hydrogel is the form of hydrophilic polymer chain network which has ability to encapsulate the drug with high efficiency. Some of hydrogels can be easily fabricated by self-assembly or crosslinking techniques and form as *in situ* or injectable hydrogel in which the drug administration is minimal invasive [11-12].

In the regenerated SF solution, the hydrogen bonds in secondary structure are broken down so that the beta sheet structure is changed to the water-soluble random coil structure [9]. However, the random coil structure is unstable and tends to turn back to the original beta sheet structure to form the irreversible gel. At physiological condition, this spontaneous gelation of SF may take place within couple weeks to months. Furthermore, the SF gelation can be induced by physical factors such as pH [13], temperature [14], shear force [15], ultrasound [16], and electric field [17] or chemical factors such as precipitating agents (e.g. salts, organic solvents, large polymeric agents, and low molecular weight polymers) [18], or

crosslinking agents [19]. Surfactants also affect protein-protein interactions by either encourage or inhibit protein aggregation. Anionic surfactants have been shown to accelerate the gelation of SF rather than the cationic and non-ionic surfactants [20]. Wu *et al.* reported that some concentrations of anionic surfactant, sodium dodecyl sulfate (SDS), accelerated the gelation of SF in the order of minutes due to the strong hydrophobic forces and electrostatic effects triggered by the surfactant, leading to protein unfolding and rapid association into particles and organization of gel network [21]. Due to the proposed mechanisms of SDS to gel SF, the charge and alkyl chain length of anionic surfactant would play important roles to control the gelation process of SF. Therefore, other anionic surfactants having similar molecular structure to the SDS but different molecular weight, number of CH₂ (alkyl chain length), critical micelle concentration, and charge are supposed to gel SF with different behaviors. Sodium octyl sulfate (SOS) and sodium tetradecyl sulfate (STS) are those having lower and higher molecular weight and number of CH₂ (alkyl chain length) compared to SDS (Table 1), respectively. Furthermore, SDS and STS have been used in medical products approved by the U.S. Food and Drug Administration (US-FDA).

In this study, the effects of three anionic surfactants (SOS, SDS, and STS) at various concentrations on gelation process and physico-chemical properties of Thai SF hydrogels were systematically investigated. Firstly, the characteristics of the three anionic surfactants including critical micelle concentration and zeta potential were evaluated. Then, various concentrations of anionic surfactants were mixed with Thai SF solution at a particular ratio. Zeta potential and gelation time of the mixed solution were measured. The chemical structure, chemical stability, gel fraction, and degradation rate of different SF hydrogels were characterized. The SF hydrogels developed in this study may find useful applications in biomedical field such as a minimal invasive injectable hydrogel while it can control release of curcumin or further applied with other drugs or active compounds.

Materials and Methods

Materials

The cocoons of *B. mori* Thai silkworm “hybrid silkworm (J108 X Nanglai strain)” were a kind gift from Queen Sirikit Sericulture Center, Sisaket province, Thailand. Anionic surfactants including sodium octyl sulfate (SOS, molecular weight 232.27 g/mol), sodium dodecyl sulfate (SDS, molecular weight 288.38 g/mol), and sodium tetradecyl sulfate (STS, molecular weight 316.43 g/mol) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The chemical structures and characteristics of the three anionic surfactants were presented in Table 1. Other chemicals used were analytical grade.

Preparation of regenerated SF solution

The silk cocoons were boiled in 0.02 M sodium carbonate (Na_2CO_3) for 20 min and then washed with deionized water to remove sericin. The degummed SF was dissolved in 9.3 M Lithium Bromide (LiBr) at 60°C for 4 h. The SF solution was then dialyzed against deionized water for 3 days using dialysis membrane (MWCO 12,000-16,000, Vikase Company Inc., Japan) to remove salts [22]. The dialyzed SF solution was centrifuged at 9000 rpm for 20 min to remove impurities. The final concentration of the obtained SF solution was approximately 6-7%wt.

Evaluation of critical micellar concentration of anionic surfactants

Three types of anionic surfactants (SOS, SDS and STS) were dissolved in DI water (pH ~6) and 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid buffer (HEPES buffer, pH 7.4) at various concentrations. The critical micellar concentration (CMC) of the anionic surfactants was determined by the absorbance deviation method using a spectrophotometer at

the absorbance of 250 nm [23]. The CMCs of different surfactants are estimated from the break point in the surface tension versus (log) concentration plot.

Determination of zeta potential

Three types of anionic surfactants (SOS, SDS and STS) were dissolved in DI water (pH ~6) or 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid buffer (HEPES buffer, pH 7.4) at 0.25%wt. The mixed solutions of SF (2%wt.) and anionic surfactants at various concentrations (0.03, 0.09, 0.15, and 0.45%wt.) were prepared in HEPES buffer (pH 7.4). The zeta potentials of anionic surfactants and the mixed SF+anionic surfactants were measured by Zetasizer Nano (Malvern Instrument) at 37°C. The zeta potential was automatically calculated using Smoluchowski equation ($n = 3$).

Formation of SF hydrogels

The SF solution was mixed with various concentrations of anionic surfactants prepared in HEPES buffer (pH 7.4) at a volumetric ratio of 1:1 and incubated at 37°C. The final concentration of SF was fixed at 2%wt while that of anionic surfactants were varied at 0.03, 0.09, 0.15, 0.21, 0.27, 0.33, 0.39, and 0.45%wt. For the curcumin-encapsulated hydrogels, curcumin (0.7 mg/ml) was dissolved in STS (0.09, 0.15, and 0.45%wt). Then, the curcumin in STS was mixed with SF solution at a volumetric ratio of 1:1 and incubated at 37°C.

Measurement of gelation time of SF hydrogels

The sol-gel transition and gelation time of SF solution mixed with various concentrations of anionic surfactants at pH 7.4, 37°C were evaluated from the change of solution turbidity using a spectrophotometric method. The mixed solutions were pipetted into 96 well UV-transparent plates (Corning, USA). The dynamic optical density of the solution

was measured at a wavelength of 550 nm every 2 min for 120 min using a microplate reader (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Germany). The gelation time was determined from a half-maximum optical density value.

Fourier transform infrared spectroscopic analysis

Chemical structure and functional groups presented in the SF+anionic surfactant hydrogels were examined using Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy (Perkin-Elmer, USA). The FT-IR analysis was based on the identification of absorption bands concerned with the vibrations of functional groups presented in the samples. All spectra were recorded in the wavenumber range from 4000 to 500 cm^{-1} at a resolution of 4 cm^{-1} . The beta sheet content within the amide I region (1590–1710 cm^{-1}) was quantified by Fourier self-deconvolution and peak fitting using OMNIC™ software (Thermo Scientific, USA). Peaks were fit using 11 Gaussian line shape profiles assigned to positions reported in previous work [24]. The beta sheet structure of SF was assigned at 1616–1637 and 1697–1703 cm^{-1} [25], and the relative structures (tyrosine, random coil, alpha helix, and beta turn) were calculated from the ratio of area under the curve for beta sheet peaks to that of the whole deconvoluted spectra. Furthermore, the stability in chemical structure of the SF+0.09%wt STS hydrogel when incubated at 37°C for different periods (10 min to 3 days) were also examined using FT-IR, comparing with the SF solution and the self-gelled SF.

Evaluation of gel fraction of SF hydrogels

The SF+anionic surfactant hydrogels were freeze-dried and weighed (W_0). The dried samples were immersed in deionized water at 37°C for 24 h. After that, the remained samples were collected and dried in an oven at 50°C. The weights of dried samples remained were

measured (W_t). The gel (crosslinked) fraction of samples was calculated from the following equation;

$$\% \text{ gel fraction of hydrogel} = \frac{W_t}{W_0} \times 100$$

Where W_t is the weight of dried sample remained after immersed in DI water for 24 h and W_0 is the weight of dried sample before immersion (n= 3).

Evaluation of maximum solubility of curcumin in anionic surfactants

Curcumin (1 mg/ml) was dissolved in various concentrations of anionic surfactants (0.03, 0.09, 0.15, 0.21, 0.27, 0.33, 0.39, and 0.45%wt). The curcumin suspension was incubated at 37°C under shaking at 200 rpm for 24 h. After that, the non-solubilized curcumin was separated by centrifugal at 2000 rpm and dried at 60°C. The dried weight of non-solubilized curcumin was measured and the maximum concentration of curcumin which can be dissolved in anionic surfactant was calculated (n = 3).

