

การเพิ่มเสถียรภาพของฟีกโซไลด์โดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเดกซ์ทริน

นางสาวพัชรินทร์ จิตติธีระนนท์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STABILITY ENHANCEMENT OF FIXOLIDE BY COMPLEXATION  
WITH CYCLODEXTRIN

Miss Putcharin Chittiteeranon

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

Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2006

**491563**

Thesis Title                    STABILITY ENHANCEMENT OF FIXOLIDE BY  
   COMPLEXATION WITH CYCLODEXTRIN  
By                                    Miss Pucharin Chittiteeranon  
Field of study                 Biotechnology  
Thesis Advisor                Associate Professor Piamsook Pongsawasdi, Ph.D.  
Thesis Co-advisor         Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.

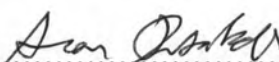
---

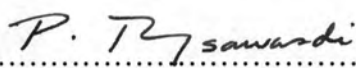
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial  
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

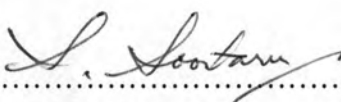


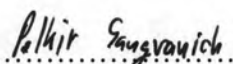
.....Dean of the Faculty of Science  
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

Thesis Committee

.......... Chairman  
(Associate Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

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

.......... Thesis Co-advisor  
(Assistant Professor Suganya Soontaros, Ph.D.)

.......... Member  
(Associate Professor Polkit Sangvanich, Ph.D.)

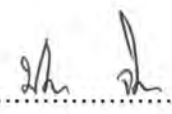
.......... Member  
(Assistant Professor Sireerat Charuchinda, Ph.D.)

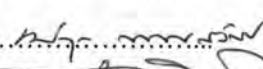
พัชรินทร์ จิตติธีรนนท์ : การเพิ่มเสถียรภาพของฟิกโซไลด์โดยการสร้างสารประกอบเชิงซ้อนกับไซโคลเดกซ์ทริน (STABILITY ENHANCEMENT OF FIXOLIDE BY COMPLEXATION WITH CYCLODEXTRIN). อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร.เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์ อ.ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร.สุกัญญา สุนทรส, 110 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของไซโคลเดกซ์ทรินต่อเสถียรภาพของฟิกโซไลด์ ซึ่งเป็นสารหอมที่ใช้มากในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและเครื่องใช้ในครัวเรือน โดยเตรียมเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับบีตาไซโคลเดกซ์ทริน และอนุพันธ์ พบว่าเกิดสารประกอบเชิงซ้อนที่ละลายน้ำของฟิกโซไลด์กับเมทิลและไฮดรอกซีโพรพิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งมีเฟสการละลายเป็นชนิด  $A_L$  และ  $A_N$  ตามลำดับ ในขณะที่การละลายของฟิกโซไลด์ในสารละลายบีตาไซโคลเดกซ์ทรินเป็นชนิด  $B_S$  คือ มีสารประกอบเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำเกิดขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของบีตาไซโคลเดกซ์ทริน เมื่อเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนในรูปของแข็งด้วยวิธีการตกตะกอนร่วม การบดผสมเปียก และการระเหยแห้งโดยใช้ความเย็น ที่อัตราส่วนโดยโมลของฟิกโซไลด์ : ไซโคลเดกซ์ทรินเป็น 1:1, 1:2 และ 1:3 แล้วทำการตรวจวิเคราะห์โดยวิธีดีฟเฟอเรนเชียลสแกนนิ่งแคลอริเมตรี (DSC) และฟูเรียรทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (FTIR) ผลที่ได้จากแผนภาพความร้อนของ DSC แสดงให้เห็นว่าเมื่อเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างฟิกโซไลด์กับบีตาไซโคลเดกซ์ทรินที่อัตราส่วนโดยโมล 1:2 โดยวิธีการตกตะกอนร่วม ไม่ปรากฏพิคแสดงการดูดกลืนพลังงานของฟิกโซไลด์ และจากแผนภาพสเปกตรของ FTIR พบการเปลี่ยนตำแหน่งพิคของหมู่คาร์บอนิลในโมเลกุลของฟิกโซไลด์จาก 1683 เป็น 1677  $\text{cm}^{-1}$  ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ทั้ง 2 วิธีนี้บ่งชี้ว่าเกิดสารประกอบเชิงซ้อนอย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงปริมาณของสารประกอบเชิงซ้อนนี้ด้วยวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย พบว่ามีปริมาณฟิกโซไลด์คงอยู่สูงสุด คือ 96.93 มิลลิกรัมต่อกรัมของสารประกอบเชิงซ้อน และให้ผลผลิตสูงถึงร้อยละ 74 เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิและแสงต่อความเสถียรของฟิกโซไลด์ในสารประกอบเชิงซ้อนทั้งในรูปของแข็งและในน้ำยาปรับผ้านุ่มเปรียบเทียบกับฟิกโซไลด์อิสระ ปรากฏว่าบีตาไซโคลเดกซ์ทรินสามารถลดการสลายตัวของฟิกโซไลด์ได้และไม่มีผลต่ออันดับของปฏิกิริยาการสลายตัว นอกจากนี้ยังพบว่าบีตาไซโคลเดกซ์ทริน และเมทิล-บีตาไซโคลเดกซ์ทริน ทำให้ค่าการละลายของฟิกโซไลด์และอัตราเร็วของการละลายเพิ่มขึ้นอีกด้วย ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในการปรับปรุงสมบัติของสารหอมฟิกโซไลด์เพื่อเพิ่มคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่มีสารหอมนี้เป็นองค์ประกอบ

