

การกักเก็บสารออกฤทธิ์ที่ไม่เสถียรด้วยโคโตซานนาโนแคปซูล



นางสาว ณัฐพร อนุมานศิริกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของจฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ENTRAPMENT OF UNSTABLE ACTIVE COMPOUNDS BY CHITOSAN
NANOCAPSULES

Miss Nattaporn Anumansirikul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Petrochemistry and Polymer Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2006
Copyright of Chulalongkorn University

492100

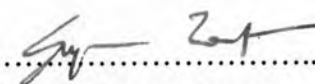
Thesis title ENTRAPMENT OF UNSTABLE ACTIVE COMPOUNDS
 BY CHITOSAN NANOCAPSULES
By Miss Nattaporn Anumansirikul
Field of Study Petrochemistry and Polymer Science
Thesis Advisor Associate Professor Supason Wanichwaecharungruang, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Associate Professor Suwabun Chirachanchai, Ph.D.

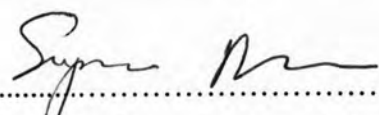
Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree




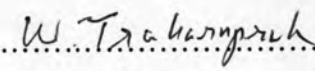
.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

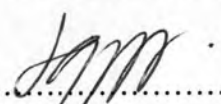
THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Associate Professor Supawan Tantayanon, Ph.D.)


.....Thesis Advisor
(Associate Professor Supason Wanichwaecharungruang, Ph.D.)


.....Thesis Co-Advisor
(Associate Professor Suwabun Chirachanchai, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Wimonrat Trakarnpruk, Ph.D.)


.....Member
(Associate Professor Sanong Ekgasit, Ph.D.)

ณัฐพร อนุมานศิริกุล : การกักเก็บสารออกฤทธิ์ที่ไม่เสถียรด้วยไคโตซานนาโนแคปซูล (ENTRAPMENT OF UNSTABLE ACTIVE COMPOUNDS BY CHITOSAN NANOCAPSULES) อ. ที่ปรึกษา: รศ. ดร. ศุภคร วนิชเวชรุ่งเรือง, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ. ดร. สุนนุญ จิรชาญชัย, 92 หน้า

ในงานวิจัยนี้อนุภาคนาโนเอมเพกฟทาโลอิลไคโตซาน และเอมเพก-4-เมทอกซีซินนาไมอิลฟทาโลอิลไคโตซานถูกสังเคราะห์ กระบวนการสังเคราะห์ประกอบด้วย 1) การทำปฏิกิริยาของไคโตซานกับฟทาสิกแอนไฮไดรต์ได้เป็นอนุพันธ์ไคโตซานที่ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ 2) การทำเอสเทอร์ิฟิเคชันของเอมเพกคาร์บอกซิลิก (และ 4-เมทอกซีซินนามิกแอซิด) กับฟทาโลอิลไคโตซาน 3) การเตรียมอนุภาคนาโนจากอนุพันธ์ไคโตซานโดยวิธีโซลเวนต์คาสติง การกราฟต์เอมเพกคาร์บอกซิลิกลงบนไคโตซานให้เอมเพกฟทาโลอิลไคโตซานที่มีการแทนที่ 7% ผลึกภัณฑ์ที่ได้เป็นอนุภาคนาโนที่มีประจุลบ (-30.3 มิลลิโวลต์) ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 40-150 นาโนเมตร การศึกษา Patch test และ Photopatch test ของอนุภาคพบว่าไม่เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังมนุษย์ นอกจากนี้การกักเก็บสารออกทิลเมทอกซีซินนาเมท, แอสทาแซนทิน และแอสคอบิลพาลมิเตตเข้าไปในอนุภาคจะให้อนุภาคที่มีสารออกฤทธิ์ 45, 39 และ 94% โดยน้ำหนักตามลำดับ ที่มีประสิทธิภาพการกักเก็บมากกว่า 97% โดยน้ำหนัก จากการศึกษาค่าความเสถียรต่อแสงพบว่าสารออกทิลเมทอกซีซินนาเมทที่ถูกกักเก็บในอนุภาคที่เตรียมได้จะมีความเสถียรต่อแสงมากกว่าสารออกทิลเมทอกซีซินนาเมทอิสระ สำหรับการติดเอมเพกคาร์บอกซิลิก และ 4-เมทอกซีซินนามิกแอซิดลงบนฟทาโลอิลไคโตซานให้เอมเพก-4-เมทอกซีซินนาไมอิลฟทาโลอิลไคโตซานซึ่งมีการแทนที่ 0.313 และ 5.7% ตามลำดับ ผลึกภัณฑ์ที่ได้เป็นอนุภาคนาโนที่มีประจุลบ (-31.53 มิลลิโวลต์) ซึ่งมีขนาดเฉลี่ย 100-450 นาโนเมตร การกักเก็บสารแอสทาแซนทิน และแอสคอบิลพาลมิเตตให้อนุภาคที่มีสารออกฤทธิ์ 22 และ 69% โดยน้ำหนัก ซึ่งมีประสิทธิภาพการกักเก็บ 100%