In vitro degradation test of SF hydrogels

The SF+anionic surfactant hydrogels were freeze-dried and weighed (W_0). The dried samples were immersed in normal saline solution containing Protease XIV (3 units/ml, pH 5.5) at 37°C. At the pre-determined time points, the remained samples were collected and dried in an oven at 50°C. The weights of dried samples remained were measured (W_t). The percentage of weight remaining of each hydrogel was calculated from the following equation;

$$\% \text{ weight remaining of hydrogel} = \frac{W_t}{W_0} \times 100$$

Where W_t is the weight of dried sample remained after immersed in collagenase solution for different periods and W_0 is the weight of dried sample before immersion (n= 3).

In vitro release test of curcumin from SF hydrogels

The curcumin-encapsulated SF+STS hydrogels (D = 1 cm, H = 0.5 cm) were immersed in normal saline solution containing Protease XIV (3 units/ml, pH 5.5) at 37°C. At the pre-determined time points, the supernatant was collected to measure the optical density of curcumin at a wavelength of 430 nm. The concentration of curcumin released was determined from the standard curve of curcumin prepared in the same medium at known concentrations. The accumulative release of curcumin along the study was evaluated (n = 3).

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using one-way ANOVA by IBM SPSS Statistics software (Version 22). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$. All data were expressed as the mean $\pm$ the standard deviation.

Results

Critical micelle concentration of anionic surfactants

Table 1 presents the critical micelle concentrations (CMC) of SOS, SDS, and STS prepared in HEPES buffer (pH 7.4), as evaluated by the spectrophotometric absorbance deviation method. The CMCs of SOS, SDS, and STS were 3, 0.25, and 0.065%, respectively.

Zeta potential of anionic surfactants and the SF+anionic surfactants

Zeta potentials of SOS, SDS, and STS prepared in HEPES buffer (pH 7.4) were shown in Table 1. SOS had the lowest negative charge (-23.43 mV), followed by SDS (-52.36 mV) while STS had the highest negative charge (-68.00 mV). Table 2 presents the zeta potentials of the mixed solutions of SF (2%) and anionic surfactants (SOS, SDS, and STS) at different concentrations (0, 0.03, 0.09, 0.15, and 0.45%). The zeta potential of SF solution alone was -2.98 mV while the mixed solutions of SF+anionic surfactant showed more negative charge. The zeta potentials of the SF+SOS solutions were around -4.61 to -4.92 mV irrespectively of the SOS concentration. On the other hand, the zeta potentials of the SF+SDS and SF+STS solutions were concentration dependent. The zeta potentials showed higher negative charge when the concentration of SDS and STS was increased. The SF+STS solutions showed the highest negative charge when compared with the SF+SOS and SF+SDS solutions at the same anionic surfactant concentration. Noticeably, there was a significant change in zeta potential at a particular concentration range of SDS and STS. For example, the difference in zeta potential between SF+0.09% SDS and SF+0.15% SDS was around 15 mV (difference between -7.90 and -22.90 mV) while that of the SF+0.03% STS and SF+0.09% STS was around 9 mV (difference between -9.54 and -18.13 mV).

Table 1. Chemical structure and characteristics of 3 types of anionic surfactants: sodium octyl sulfate (SOS), sodium dodecyl sulfate (SDS), and sodium tetradecyl sulfate (STS).

	SOS	SDS	STS
Molecular structure	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{ONa}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{ONa}$	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_2-\text{O}-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\text{S}}}-\text{ONa}$
	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{Na SO}_4$	$\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaSO}_4$	$\text{C}_{14}\text{H}_{29}\text{NaSO}_4$
Number of CH₂	7	11	13
Molar mass (g/mol)	232.27	288.38	316.43

CMC	3	0.25	0.065
(%wt., pH 7.4)			
Zeta potential	-23.43 ± 2.89	-52.36 ± 0.72	-68.00 ± 7.14
(mV)			

228

229

230 **Table 2.** Zeta potentials of the mixed solutions of SF (2%wt.) and anionic surfactants (SOS,

231 SDS, and STS) at different concentrations (0, 0.03, 0.09, 0.15, and 0.45%wt.).

Thai silk fibroin solution	Type of anionic surfactants	Concentration of anionic surfactants (%wt)				
		0	0.03	0.09	0.15	0.45
2%wt SF	SOS		-4.71±0.39	-4.89±0.32	-4.92±0.06	-4.61±0.30
	SDS	-2.98±0.31	-7.56±0.76	-7.90±1.13	-22.90±7.65*	-24.93±1.10*
	STS		-9.54±0.63	-18.13±7.38	-24.40±3.24*	-25.20±1.73*

232

233 * a significant difference at $p < 0.05$ comparing with the values of 0.03% anionic surfactant
234 within the same group of anionic surfactants

235

236 *Sol-gel transition and gelation time of SF hydrogels*

237 Figure 1 demonstrates the dynamic change in optical density of 2% SF sol-gel
238 induced by addition of SDS and STS at various concentrations. The profiles of SF sol-gel
239 transition were governed by the concentration of anionic surfactants added. In the case of
240 SDS, it seemed that the SDS concentration between 0.15-0.39% accelerated the gelation of
241 SF to occur within 14-20 min (Table 3). On the other hand, the low (0.03 and 0.09%) and
242 high concentrations (0.45%) of SDS delayed the gelation process to 24-42 min. The similar

profiles of SF sol-gel transition and gelation time (20-30 min) were obtained when STS at 0.09-0.45% were added (Table 3). Interestingly, SOS at any concentrations extended the gelation time to 113-144 h, compared to the SDS and STS. Furthermore, it was observed that the optical density of the completely gelled SF depended on the concentrations of anionic surfactants added (Figure 1), indicating the different transparency levels of the final SF hydrogels. Figure 2 revealed the appearance of 2% SF hydrogels induced by addition of SOS, SDS or STS at various concentrations. The images confirmed that the color and turbidity of the completely gelled SF were varied upon type of anionic surfactant and its concentration. The SF+SOS hydrogels showed more turbidity than the SF+SDS and SF+STS hydrogels.

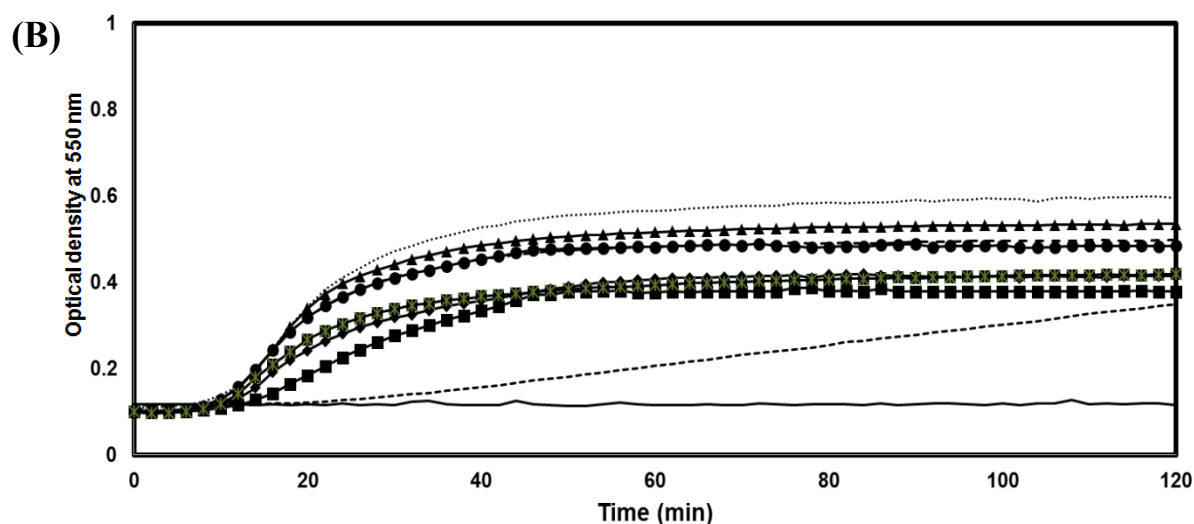
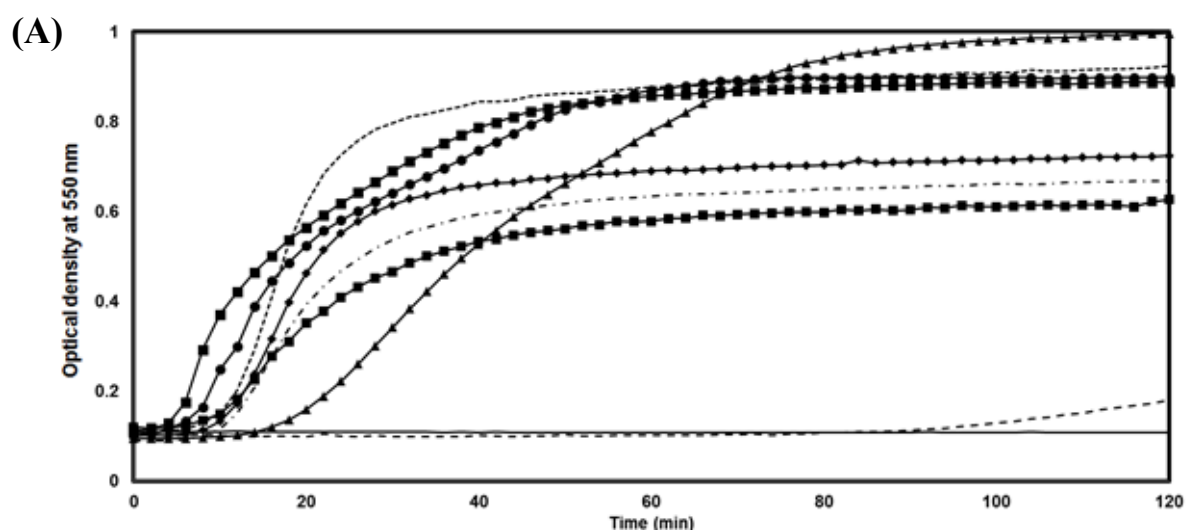