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ.....

ปีการศึกษา.....2549.....

ลายมือชื่อนิสิต..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..........

# # 4772400023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY


KEY WORD: cyclodextrin / fixolide / fragrance / inclusion complex


PUTCHARIN CHITTITEERANON: STABILITY ENHANCEMENT OF  
FIXOLIDE BY COMPLEXATION WITH CYCLODEXTRIN. THESIS ADVISOR:  
ASSOC. PROF. PIAMSOOK PONGSAWASDI, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR:  
ASST. PROF. SUGANYA SOONTAROS, Ph.D., 110 pp.


The purpose of this study was to explore the effects of cyclodextrin on the stability of fixolide, a widely used fragrance material in personal care and household products. Soluble and solid complexes of fixolide with  $\beta$ CD, methyl- $\beta$ CD or HP- $\beta$ CD were prepared. Phase solubility diagrams suggest the formation of soluble complex of fixolide with methyl- and HP- $\beta$ CD, and was classified as the  $A_L$ - and  $A_N$ -type, respectively. On the other hand,  $\beta$ CD showed  $B_S$ -type solubility curve with the precipitation of insoluble complex at higher  $\beta$ CD concentration. Solid complexes were prepared by means of co-precipitation, kneading, and freeze-drying techniques with three mole ratios of fixolide : CD of 1:1, 1:2 and 1:3. Differential Scanning Calorimeter (DSC) and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) were used to confirm the inclusion complex in solid state. The DSC curves for co-precipitation mixture of fixolide with  $\beta$ CD (1:2 mole ratio) did not show the endothermic peak characteristic of free fixolide and FTIR analysis showed a shift of the major peak of carbonyl group in fixolide molecule from 1683 to 1677  $\text{cm}^{-1}$ . The results suggest that complete complex formation was occurred. This complex was quantified by solvent extraction method and GC analysis. It gave the highest amount of fixolide included in  $\beta$ CD, the value was 96.93 mg/g complex with the acceptable complex yield of 74 %. When effects of temperature and light on the stability of fixolide- $\beta$ CD complex both in solid state and in fabric softener were compared with free fixolide, it appears that  $\beta$ CD could slow down the degradation of fixolide and did not change the reaction order of degradation. Moreover,  $\beta$ CD and methyl- $\beta$ CD could also increase dissolution of fixolide. The overall results suggest the potential use of CD in the improvement of fixolide properties for quality enhancement of industrial products containing the fixolide fragrance.

Field of study...Biotechnology....

Academic..... 2006.....

Student's signature..... 

Advisor's signature..... 

Co-Advisor's signature..... 

## ACKNOWLEDGEMENTS

Many people have contributed to development of this study, which I am very appreciated for their kind cooperation and their advice. First, and foremost, I would like to express my gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Piamsook Pongsawasdi for her invaluable advice, guidance, encouragement, understanding throughout this study. Her kindness and cheerfulness are also deeply appreciated.

I wish to express deep appreciation for her kindness and encouragement to my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Suganya Soontaros in addition, to the members of my thesis committee for spending their valuable time, comments and suggestion. I also would like to thanks the members of my thesis committee, Associate Professor Dr. Aran Incharoensakdi, Associate Professor Dr. Polkit Sangvanich, and Assistant Professor Dr. Sireerat Charuchinda for valuable discussion, advice and dedicating time for thesis examination.

I would like to thank Associate Professor Dr. Amorn Petchsom of the Institute of Biotechnology and Genetic Engineering for permission to use gas chromatography equipment. Moreover, I would like to thank the financial support from Rachadapiseksompote Fund, 90 years CU Fellowship and the support to Starch and Cyclodextrin Research Unit of Chulalongkorn University. I would like to thank friends and staff of the Department of manufacturing pharmacy at the Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University for providing facilities and great helpful support.