สาขาวิชา ปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต ณัฐพร อนุมานศิริกุล

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ณัฐพร อนุมานศิริกุล

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ณัฐพร อนุมานศิริกุล

4772292523: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEY WORD: NANOPARTICLES/ CHITOSAN/ ENCAPSULATION/ COSMETIC
ACTIVES

NATTAPORN ANUMANSIRIKUL: ENTRAPMENT OF UNSTABLE ACTIVE
COMPOUNDS BY CHITOSAN NANOCAPSULES. THESIS ADVISOR:
ASSOC. PROF. SUPASON WANICHWEACHARUNGRUANG, Ph.D. THESIS
CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. SUWABUN CHIRACHANCHAI, Ph.D., 92 pp.

In this work, mPEG-phthaloylchitosan and mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan nanoparticles were synthesized. The synthetic processes involved 1) reacting of chitosan with phthalic anhydride to give phthaloylchitosan which was soluble in organic solvent 2) esterifying of mPEG-COOH (and 4-methoxycinnamic acid) with the phthaloylchitosan and 3) preparing nanoparticles from the chitosan derivatives by solvent displacement method. Grafting of mPEG-COOH onto chitosan gave mPEG-phthaloylchitosan with 7% degree of substitution. The obtained product is negatively charged (-30.3 mV) nanoparticles with an average sizes of 40-150 nm. Studying of patch test and photopatch test of the particles showed no sign of irritation to the human skin. Furthermore, encapsulation of 2-ethylhexyl-p-methoxycinnamate (EHMC), ascorbyl palmitate and astaxanthin into the particles gave the particles with 45, 39 and 94% (w/w) of the actives in the particles at encapsulation efficiency (EE) of more than 97% (w/w). Photostability study indicated that the EHMC that was encapsulated into the prepared particles was more photostable than the free EHMC. Grafting of mPEG-COOH and 4-methoxycinnamic acid onto phthaloylchitosan gave mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan with degree of substitution of 0.313 and 5.7%, respectively. The product is negatively charged (-31.53) nanoparticles with the average sizes of 100-450 nm. Encapsulation of astaxanthin and ascorbyl palmitate into the particles gave product with 22 and 69 % (w/w) of the actives at 100% EE.

Field of Study Petrochemistry and Polymer Science Student's Signature ณัฐพร อุ่นมานศิริกุล
Academic year 2006 Advisor's Signature [Signature]
Co-advisor's Signature [Signature]

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my sincere appreciation and gratitude to my advisor, Associate Professor Dr. Supason Wanichweacharungruang for her helpful guidance, valuable assistance and generous encouragement throughout the course of this research. Also thank for the valuable suggestions to Associate Professor Dr. Suwabun Chirachanchai, my co-advisor. I would like to extend my sincere thanks to Associate Professor Dr. Supawan Tantayanon, Associate Professor Dr. Wimonrat Trakarnpruk and Associate Professor Dr. Sanong Ekgasit for their time and comment and suggestions.

Gratefully thanks are extended to Graduate School, Chulalongkorn University and National Research Council of Thailand for granting financial support to fulfill this thesis.

Finally, I would like to specially thank my family and research group members for their advice and encouragement throughout my entire education.

CONTENTS

	Pages
Abstract in Thai.....	iv
Abstract in English.....	v
Acknowledgements.....	vi
List of Schemes.....	ix
List of Figures.....	x
List of Tables.....	xiii
List of Abbreviations.....	xiv
CHAPTER I: INTRODUCTION.....	1
1.1 Chitin-chitosan.....	1
- Chemical modification of chitosan.....	2
- Drug delivery system.....	8
- Antibacterial activity of chitosan.....	9
1.2 PEG and PEG Derivatives Used in Cosmetics.....	9
1.3 Cosmetic Actives.....	10
1.4 Literature Reviews.....	13
1.5 Research goals.....	26
CHAPTER II: EXPERIMENTAL.....	27
2.1 Materials and Chemicals.....	27
2.2 Instruments and Equipments.....	27
2.3 mPEG-phthaloylchitosan Nanoparticles (d).....	28
2.3.1 Preparation of <i>N</i> -Phthaloylchitosan.....	28
2.3.2 Preparation of Poly(ethylene glycol) methyl ether- terminated with Carboxylic Groups.....	29
2.3.3 mPEG-phthaloylchitosan.....	29
2.3.4 Encapsulation of EHMC into Particle d	30
2.3.5 Encapsulation of Ascorbyl Palmitate into Nanoparticle d	31
2.3.6 Encapsulation of Astaxanthin into Nanoparticle d	32
2.4 mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan nanoparticles (e).....	32