Figure 1. Dynamic optical density of SF (2%wt) sol-gel transition induced by the addition of (A) SDS and (B) STS at various concentrations (— 0.00, - - - 0.03, —▲— 0.09, —■— 0.15, —●— 0.21, - - - - 0.27, —◆— 0.33, - · - 0.39 and —■— 0.45%wt.) and incubated at 37°C, pH 7.4.

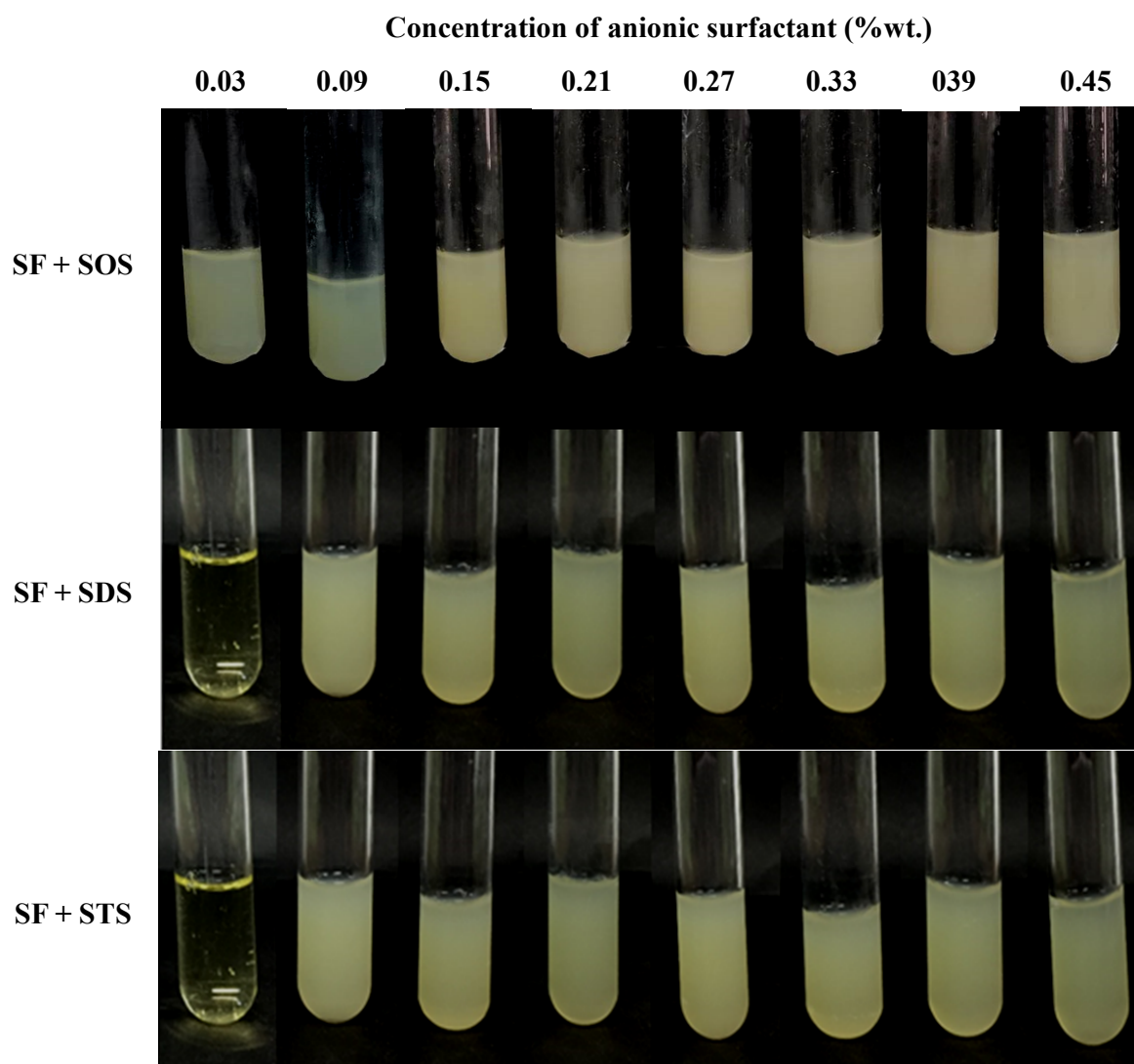
Table 3. Gelation time of SF hydrogels induced by addition of SOS, SDS or STS at various concentrations (0.03, 0.09, 0.15, 0.21, 0.27, 0.33, 0.39, and 0.45% wt.).

Concentration of SF (%wt.)	Concentration of anionic surfactant (%wt.)	Gelation time (min)		
		SOS	SDS	STS
2	0.00		N/D**	N/D**
	0.03		N/D**	N/D**
	0.09		42	20
	0.15		14	30
	0.21	113-144 h*	18	28
	0.27		18	24
	0.33		20	30
	0.39		20	30
	0.45		24	30

* The gelation process was measured by sloping the tube at 45°, 90°, and 180°

** N/D The gelation process was not completed within 120 min, as measured by optical density at 550 nm.

274



275

276 **Figure 2.** Appearance of SF hydrogels induced by the addition of SOS, SDS or STS at
277 various concentrations (0.03, 0.09, 0.15, 0.21, 0.27, 0.33, 0.39, and 0.45%wt.).

278

279

280

281

282

283 *Chemical structure of SF hydrogels*

284 The FT-IR spectra of self-gelled SF, the SF+anionic surfactant hydrogels, and STS
 285 are presented in Figure 3. The spectra of self-gelled SF and the SF+anionic surfactant
 286 hydrogels showed the characteristic peaks of protein including amide I, II, and III at 1650,
 287 1550, and 1300 cm^{-1} , respectively. The characteristic peaks of anionic surfactants, CH_3 and
 288 CH_2 stretch at around 2955, 2873, 2849 cm^{-1} and sulfate group at 1200-1140 cm^{-1} , were
 289 clearly observed on the spectra of all SF+anionic surfactant hydrogels. The CH stretch peaks
 290 seemed to be dominant when the concentration of anionic surfactant was higher. The
 291 difference in spectra among SF hydrogels formed by three anionic surfactants was not
 292 noticed. Table 4 demonstrates the percentage of secondary structures of each SF+anionic
 293 surfactant hydrogel obtained from deconvolution of amide I band of FT-IR spectra. For the
 294 self-gelled SF, the percentages of tyrosine, beta sheet, random coil, alpha helix, and beta turn
 295 were 3.86, 33.17, 9.00, 9.31, and 24.59%, respectively. The beta sheet percentages of all
 296 SF+anionic surfactant hydrogels were slightly increased to 34-49% compared to that of the
 297 self-gelled SF (33.17%). It was noted that the SF+0.09% STS hydrogel showed obviously
 298 high beta sheet percentage (49.15%) compared to the other hydrogels. Figure 4 shows the FT-
 299 IR spectra of the SF+0.09% STS hydrogel after incubated at 37°C for 10 min to 3 days,
 300 comparing to those of SF solution and self-gelled SF. At 10 and 20 min, the SF+0.09% STS
 301 remained the solution state, the characteristic peaks of amide I, II, and III were similar to
 302 those of SF solution. On the other hand, the spectra of SF+0.09% STS after gelled for 2 h, 1
 303 day, and 3 days likely resemble to the spectra of self-gelled SF. The significant difference in
 304 spectra of SF+0.09% STS hydrogel incubated at 2 h, 1 day, and 3 days was not observed.