Ultimately, I would like to express my gratitude to my family for their endless love, understanding, encouragement and cheerfulness throughout this study.

# CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT.....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGEMENT.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	x
LIST OF FIGURES.....	xii
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION	
1.1 Fragrances / Flavors.....	1
1.2 Cyclodextrins.....	4
1.3 Preparation methods of inclusion complexes.....	15
1.4 Characterization of inclusion complex formation.....	17
1.5 Cyclodextrin in flavor and fragrance.....	21
1.6 The objective of this thesis.....	24
CHAPTER II MATERIALS AND METHODS	
2.1 Equipments.....	25
2.2 Materials.....	26
2.3 Methods.....	27
2.3.1 Analysis of fixolide.....	27
2.3.1.1 Spectrophotometric Method.....	27
2.3.1.1.1 The maximum absorption of fixolide.....	27
2.3.1.1.2 Calibration curve of fixolide.....	27
2.3.1.2 GC Method.....	28
2.3.1.2.1 Chromatographic condition.....	28
2.3.1.2.2 Standard solution.....	28
2.3.1.2.3 Standard curve of fixolide.....	29
2.3.2 Phase solubility studies.....	29
2.3.3 Preparation of fixolide : cyclodextrin ( $\beta$ CD, methyl- $\beta$ CD, and HP- $\beta$ CD) solid complexes.....	29

	<b>Page</b>
2.3.3.1 Preparation of solid complexes by co-precipitation method.....	30
2.3.3.2 Preparation of solid complexes by kneading method.....	30
2.3.3.3 Preparation of solid complexes by freeze-drying method.....	30
2.3.3.4 Preparation of solid complexes by physical mixing method....	31
2.3.4 Detection of fixolide : cyclodextrin solid complexes.....	32
2.3.4.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	32
2.3.4.2 Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR).....	32
2.3.5 Determination of suitable mixing time for complex formation by co- precipitation method.....	32
2.3.6 Determination of fixolide in the solid complexes.....	33
2.3.7 Determination of Properties of the Solid Complexes.....	34
2.3.7.1 Thermal stability test.....	34
2.3.7.2 UV stability test.....	34
2.3.7.3 Dissolution study.....	35
2.3.8 Application of the inclusion complex in fabric softener.....	35
<b>CHAPTER III RESULTS</b>	
3.1 Analysis of fixolide.....	36
3.1.1 Spectrophotometric Method.....	36
3.1.1.1 The maximum absorption of fixolide and fixolide-CD complex.....	36
3.1.1.2 Calibration curve of fixolide.....	36
3.1.2 GC Method .....	38
3.1.2.1 Chromatogram of fixolide.....	38
3.1.2.2 Standard curve of fixolide.....	38
3.2 Phase solubility studies.....	38
3.3 Preparation of fixolide : CD ( $\beta$ CD, methyl- $\beta$ CD, and HP- $\beta$ CD) solid complexes .....	42
3.4 Detection of fixolide : cyclodextrin ( $\beta$ CD, methyl- $\beta$ CD, and HP- $\beta$ CD)solid complexes.....	43
3.4.1 Differential Scanning Calorimetry (DSC).....	43
3.4.2 Fourier Transform Infrared Spectrometry (FTIR).....	52



	<b>Page</b>
3.5 Determination of fixolide in the solid complexes.....	62
3.6 Determination of properties of the solid complexes.....	66
3.6.1 Thermal stability test.....	66
3.6.2 UV stability test.....	72
3.6.3 Dissolution study of inclusion complexes.....	72
3.7 Application of the inclusion complex in fabric softener.....	75
CHAPTER IV DISCUSSION.....	81
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	93
REFERENCES.....	95
APPENDICES.....	102
VITAE.....	110

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
1. Physical properties of the CDs and some derivatives.....	8
2. General structure of cyclodextrin and major derivatives.....	10
3. Composition of fixolide : CD ( $\beta$ CD, Methyl- $\beta$ CD, HP- $\beta$ CD) inclusion complex.....	31
4. Composition of fixolide and $\beta$ CD used in the determination of recovery of the method.....	34
5. FTIR data of $\beta$ CD.....	57
6. FTIR data of methyl- $\beta$ CD.....	57
7. FTIR data of HP- $\beta$ CD.....	58
8. FTIR data of fixolide.....	58
9. FTIR data of fixolide- $\beta$ CD inclusion complex prepared by different methods .....	59
10. FTIR data of fixolide-methyl- $\beta$ CD inclusion complex prepared by different methods.....	60
11. FTIR data of fixolide-HP- $\beta$ CD inclusion complex prepared by different methods.....	61
12. Recovery of fixolide.....	63
13. Complex yield and fixolide included in $\beta$ CD by different methods of complex formation.....	64
14. Complex yield and fixolide included in methyl- $\beta$ CD by different methods of complex formation.....	65
15. Complex yield and fixolide included in HP- $\beta$ CD by different methods of complex formation.....	65
16. The degradation rate constant of fixolide kept at various temperatures.....	71
17. Regression coefficients of zero and first orders reactions for fixolide with/without $\beta$ CD formulations.....	71
18. The degradation rate constants of fixolide under UV light.....	73

