


การเตรียมและการตรวจลักษณะสมบัติของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไซโคลเดกซ์ทริน

และสารพิษทางการเกษตร



นางสาว ฤतिकานต์ สายโกสินทร์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ

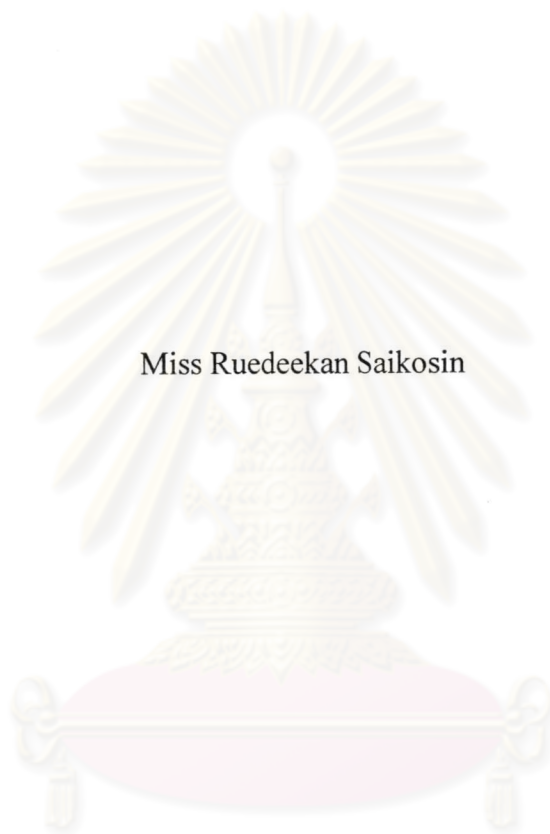
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-1153-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF INCLUSION COMPLEXES
BETWEEN CYCLODEXTRINS AND AGRICULTURAL TOXIC SUBSTANCES



Miss Ruedeekan Saikosin


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology

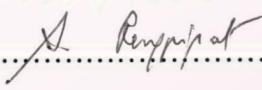
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001
ISBN 974-03-1153-9

Thesis Title Preparation and characterization of inclusion complexes
between cyclodextrins and agricultural toxic substances
By Miss Ruedeekan Saikosin
Field of study Biotechnology
Thesis Advisor Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.
Thesis Co-advisor Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.

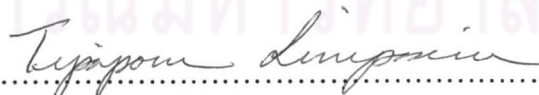
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master 's Degree



..... Deputy Dean for Administrative Affairs,
Acting Dean, Faculty of Science
(Associate Professor Pipat Karntiang, Ph.D.)

Thesis Committee


..... Chairman
(Associate Professor Sirirat Rengpipat, Ph.D.)


..... Thesis Advisor
(Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.)


..... Thesis Co-advisor
(Assistant Professor Tipaporn Limpaseni, Ph.D.)


..... Member
(Aroonsiri Shitangkoon, Ph.D.)

ฤดีกานต์ สายโกสินทร์ : การเตรียมและการตรวจลักษณะสมบัติของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างไซโคล
เดกซ์ทริน และสารพิษทางการเกษตร. (PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF INCLUSION
COMPLEXES BETWEEN CYCLODEXTRINS AND AGRICULTURAL TOXIC SUBSTANCES)

อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์ , 132 หน้า.
ISBN 974-03-1153-9.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ในสวนต้น เพื่อศึกษาปฏิกิริยาระหว่างบีตาไซโคลเดกซ์ทรินชนิดต่างๆ ได้แก่ บีตา-
ไซโคลเดกซ์ทริน เมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทริน และ มอลโตซิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทริน ในแง่ของความสามารถเชิงการ
ละลายกับสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืช 5 ชนิด ได้แก่ คาร์เบนดาซิม คาร์เบนดาซิมสูตรผงเปียก 50 เปอร์เซ็นต์
(carbendazim 50 WP) เมทิลดาไรออน คาร์บาริล และ คาร์บาริลสูตรผงเปียก 85 เปอร์เซ็นต์ (carbaryl 85 WP)
ด้วยวิธี Phase solubility technique จากแผนภาพการละลายพบว่าเมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทริน สามารถเพิ่มการ
ละลายของสารป้องกันและกำจัดศัตรูพืชทุกชนิดได้มากกว่าบีตาไซโคลเดกซ์ทริน และ มอลโตซิล-บีตาไซโคลเดกซ์-
ทริน ยกเว้นกรณีของคาร์เบนดาซิมสูตรผงเปียก 50 เปอร์เซ็นต์ที่ไม่สามารถเพิ่มค่าทางการละลายได้เลย
ความสามารถในการละลายของสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทรินกับคาร์บาริลสูตรผงเปียก
85 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มค่าทางการละลายได้มากที่สุดถึง 18.4 เท่าในระบบที่มีเมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทรินความ
เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ และค่าคงที่ของการเกิดสารประกอบเชิงซ้อน (K_c) มีค่า 223.18 ลิตร/โมล ขั้นตอนต่อไปเป็น
การเตรียมคอมเพล็กซ์ ระหว่างคาร์บาริลสูตรผงเปียก 85 เปอร์เซ็นต์และเมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทรินที่อัตราส่วนโดย
โมล 1:1, 1:2 และ 2:1 ในรูปของแข็งโดยวิธี ผสมแห้ง ตกตะกอนร่วม บดผสมเปียก และระเหยแห้งโดยใช้ความเย็น
การเกิดสารประกอบเชิงซ้อนในสถานะของแข็งตรวจสอบโดย ดิฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี (DSC) และ
ฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรด (FTIR) ผลการทดลองที่ได้จากแผนภาพความร้อนของ DSC แสดงให้เห็นว่าเมื่อเตรียม
โดยวิธี บดผสมเปียก และระเหยแห้งโดยใช้ความเย็น ไม่ปรากฏพิคแสดงการดูดกลืนความร้อนของคาร์บาริลอิสระ
แต่ปรากฏพิคใหม่เล็กๆเกิดขึ้น ในขณะที่แผนภาพสเปกตรัมของ FTIR แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงของคาร์บอนิลกรุป
ในโมเลกุลของคาร์บาริล จาก 1717 เป็น 1744 และ 1734 cm^{-1} เมื่อเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนโดยวิธีบดผสมเปียก
และระเหยแห้งโดยใช้ความเย็นตามลำดับ ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีนี้สามารถบ่งบอกถึงการเกิดสารประกอบ
เชิงซ้อนได้ สารประกอบเชิงซ้อนระหว่างคาร์บาริลสูตรผงเปียก และเมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทรินที่ได้ จะมีอัตราการ
ละลาย และความคงตัวต่อความร้อนและแสงยูวี เพิ่มขึ้น ขณะที่ความเป็นพิษต่ำลงเมื่อเทียบกับคาร์บาริลสูตรผง
เปียกดั้งเดิม

หลักสูตร..... เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขาวิชา..... เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา..... 2544

ลายมือชื่อนิสิต..... ฤดีกานต์ สายโกสินทร์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ผศ. ดร. ทิพาพร ลิ้มปเสนีย์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ. ดร. เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์

4172414223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORD: INCLUSION COMPLEX / β -CYCLODEXTRIN / PESTICIDE / SOLUBILITY

RUEDEEKAN SAIKOSIN: PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF INCLUSION COMPLEXES BETWEEN CYCLODEXTRINS AND AGRICULTURAL TOXIC SUBSTANCES. THESIS ADVISOR: ASSOC.PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSIST.PROF. TIPAPORN LIMPASENI, Ph.D., 132 pp. ISBN 974-03-1153-9.