305

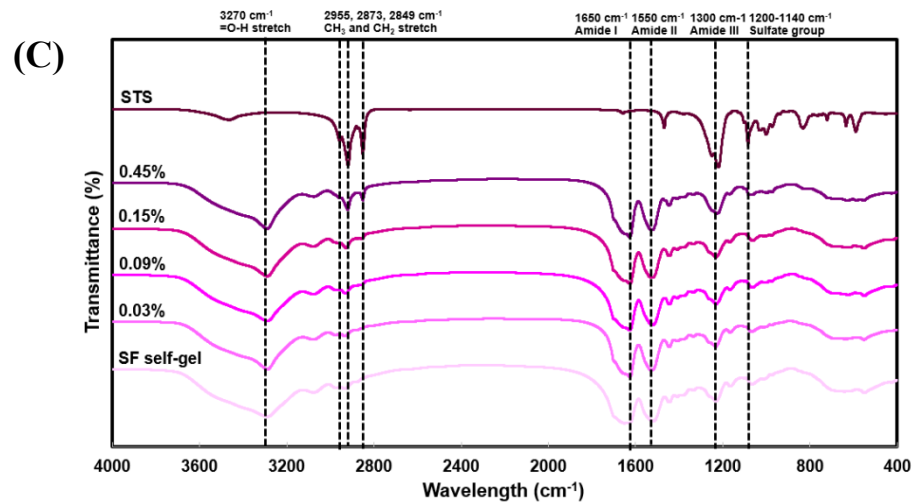
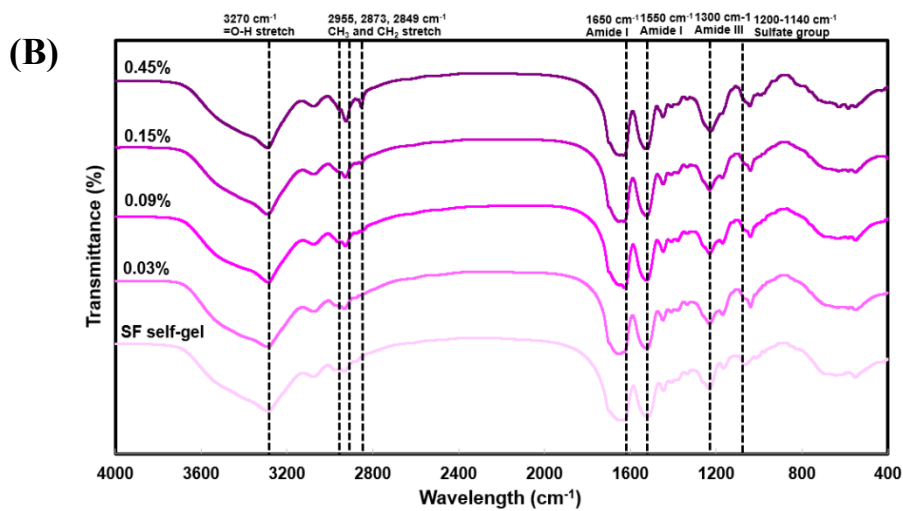
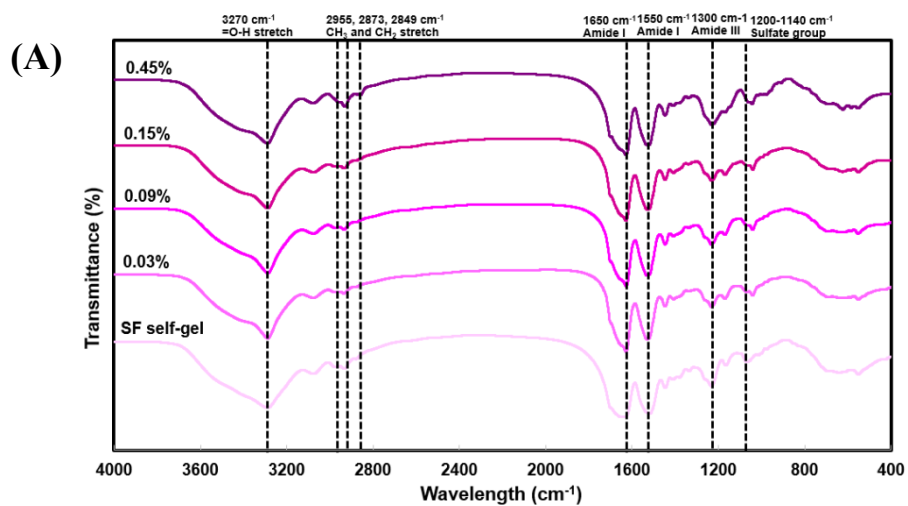


Figure 3. FT-IR spectra of SF hydrogels induced by the addition of (A) SOS, (B) SDS and (C) STS at various concentrations (— 0.00, — 0.03, — 0.09, — 0.15, — 0.45%wt.).

Table 4. Percentage of secondary structures of SF hydrogels induced by addition of SOS, SDS and STS at various concentrations (0.00, 0.03, 0.09, 0.15, and 0.45%wt.), as obtained from deconvolution of amide I band of FT-IR spectra.

Hydrogels	Percentage of secondary structure (%)				
	Tyrosine, 1590-1605 cm ⁻¹	Beta sheet, 1608-1637 and 1697-1700 cm ⁻¹	Random coil, 1638-1653 cm ⁻¹	Alpha helix, 1654-1662 cm ⁻¹	Beta turn, 1663-1696 cm ⁻¹
2% Self-gelled SF	3.86	33.17	9.00	9.31	24.59
2%SF +	0.03% SOS	2.13	36.78	11.27	10.44
	0.09% SOS	1.11	38.17	10.37	25.56
	0.15% SOS	1.61	36.72	10.47	15.97
	0.45% SOS	0.60	38.11	9.57	19.88
					31.83
2%SF +	0.03% SDS	3.07	34.63	19.53	-
	0.09% SDS	3.17	35.03	8.95	10.85
	0.15% SDS	2.41	36.84	12.79	15.11
	0.45% SDS	3.03	34.18	12.06	14.71
					27.60
2%SF +	0.03% STS	5.26	35.54	13.23	20.28
	0.09% STS	1.00	49.15	10.67	11.13
	0.15% STS	7.52	38.66	9.27	19.21
	0.45% STS	6.10	39.05	9.25	19.73
					25.88