<b>Table</b>	<b>Page</b>
19. Regression coefficients of zero and first orders reactions for fixolide with/without $\beta$ CD formulation under UV light.....	73
20. The degradation rate constants of fixolide in fabric softener kept at various temperatures.....	79
21. The degradation rate constants of fixolide in fabric softener under UV light.....	79
22. Regression coefficients of zero and first orders reactions for fixolide with/without.....	80
23. Regression coefficients of zero and first orders reactions for fixolide with/without $\beta$ CD formulation in fabric softener under UV light.....	80

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Structure of fixolide.....	3
2. Cyclodextrin with n-glucopyranose units (n = 6, 7 or 8).....	5
3. Structure of $\alpha$ -, $\beta$ -, $\gamma$ -cyclodextrin .....	5
4. Functional structure scheme of $\beta$ -cyclodextrin.....	7
5. General structure of $\beta$ -cyclodextrin and major derivatives .....	10
6. Schematic representation of the formation of cyclodextrin inclusion complexes.....	12
7. Phase solubility diagram of type A system.....	19
8. Phase solubility diagram of type B system.....	19
9. The UV spectrum of fixolide and fixolide- $\beta$ CD complex.....	37
10. Calibration curve of fixolide by spectrophotometric method.....	37
11. GC chromatogram of fixolide and naphthalene in n-hexane.....	39
12. Standard curve of fixolide by GC method.....	39
13. Phase solubility diagrams between fixolide and CDs in 50 % (v/v) aqueous ethanolic solution at 30 °C.....	40
14. DSC thermograms of fixolide : $\beta$ CD complex by co-precipitation method at mixing time of 24 hours.....	45
15. DSC thermograms of fixolide : $\beta$ CD complex by kneading method.....	46
16. DSC thermograms of fixolide : $\beta$ CD complex by freeze-drying method.....	47
17. DSC thermograms of fixolide : Methyl- $\beta$ CD complex by kneading method.....	48
18. DSC thermograms of fixolide : Methyl- $\beta$ CD complex by freeze-drying method .....	49
19. DSC thermograms of fixolide : HP- $\beta$ CD complex by kneading method.....	50
20. DSC thermograms of fixolide : HP- $\beta$ CD complex by freeze-drying method.....	51
21. Infrared spectra of fixolide : $\beta$ CD complex .....	54

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
22. Infrared spectra of fixolide : methyl- $\beta$ CD complex .....	55
23. Infrared spectra of fixolide : HP- $\beta$ CD complex .....	56
24. Extraction of fixolide using n-hexane.....	63
25. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex kept at 80 °C.....	69
26. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex kept at 50 °C.....	69
27. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex kept at 35 °C.....	70
28. Arrhenius plot of fixolide (♦) and fixolide : $\beta$ CD (■) formulations.....	70
29. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex under UV light.....	73
30. Dissolution profiles of fixolide and its $\beta$ CD complex in 50%(v/v) ethanolic aqueous solution.....	74
31. Dissolution profiles of fixolide and its methyl- $\beta$ CD complex in 50%(v/v) ethanolic aqueous solution.....	74
32. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex in fabric softener kept at 80 °C.....	77
33. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex in fabric softener kept at 50 °C.....	77
34. Percent remaining of fixolide and fixolide : $\beta$ CD complex in fabric softener under UV light.....	78

## LIST OF ABBREVIATIONS

$\alpha$ -CD	alpha-cyclodextrin
$\gamma$ -CD	gamma-cyclodextrin
$\beta$ -CD	beta-cyclodextrin
$^{\circ}\text{C}$	degree Celsius
CD	cyclodextrin
DSC	differential scanning calorimetry
FTIR	fourier transform infrared
g	gram
GC	gas chromatography
HP $\beta$ CD	hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin
hr	hour
k	degradation rate constant
M	molar
mg	milligram
min	minute
ml	millilitre
nm	nanometre
R <sup>2</sup>	regression coefficient
SD	standard deviation
UV-VIS	ultraviolet-visible
v/v	volume by volume
$\lambda$	wavelength