The primary goal of this work was to investigate the solubilizing ability of various β CDs, β CD, methyl- β CD and G_2 - β CD, when complexed with several pesticides (Carbendazim, Carbendazim 50 WP, Methidathion, Carbaryl and Carbaryl 85 WP). The effect of β CD and its derivatives on the aqueous solubility of pesticides was evaluated by the phase solubility technique. Methyl- β CD showed more solubilizing ability for four pesticides than β CD and G_2 - β CD except in the case of carbendazim 50 WP of which no solubility increase was observed with all of β CDs. Solubility increase was the highest for methyl- β CD complex of the carbaryl 85 WP. The presence of 100 mM methyl- β CD increased the carbaryl 85 WP solubility approximately 18.4 folds. The formation constant was determined to be 223.18 M^{-1} . The next step was to prepare carbaryl 85 WP/methyl- β CD complex at the molar ratios of 1:1, 1:2 and 2:1 in solid state. The methods were by physical-mixing, co-precipitation, kneading and freeze-drying. Differential Scanning Calorimeter (DSC) and Fourier Transform Infrared (FTIR) analysis were used to confirm the inclusion in solid state. The DSC curves for kneading and freeze-drying mixtures did not show the endothermic peak characteristic of free carbaryl, but the small new endothermic peak was observed. FTIR analysis showed a shift of the major peak of carbonyl group in carbaryl molecule from 1717 to 1744 and 1734 cm^{-1} in kneading and freeze-dried mixtures, respectively. The results from the two analyses suggested the formation of an inclusion complex. Methyl- β CD-carbaryl complex demonstrated higher and faster dissolution rate, higher thermal and UV stability but lower toxicity than its parent carbaryl compound.

Program..... Biotechnology.....
Field of study..... Biotechnology.....
Academic year..... 2001.....

Student's signature *Ruedeekan Saikosin*.....
Advisor's signature *P. Pongswasdi*.....
Co-advisor's signature *Tipaporn Limpaseni*.....

ACKNOWLEDGEMENTS

This acknowledgement is proudly presented for all professors who taught me at the Program of Biotechnology and Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University. To my opinion, an expression as “ Thank you” is not enough for my advisor, Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi. I am very grateful to her for great advice, latest information and valuable discuss including indefinite kindness. In addition, I would like to give a deep thank to my co-advisor, Assistant Professor Dr. Tipaporn Linpaseni, for her valuable guidance, suggestions and comment of this research, as well as personal friendship during my graduate study. I also would like to thanks the members of my thesis committee, Associate Professor Dr. Sirirat Rengpipat, Dr. Manchumas Hengsakul and Dr. Aroonsiri Shitangkoon for valuable discussion, advice and dedicating time for thesis examination. My acknowledgment is also expressed to Assistant Professor Dr. Amorn Petchsom of the Chemistry Department for the interpretation of DSC and FTIR spectra. I would also like to express my appreciation to Associate Professor Dr. Kingkaew Wattanasermkit of the Department of Biology for providing facilities and advice in Brine shrimp lethality test. Moreover, I would like to thank financial support from the Department of Biochemistry and Graduate Program of Biotechnology at Chulalongkorn University. I would like to thank friends and staff at Department of biochemistry and Program of biotechnology for helpfulness and friendship for four great years at the university. I would like to thank my parents and family members for their love, understanding, encouragement, limitless sacrifice and advice. They have supported me to concentrate on my future and have been a constant source of inspiration. Finally, I never forget to thank someone special who is a nice person for continuously cheering up.

CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	xi
LIST OF FIGURES.....	xii
ABBREVIATIONS.....	xv
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Pesticides.....	1
1.2 Cyclodextrins.....	11
1.3 Cyclodextrin-Guest complexation.....	19
1.4 Measurement of inclusion complex stability constant.....	24
1.5 Cyclodextrin in agriculture	27
1.6 The objectives of this thesis.....	31
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	
2.1 Equipments.....	32
2.2 Chemicals.....	33
2.3 Methods	
2.3.1 Determination of spectrophotometric properties of pesticides	
2.3.1.1 The maximum absorption of pesticides and pesticide-CD systems.....	34
2.3.1.2 Calibration curve of pesticides.....	34

2.3.2 Solubility studies : Selection of the best types of pesticide and cyclodextrin in soluble complex formation	35
2.3.3 Determination of the amount of active ingredient of carbaryl in commercial formular	
2.3.3.1 Determination of carbaryl by HPLC.....	36
2.3.3.1.1 Standard curve of carbaryl.....	36
2.3.3.1.2 Determination of percent carbaryl in carbaryl 85WP.....	36
2.3.4 Preparation of carbaryl-methyl- β CD solid complexes	
2.3.4.1 Preparation of carbaryl-methyl- β CD by physical mixing....	37
2.3.4.2 Preparation of carbaryl-methyl- β CD by co-precipitation.....	37
2.3.4.3 Preparation of carbaryl-methyl- β CD by freeze-drying.....	37
2.3.4.4 Preparation of carbaryl-methyl- β CD by kneading.....	38
2.3.5 Investigation of the carbaryl 85 WP -methyl- β CD solid complexes	
2.3.5.1 Differential scanning calorimetry (DSC).....	40
2.3.5.2 Fourier Transform Infrared spectrometry (FTIR).....	40
2.3.6 Detection of suitable conditions for complex formation by freeze-drying method.....	40
2.3.7 Characterization of solid state inclusion complexes	
2.3.7.1 Dissolution study of inclusion complex	41
2.3.7.2 Thermal stability test.....	41
2.3.7.3 UV stability test.....	42
2.3.7.4 Brine Shrimp (<i>Artemia salina</i> Linnaeus) cytotoxicity lethality test.....	42

CHAPTER III RESULTS

3.1 Determination of spectrophotometric properties of pesticides	
3.1.1 The maximum absorption of pesticides and pesticide- β CD complexes.....	43
3.1.2 Calibration curve of pesticides.....	43
3.2 Solubility study : Selection of the best type of pesticide in forming soluble complex with CDs	
3.2.1 Phase solubility of carbaryl.....	44
3.2.2 Phase solubility of carbendazim.....	51
3.2.3 Phase solubility study of methidathion.....	56
3.3 Selection of the best types of pesticide and cyclodextrin in soluble complex formation	59
3.4 Determination of the amount of active ingredient in commercial form of carbaryl 85WP.....	61
3.5 Preparation of carbaryl 85WP-methyl- β CD solid complexes.....	61
3.6 Investigation of the carbaryl 85 WP-methyl- β CD complexes	
3.6.1 Differential scanning calorimetry (DSC).....	62
3.6.2 Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR).....	65
3.7 Characterization of solid state inclusion complexes	
3.7.1 Dissolution study of inclusion complex	
3.7.1.1 Dissolution study of inclusion complex formed by freeze-drying method.....	72
3.7.1.2 Dissolution study of inclusion complex formed by kneading method.....	73

	Page
3.7.2 Thermal stability of inclusion complex	76
3.7.3 UV stability of inclusion complex.....	76
3.7.4 Acute toxicity test of free carbaryl 85WP and carbaryl 85WP- methyl- β CD on Brine shrimp (<i>Artemia salina</i>).....	83
CHAPTER IV DISCUSSION.....	86
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	102
REFERENCES.....	104
APPENDICES.....	113
BIOGRAPHY.....	132