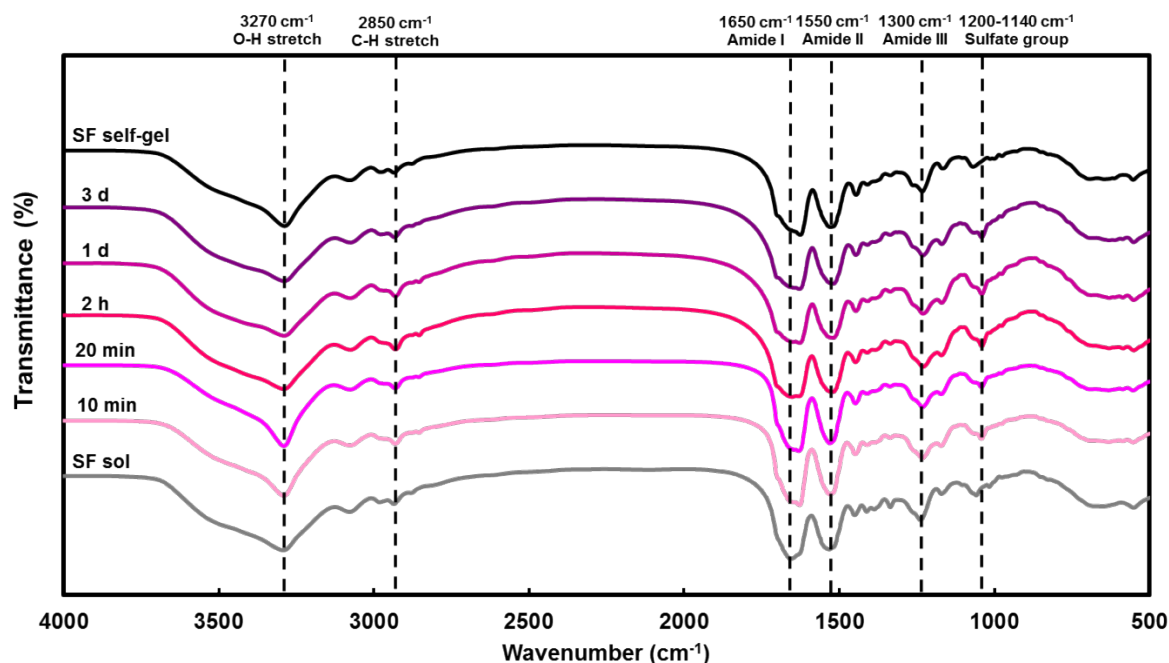


Figure 4. FT-IR spectra of SF hydrogels induced by the addition of 0.09%wt. STS and incubated at 37°C for (—) 10 min, (—) 20 min, (—) 2 h, (—) 1 day, (—) 3 days, comparing with (—) SF solution and (—) self-gelled SF.

Gel fraction of SF hydrogels

Gel fraction of the SF+anionic surfactant hydrogels is presented in Figure 5. All hydrogels had 60-80% gel (water insoluble) fraction. This implied that around 20-40% of the hydrogel was solubilized in water after incubated for 24 h. It was noted that the hydrogels prepared from high concentration of anionic surfactants (0.45%) had lower gel fraction than

the hydrogels prepared from low concentrations of anionic surfactant. However, the statistical difference in gel fraction among hydrogel groups was not found.

Maximum solubility of curcumin in anionic surfactants

Maximum solubility of curcumin in various concentrations of three anionic surfactants is shown in Figure 6. It was clear that STS at 0.18-0.9% could solubilize curcumin upto 0.7-0.9 mg/ml while all concentrations of SOS and SDS solubilized curcumin only 0.1-0.4 mg/ml.

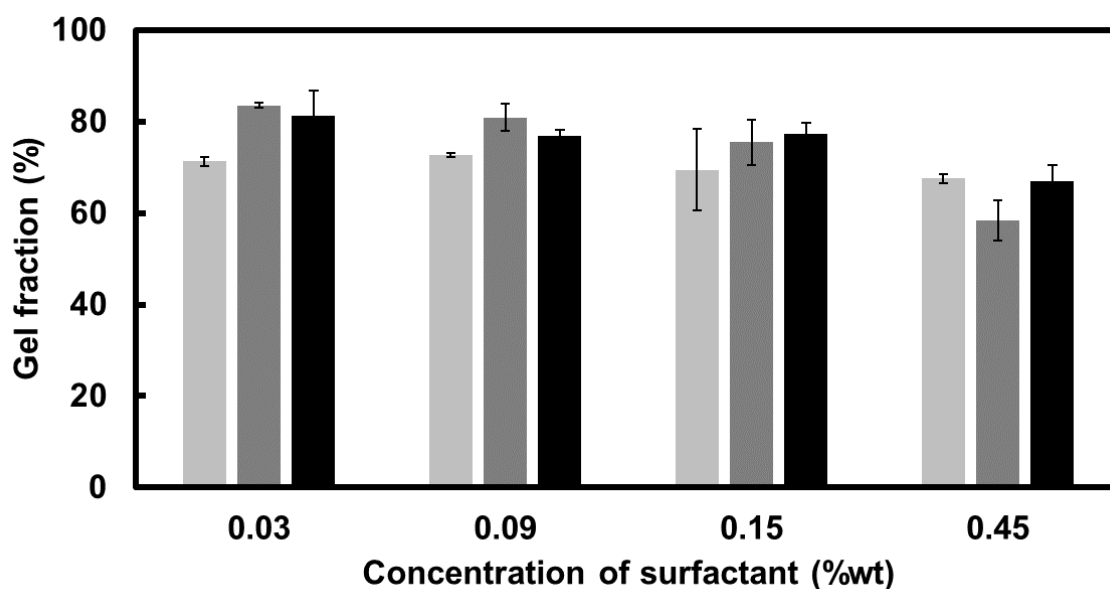


Figure 5. Gel (water insoluble) fraction of SF hydrogels induced by the addition of (■) SOS, (■) SDS and (■) STS at various concentrations (— 0.03, — 0.09, — 0.15, and — 0.45%wt.).

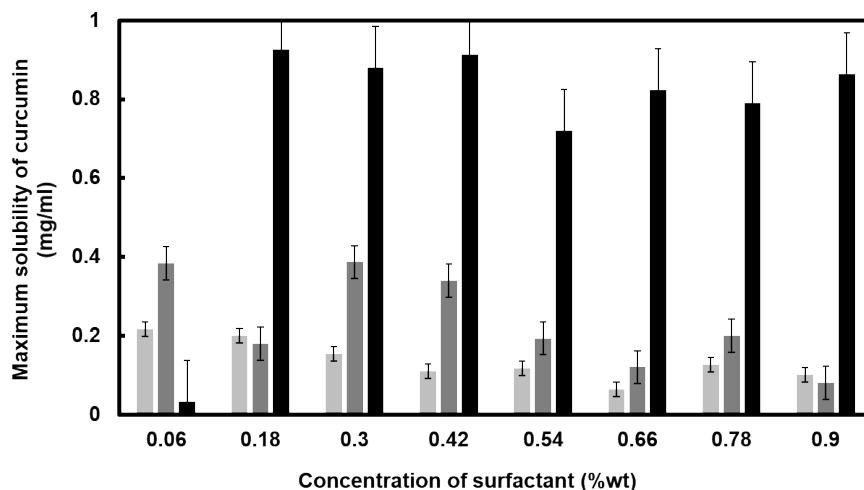


Figure 6. Maximum solubility of curcumin in (■) SOS, (■) SDS and (■) STS prepared in HEPES buffer (pH 7.4) at various concentrations (0.06, 0.18, 0.30, 0.42, 0.54, 0.66, 0.78, and 0.90 wt%).

In vitro degradation profile of SF hydrogels

Figure 7 shows *in vitro* degradation profile of the SF+STS hydrogels after incubated in normal saline solution containing Protease XIV (3 units/ml, pH 5.5) at 37°C. All hydrogels simultaneously degraded along 7 days. The SF+0.09% STS hydrogels degraded at slower rate than the other two hydrogels. The remaining weight of SF+0.09% STS hydrogel after 7 days was 68% while the remaining weights of SF+0.15% STS and SF+0.45% STS hydrogels were only 46-50%.

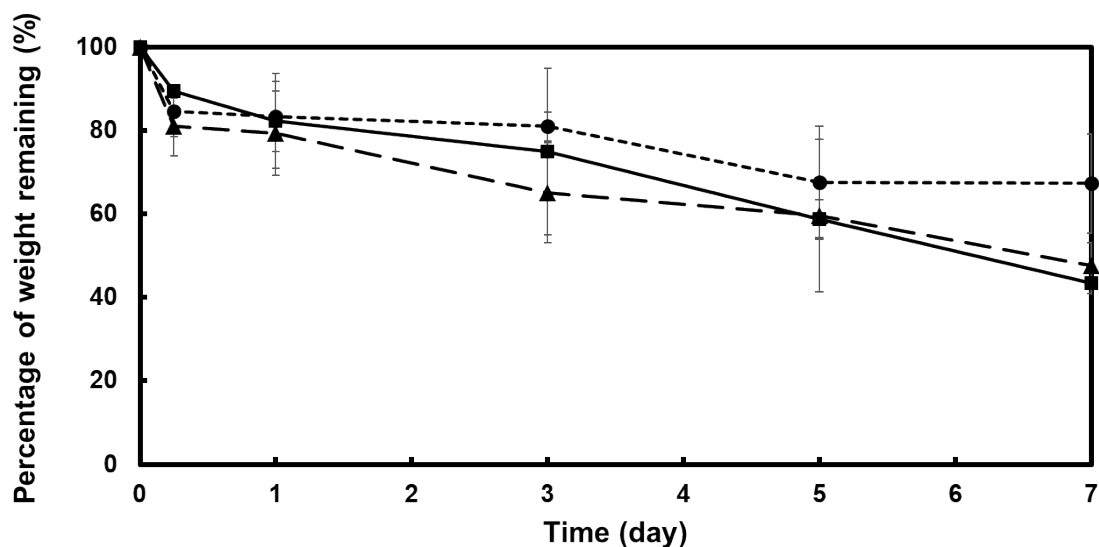


Figure 7. *In vitro* degradation profiles of SF hydrogels induced by the addition of STS at various concentrations (---●--- 0.09, —▲— 0.15, and —■— 0.45%wt.) and incubated in normal saline solution containing Protease XIV (3 units/ml, pH 5.5) at 37°C.

In vitro release profile of curcumin from SF hydrogels

Figure 8 shows *in vitro* release profiles of curcumin from the SF+STS hydrogels after incubated in normal saline solution containing Protease XIV (3 units/ml, pH 5.5) at 37°C. Curcumin continually released from all hydrogels along 9 days. The release of curcumin became stable after 7 days. It was noted that the SF+0.09% STS hydrogel released curcumin at the slower rate than the other two hydrogels. The accumulative percentage of curcumin released from SF+0.09% STS hydrogel after 9 days was 66% while those of SF+0.15% STS and SF+0.45% STS hydrogels were as high as 80-85%.

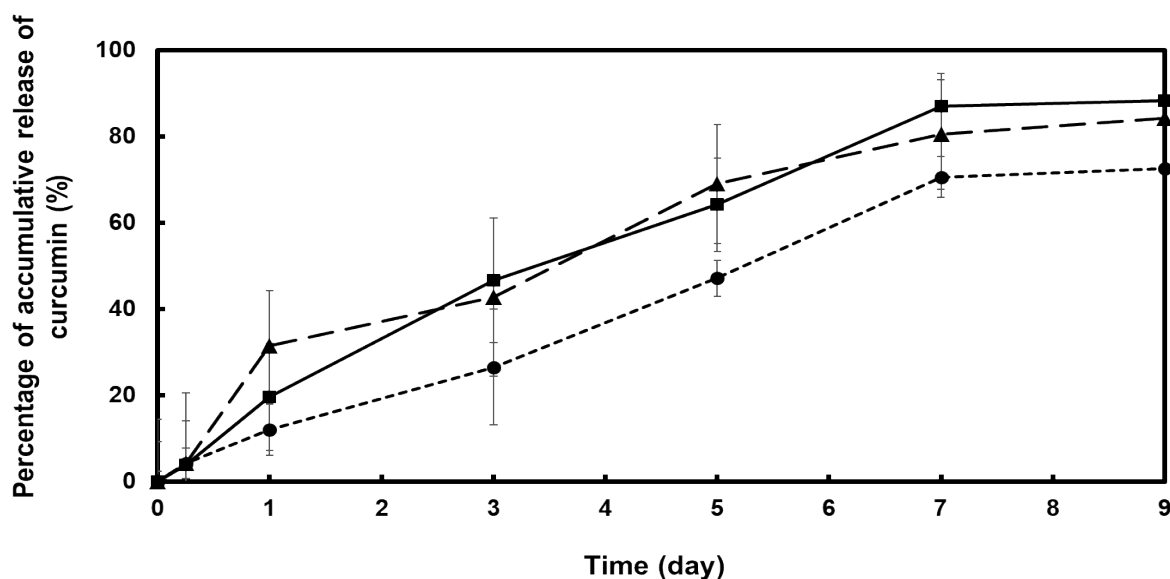


Figure 8. *In vitro* release profiles of curcumin from SF hydrogels induced by the addition of STS at various concentrations (● 0.09, ▲ 0.15, and ■ 0.45%wt.) and incubated in normal saline solution containing Protease XIV (3 units/ml, pH 5.5) at 37°C.

Discussion

Hydrogel is the form of cross-linked polymeric material which has capability to hold large amount of water in their three-dimensional networks [26]. The advantages of hydrogel over other forms of materials are the high degree of flexibility very similar to natural tissue and high ability of drug encapsulation. The hydrogel is therefore introduced in wide range of applications. One application of hydrogel is drug delivery system in which it can be applied as minimal invasive injectable form [11-12]. The hydrogel fabricated from SF has been reported in many researches. Due to the nature of SF secondary structure, various techniques such as physical factors [13-17], chemicals [18-20], or radiation [27] can be used to induce SF hydrogel formation by changing the secondary structure to a stable beta sheet form. SDS, an anionic surfactant, was reported to accelerate the gelation of SF [21]. In this study, we

introduced other 2 anionic surfactants, SOS and STS, to form Thai SF hydrogel in comparison with SDS (Table 1). SOS and STS are anionic surfactants which have similar chemical structure but their molecular weight and number of CH₂ (alkyl chain length) are lower and higher than SDS, respectively. The effects of charge, alkyl chain length, and concentration of these 3 anionic surfactants (SOS, SDS, and STS) on the gelation time and physico-chemical properties of Thai SF hydrogels were here reported.

We found that the mixing of anionic surfactants with SF solution at a particular ratio (1:1 by volume) could form the hydrogels within 14 min to 144 h depending on the type of anionic surfactant and its concentration (Table 3). It was clear that SOS which has short alkyl chain length (number of CH₂ = 7, MW = 232.27 g/mol) and low negative charge (-23.43 mV) slowly gelled the SF compared with the SDS and STS which have longer alkyl chain length (number of CH₂ = 11 and 13, MW = 288.38 and 316.43 g/mol, respectively) and higher negative charge (-52.36 and -68.00 mV, respectively). Interestingly, we observed that either SDS or STS formed the SF hydrogel at the fastest rate when mixing at optimal concentration. The optimal concentrations of SDS and STS at 0.15 and 0.09% resulted in the hydrogels formation within 14 and 20 min, respectively. On the other hand, the lower and higher concentrations of SDS and STS than the optimum significantly delayed the gelation time to 18-42 min. The chemical structure of the completely gelled hydrogels analyzed by FT-IR demonstrated the presence of characteristic peaks of protein (amide I, II, III) and anionic surfactant (CH₃ and CH₂ stretch and sulfate group) in all hydrogels (Figure 3) [28, 29, 30]. The deconvolution of amide I band of FT-IR spectra indicated that the addition of anionic surfactant particularly of STS at 0.09% tended to form the SF hydrogels with higher beta sheet extent than the case of self-gelled SF [20, 30, 31]. The charge of anionic surfactants also played a significant role in controlling the gelation rate [21]. We here elucidate that there was a significant change in charge of the mixed SF+anionic surfactant solution at a particular

concentration range of anionic surfactant (Table 2). This range of concentration was rather close to the optimal concentration that fastest gelled the SF (SDS ~0.15% and STS ~0.09%). The charge effect of anionic surfactant was also clearly seen from the delayed gelation time when the concentrations of SDS and STS were increased (Table 3). The proposed mechanisms of SF gelation induced by anionic surfactants in this study were summarized in Figure 9. The anionic surfactants formed micellar structure in aqueous solution. When the anionic surfactant was mixed with SF solution, some micelles were remained and interacted electrostatically with positive-charged domain of SF chains while some alkyl chain (hydrophobic tail) of anionic surfactant were attached on hydrophobic domain of SF chains to induce beta sheet formation. In case of SOS at any concentrations, the alkyl chain was short and number of micelle was low so that the gelation by these two mechanisms was slowly occurred. There would also be self-transition of beta sheet structure of SF occurred simultaneously. On the other hand, SF solution in the presence of SDS or STS at optimal concentration was gelled at the fastest rate possibly due to the balance between hydrophobic and electrostatic interactions while the number of negative-charged SDS or STS was not too high to obstruct these interactions. Moreover, it was supposed that the long alkyl chain (hydrophobic tail) of SDS or STS had more possibility to interact at several hydrophobic domain of SF, then the beta sheet structure was formed quickly. However, the high concentration of SDS or STS increased the negative charge which may induce repulsive force with the abundant negative charges of SF molecules, resulted in the slightly delayed gelation time. Wu et al. also reported that some concentrations of SDS accelerated the gelation of SF in the order of minutes due to the strong hydrophobic forces and electrostatic effects triggered by the surfactant, leading to protein unfolding and rapid association into particles and organization of gel network [21].