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table	Page
1. List of pesticides classified according to targets used	4
2. Physical properties of the CDs and some derivatives.....	14
3. General structure of cyclodextrin and their major derivatives with pharmaceutical and agricultural interest. The derivatives may have different degree of substitution of the 2nd, 3rd, or 6th position of the glucose unit.....	17
4. The ratio of carbaryl 85 WP: methyl- β CD used in the solid complex preparations.....	39
5. The data on phase solubility diagram of various types of pesticide in the presence of β CD, G ₂ - β CD and methyl- β CD	60
6. FTIR data of methyl- β CD	68
7. FTIR data of carbaryl	68
8. FTIR data of methyl- β CD-carbaryl inclusion compound prepared by physical mixing method.....	69
9. FTIR data of methyl- β CD-carbaryl inclusion compound prepared by co-precipitation method.....	69
10. FTIR data of methyl- β CD-carbaryl inclusion compound prepared by co-precipitation freeze-dried method.....	70
11. FTIR data of methyl- β CD-carbaryl inclusion compound prepared by freeze dried method.....	70
12. FTIR data of methyl- β CD-carbaryl inclusion compound prepared by kneading method	71

	Page
13. Percent mortality of <i>Artemia salina</i> at various concentrations of carbaryl 85WP.....	84
14. Percent mortality of <i>Artemia salina</i> at various concentrations of carbaryl 85 WP-methyl- β CD at 2:1 molar ratio	84
15. Calculated LC ₅₀ values (mg/l) of free carbaryl 85WP and carbaryl 85WP-methyl- β CD using Probit analysis.....	85



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Cyclodextrin with n glucose units.....	12
2. Toroidal shape of β CD molecule.....	12
3. Schematic illustration of inclusion complexation of p-xylene by a cyclodextrin.....	21
4. Types of solubility diagrams of CD and guest.....	21
5. Phase solubility diagrams between carbaryl and CDs in water at 30°C.....	47
6. Comparison of phase solubility diagrams between carbaryl and CDs in water at 30°C.....	48
7. Phase solubility diagrams between carbaryl 85WP and CDs in water at 30°C	49
8. Comparison of phase solubility diagrams between carbaryl 85WP and CDs in water at 30°C.....	50
9. Phase solubility diagrams between carbendazim and CDs in water at 30°C .	52
10. Comparison of phase solubility diagrams between carbendazim and CDs in water at 30°C.....	53
11. Phase solubility diagrams of carbendazim 50WP and CDs in water at 30°C	54
12. Comparison of phase solubility diagrams between carbendazim 50WP and CDs in water at 30°C.....	55
13. Phase solubility diagrams between methidathion and various CDs in water at 30°C.....	57

Figure	Page
14. Comparison of phase solubility diagrams between methidathion and various CDs in water at 30°C.....	58
15. DSC thermograms of carbaryl and carbaryl complex.....	64
16. The FTIR spectra in the range of 400-4000 cm ⁻¹ of carbaryl and carbaryl complex	66
17. The FTIR spectra in the range of 1100-2400 cm ⁻¹ of carbaryl and carbaryl complex	67
18. Dissolution study of carbaryl and carbaryl complex	74
19. The solubility of carbaryl complex in related to free carbaryl.....	75
20. Thermal stability at 80°C of carbaryl 85WP, carbaryl 85WP-methyl-βCD complexes, and carbaryl 85 WP-dextrin complexes prepared by freeze-dried method.....	78
21. Thermal stability at 80°C of carbaryl 85WP, carbaryl 85WP-methyl-βCD complexes, and carbaryl 85WP-dextrin complexes prepared by kneaded method.....	79
22. Thermal stability at 40°C of carbaryl 85WP, carbaryl 85WP-methyl-βCD complexes, and carbaryl 85 WP-dextrin complexes prepared by freeze-dried method.....	80
23. UV stability of carbaryl 85WP, carbaryl 85WP-methyl-βCD complexes, and carbaryl 85 WP-dextrin complexes prepared by freeze-dried method...	81
24. UV stability of carbaryl 85WP, carbaryl 85WP-methyl-βCD complexes, and carbaryl 85 WP-dextrin complexes prepared by kneaded method.....	82