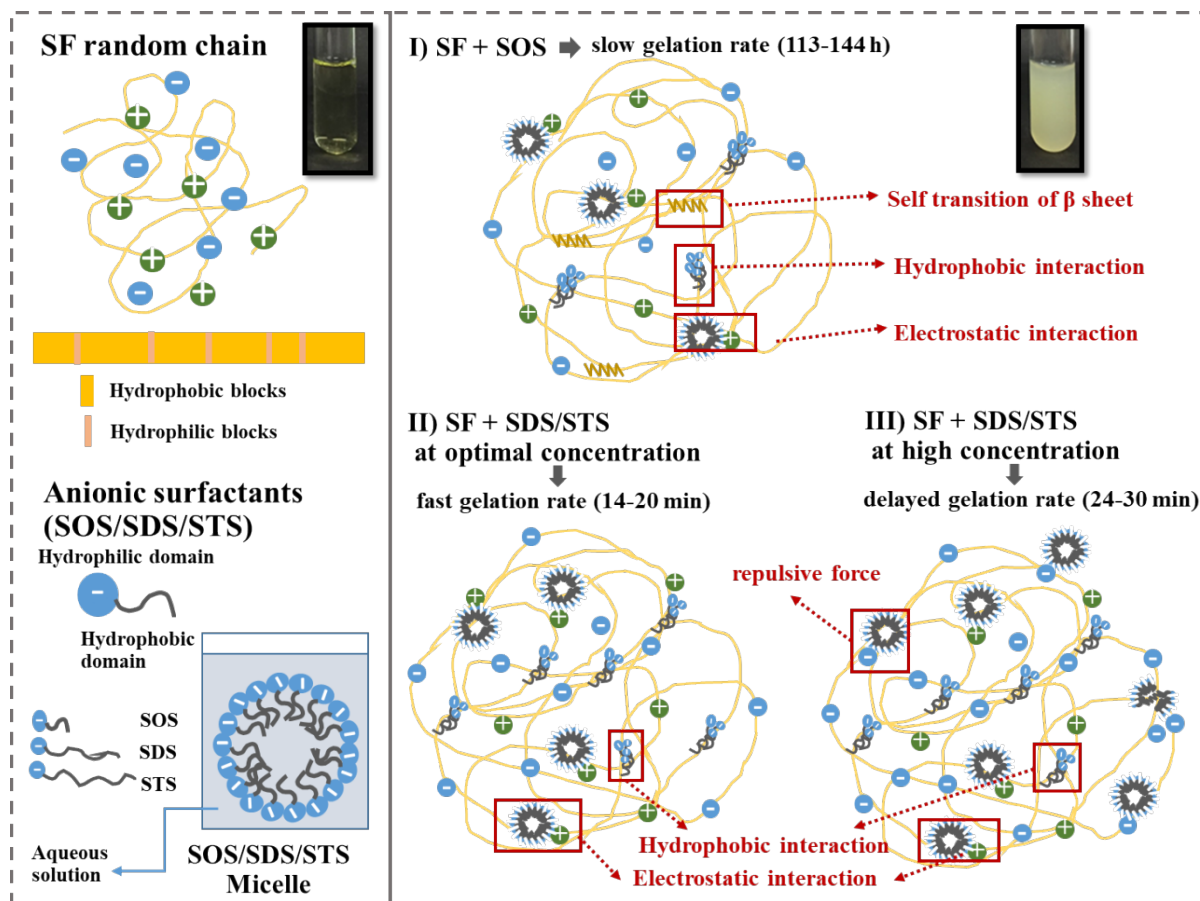


Figure 9. The scheme showing the proposed mechanisms of SF gelation induced by anionic surfactants (SOS, SDS, and STS) at different concentrations.

The SF hydrogels developed in this study was used to encapsulate and controlled release of curcumin. The solubility of curcumin in each anionic surfactant was determined. We found that 0.18-0.9% STS could solubilize curcumin upto 0.7-0.9 mg/ml. This was explained by the lowest CMC of STS which allowed STS to form micelle easily at lower concentration than the SOS and SDS. It is known that the micelle increased the solubility of hydrophobic molecule like curcumin [32, 33]. Due to the high solubility of curcumin, STS was therefore selected for further investigation of this study. Furthermore, STS has been used in medical products approved by the U.S. Food and Drug Administration (US-FDA). Curcumin (0.7 mg/ml) was dissolved in STS at the concentrations selected from the previous data (0.09, 0.15, and 0.45%). The SF+0.09% STS hydrogel degraded in proteinase solution at

the slowest rate. This was possibly due to the significantly higher beta sheet percentage in its secondary structure (Table 4), resulting in the more stable structure than the other two hydrogels (SF+0.15% STS and SF+0.45% STS hydrogels). The release profiles of curcumin also showed the slower rate for the case of SF+0.09% STS hydrogel (Figure 8) because the slow-degrading hydrogel would sustain the release of curcumin, compared to the fast-degrading hydrogel. The main mechanism that governed the release of curcumin from the hydrogel was supposed to be hydrogel degradation rather than the diffusion because curcumin was encapsulated within SF hydrogel and there would be some hydrophobic interaction between curcumin and SF molecules [34, 35]. The gel fraction result also supported the proposed release mechanism of curcumin. Only 20-30% hydrogel was solubilized in water, therefore the remaining of 70-80% would be degraded by enzyme reaction (Figure 5).

Finally, the stability in chemical structure of the SF+0.09% STS hydrogel after completely gelled was confirmed (Figure 4). The chemical structure of the hydrogel did not change significantly after it was completely gelled. In conclusion, the SF hydrogels formed by the induction of anionic surfactant, particularly 0.09% STS, showed the shortest gelation time, higher beta sheet percentage in its secondary structure, stable chemical structure, slow degradation rate and slow curcumin release rate. We also elucidated the effect of various anionic surfactants having similar chemical structure but different alkyl chain lengths and charges on the gelation time and properties of SF hydrogels obtained. This investigation would ensure us to understand the mechanism of SF gelation induced by anionic surfactant as proposed in this study.

Conclusions

SF hydrogels were formed by the induction of various anionic surfactants (SOS, SDS, and STS) which have similar chemical structure but different alkyl chain lengths and charges. The effects of alkyl chain length, charges, and concentrations of anionic surfactants on the SF gelation time were shown. SDS and STS accelerated the gelation of SF in a concentration dependent, the higher concentration of SDS and STS delayed the gelation rate due to the repulsive force of negative charge between anionic surfactant and SF molecules. The SF hydrogels induced by STS which has longest alkyl chain and highest negative charge, particularly at 0.09% STS, showed the shortest gelation time, more beta sheet percentage in its secondary structure, stable chemical structure, slow rate of degradation and curcumin release. The mechanisms of gelation of SF induced by anionic surfactants were supposed to be the combination of hydrophobic and electrostatic interactions, as well as the self-transition of beta sheet (only in case of SOS). This hydrogel was suggested for the use as a minimal invasive injectable hydrogel which can encapsulate and control release of curcumin or other drugs.

Acknowledgement

Financial supports from the Thailand Research Fund (TRG5880213) and Chulalongkorn University are gratefully acknowledged.

References

- 490 [1] C. Correia, S. Bhumiratana, L.P. Yan, A.L. Oliveira, J.M. Gimble, D. Rockwood, D.L.
491 Kaplan, R.A. Sousa, R.L. Reis, G. Vunjak-Novakovic, Development of silk-based scaffolds
492 for tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells, *Acta Biomater.* 8
493 (2012) 2483-2492.
- 494 [2] S. Hofmann, H. Hagenmuller, A.M. Koch, R. Muller, G. Vunjak-Novakovic, D.L.
495 Kaplan, H.P. Merkle, L. Meinel, Control of in vitro tissue-engineered bone-like structures
496 using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds, *Biomaterials* 28 (2007)
497 1152-1162.
- 498 [3] V. Karageorgiou, L. Meinel, S. Hofmann, A. Malhotra, V. Volloch, D.L Kaplan, Bone
499 morphogenetic protein-2 decorated silk fibroin films induce osteogenic differentiation of
500 human bone marrow stromal cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 71A (2004) 528-537.
- 501 [4] P. Amornsudthiwat, S. Damrongsakkul, Oxygen plasma etching of silk fibroin alters
502 surface stiffness: A cell—substrate interaction study, *Plasma Process. Polym.* 11 (2014) 763-
503 776.
- 504 [5] K. Lerdchai, J. Kitsongsermthon, J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul,
505 Thai silk fibroin/gelatin sponges for the dual controlled release of curcumin and
506 docosahexaenoic acid for anticancer treatment, *J. Pharm. Sci.* 105 (2016) 221-230.
- 507 [6] T. Wongputtaraksa, J. Ratanavaraporn, R. Pichyangkura, S. Damrongsakkul, Surface
508 modification of Thai silk fibroin scaffolds with gelatin and chitooligosaccharide for enhanced
509 osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *J. Biomed.*
510 *Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 100B (2012) 2307-2315.

- 511 [7] P. Thitiwuthikiat, M. Ii, T. Saito, M. Asahi, S. Kanokpanont, Y. Tabata, A vascular patch
512 prepared from Thai silk fibroin and gelatin hydrogel incorporating simvastatin-micelles to
513 recruit endothelial progenitor cells, *Tissue Eng. Part A* 21 (2015) 1309-1319.
- 514 [8] J. Ratanavaraporn, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, The development of injectable
515 gelatin/silk fibroin microspheres for the dual delivery of curcumin and piperine, *J. Mater.*
516 *Sci. Mater. Med.* 25 (2014) 401-410.
- 517 [9] M. Okhawilai, R. Rangkupan, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, Preparation of Thai
518 silk fibroin/gelatin electrospun fiber mats for controlled release applications, *Int. J. Biol.*
519 *Macromol.* 46 (2010) 544-550.
- 520 [10] S. Somvipart, S. Kanokpanont, R. Rangkupan, J. Ratanavaraporn, S. Damrongsakkul,
521 Development of electrospun beaded fibers from Thai silk fibroin and gelatin for controlled
522 release application, *Int. J. Biol. Macromol.* 55 (2013) 176-184.
- 523 [11] S. Yan, T. Wang, L. Feng, J. Zhu, K. Zhang, X. Chen, L. Cui, J. Yin, Injectable in situ
524 self-cross-linking hydrogels based on poly(l-glutamic acid) and alginate for cartilage tissue
525 engineering, *Biomacromolecules* 15 (2014) 4495-4508.
- 526 [12] L. Liu, Q. Gao, X. Lu, H. Zhou, In situ forming hydrogels based on chitosan for drug
527 delivery and tissue regeneration, *AJPS* 11 (2016) 673-683.
- 528 [13] Z.H. Ayub, K. Hirabayashi, M. Ara, Effect of pH on silk fibroin gelation, *Sen I*
529 *Gakkaishi* 48 (1992) 141-144.

- 530 [14] G.M. Nogueira, M.A. de Moraes, A.C.D. Rodas, O.Z. Higa, M.M. Beppu, Hydrogels
531 from silk fibroin metastable solution: Formation and characterization from a biomaterial
532 perspective, *Mater. Sci. Eng. C* 31 (2011) 997-1001.
- 533 [15] T. Yucel, P. Cebe, D.L. Kaplan, Vortex-induced injectable silk fibroin hydrogels,
534 *Biophys. J.* 97 (2009) 2044-2050.
- 535 [16] S.K. Samal, D.L. Kaplan, E. Chiellini, Ultrasound sonication effects on silk fibroin
536 protein, *Macromol. Mater. Eng.* 298 (2013) 1201-1208.
- 537 [17] Q. Lu, Y. Huang, M. Li, B. Zuo, S. Lu, J. Wang, H. Zhu, D.L. Kaplan, Silk fibroin
538 electrogelation mechanisms, *Acta Biomater.* 7 (2011) 2394-2400.
- 539 [18] G.D. Kang, J.H. Nahm, J.S. Park, J.Y. Moon, C.S. Cho, J.H. Yeo, Effects of poloxamer
540 on the gelation of silk fibroin, *Macromol. Rapid Commun.* 21 (2000) 788-791.
- 541 [19] S. Min, T. Nakamura, A. Teramoto, K. Abe, Preparation and characterization of
542 crosslinked porous silk fibroin gel, *Fiber* 54 (1998) 85-92.
- 543 [20] J.H. Park, M.H. Kim, L. Jeong, D. Cho, O.H. Kwon, W.H. Park, Effect of surfactants on
544 sol—gel transition of silk fibroin, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 71 (2014) 364-371.
- 545 [21] X. Wu, J. Hou, M. Li, J. Wang, D.L. Kaplan, S. Lu, Sodium dodecyl sulfate-induced
546 rapid gelation of silk fibroin, *Acta Biomater.* 8 (2012) 2185-2192.

- 547 [22] P. Jetbumpenkul, P. Amornsudthiwat, S. Kanokpanont, S. Damrongsakkul, Balanced
548 electrostatic blending approach: An alternative to chemical crosslinking of Thai silk
549 fibroin/gelatin scaffold. *Int. J. Biol. Macromol.* 50 (2012) 7-13.
- 550 [23] F. Ysambertt, F. Vejar, J. Paredes, J.L. Salager, The absorbance deviation method: a
551 spectrophotometric estimation of the critical micelle concentration (CMC) of ethoxylated
552 alkylphenol surfactants, *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 137 (1998) 189-196.
- 553 [24] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, Determining beta-sheet crystallinity in fibrous proteins by
554 thermal analysis and infrared spectroscopy, *Macromolecules* 39 (2006) 6161-6170.
- 555 [25] B. D. Lawrence, F. Omenetto, K. Chui, D.L. Kaplan, Processing methods to control silk
556 fibroin film biomaterial features, *J. Mater. Sci.* 43 (2008) 6967-6985.
- 557 [26] E.M. Ahmed, Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review, *J.*
558 *Adv. Res.* 6 (2015) 105-121.
- 559 [27] M.H. Kim, W.H. Park, Chemically cross-linked silk fibroin hydrogel with enhanced
560 elastic properties, biodegradability, and biocompatibility, *Int. J. Nanomedicine* 23 (2016)
561 2967-2978.
- 562 [28] C. Jung, Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier
563 transform infrared spectroscopy, *J. Mol. Recognit.* 13 (2000) 325-351.

- 564 [29] X. Hu, D. Kaplan, P. Cebe, Dynamic protein-water relationships during β -sheet
565 formation, *Macromolecules* 41 (2008) 3939-3948.
- 566 [30] R.B. Viana, A.B.F. da Silva, A.S. Pimentel, Infrared spectroscopy of anionic, cationic,
567 and zwitterionic surfactants, *Adv. Phys. Chem.* 2012 (2012), Article ID 903272.
- 568 [31] C.M. Deng, T.Y. Zhong, B.Q. Zuo, Surfactant-induced nanofibrous architecture of silk
569 fibroin hydrogels, *Mater. Sci. Forum.* 745-746 (2013) 453-458.
- 570 [32] J. Li, G.H. Shin, X. Chen, H.J. Park, Modified curcumin with hyaluronic acid:
571 Combination of pro-drug and nano-micelle strategy to address the curcumin challenge, *Food*
572 *Res. Int.* 69 (2015) 202-208.
- 573 [33] X. Li, T. Chen, L. Xu, Z. Zhang, L. Li, H. Chen, Preparation of curcumin micelles and
574 the in vitro and in vivo evaluation for cancer therapy, *J. Biomed. Nanotechnol.* 10 (2014)
575 1458-1468.
- 576 [34] N. Kasoju, U. Bora, Fabrication and characterization of curcumin-releasing silk fibroin
577 scaffold, *J. Biomed. Mater. Res B Appl. Biomater.* 100 (2012) 1854-1866.
- 578 [35] V. Gupta, A. Aseh, C.N. Ríos, B.B. Aggarwal, A.B. Mathur, Fabrication and
579 characterization of silk fibroin-derived curcumin nanoparticles for cancer therapy, *Int. J.*
580 *Nanomedicine* 4 (2009) 115-122.