2.4.1 Encapsulation of Ascorbyl Palmitate into Particle e.....	33
2.4.2 Encapsulation of Astaxanthin into Particle e.....	34
CHAPTER III: RESULT AND DISCUSSION.....	35
Syntheses of Nanoparticles	
3.1 mPEG-phthaloylchitosan Nanoparticles.....	36
3.1.1 <i>N</i> -phthaloylchitosan.....	36
3.1.2 Poly(ethylene glycol)methyl ether terminated with Carboxylic Groups.....	38
3.1.3 mPEG-phthaloylchitosan.....	40
3.1.4 Encapsulation of EHMC into Particle d.....	46
3.1.5 Encapsulation of Ascorbyl Palmitate into Particle d...	51
3.1.6 Encapsulation of Astaxanthin into Particle d.....	53
3.2 mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan Nanoparticles (e).....	56
3.2.1 Encapsulation of Ascorbyl Palmitate into Particle e.....	63
3.2.2 Encapsulation of Astaxanthin into Particle e.....	65
CHAPTER IV: CONCLUSION.....	68
REFERENCES.....	71
APPENDICES.....	80
Appendix A.....	81
Appendix B.....	91
VITA.....	92

List of Schemes

Schemes	Pages
1.1 Deacetylation of chitin to chitosan.....	1
2.1 Preparation of <i>N</i> -phthaloylchitosan.....	28
2.2 Preparation of poly(ethylene glycol) methyl ether terminated with carboxylic groups.....	29
2.3 mPEG-phthaloylchitosan.....	29
2.4 mPEG-4-methoxycinnamoyl phthaloylchitosan.....	32
3.1 Synthesis of mPEG-phthaloylchitosan and mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan.....	35
3.2 <i>N</i> -phthaloylchitosan.....	36
3.3 Preparation of poly(ethylene glycol) methyl ether terminated with carboxylic groups.....	38
3.4 mPEG-phthaloylchitosan nanoparticles.....	40
3.5 Formation of nanoparticle and the effect of solvent.....	44
3.6 mPEG-4-methoxycinnamoly-phthaloylchitosan nanoparticles.....	57
3.7 Colloidal phenomena and effect of solvent.....	61

List of Figures

Figures	Pages
1.1	Chemical structures of cellulose, chitin, chitosan and chitin-chitosan.... 1
1.2	Structure of polyethylene glycols..... 9
3.1	IR spectra of a) chitosan and b) <i>N</i> -phthaloylchitosan..... 37
3.2	¹ H-NMR spectrum of <i>N</i> -phthaloylchitosan..... 37
3.3	IR spectra of a) mPEG b) mPEG-COOH..... 39
3.4	¹ H-NMR spectrum of mPEG-COOH.....39
3.5	IR spectra (KBr) of a) <i>N</i> -phthaloylchitosan and b) mPEG-phthaloylchitosan nanoparticles.....41
3.6	¹ H-NMR spectrum of mPEG-phthaloylchitosan nanoparticles..... 41
3.7	UV absorption spectra of mPEG-phthaloylchitosan nanoparticles (0.06 mg/mL in DMSO).....42
3.8	SEM photographs at 14 kV of a) Chitosan (×190) b) <i>N</i> -phthaloylchitosan (×8,500) and c) mPEG-phthaloylchitosan nanoparticles (×8,500)..... 43
3.9	TEM photographs of mPEG-phthaloylchitosan nanoparticles (×8,000) and colloidal solution of mPEG-phthaloylchitosan (particle d) (3 g/L in water).....43
3.10	Dialyses at various concentration of nanoparticle d (a) 30,000 ppm (b) 3,000 ppm (c) 300 ppm..... 45
3.11	UV absorption spectra of EHMC-loaded-particle d (0.12 mg/ml in DMSO).....46
3.12	SEM photographs at 15 kV of EHMC- loaded- particle d (left to right: dialysis in ethanol and water, respectively) (×8,500)..... 47
3.13	TEM photographs of particle d before (left) (×80,000) and after (right) EHMC encapsulation. (×80,000)..... 47
3.14	UV absorption spectra of EHMC-loaded-particle d (0.02 mg/ ml in DMSO).....48
3.15	UV absorption spectra of diffusion of EHMC into particle d at each time (0 sec., 4 hours, 5 day, 10 day and 20 day, respectively) (0.10 mg/ ml in DMSO)..... 48

3.16	SEM photographs at 15 kV of EHMC-loaded-particle d ($\times 12,000$).....	49
3.17	Franz-type glass diffusion cells.....	49
3.18	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of ascorbyl palmitate-loaded-particle d (DMSO deuterated).....	52
3.19	TEM photographs of particle d before (left) ($\times 80,000$) and after (right) ascorbyl palmitate encapsulation. ($\times 20,000$).....	52
3.20	SEM photograph at 20 kV of ascorbyl palmitate-loaded-particle d ($\times 22,000$).....	53
3.21	Structure of astaxanthin (3, 3'-dihydroxy- β - β' -carotene-4-4'-dione).....	53
3.22	TEM images of particle d before (left) ($\times 80,000$) and after (right) astaxanthin encapsulation. ($\times 80,000$).....	54
3.23	SEM photographs at 15 kV of astaxanthin-loaded-particle d ($\times 8,500$).....	54
3.24	UV absorption spectra of astaxanthin-loaded-particle d (0.055 mg/ml in DMSO).....	55
3.25	Nanoparticle suspensions from left to right: particle d , EHMC-loaded-, ascorbyl palmitate-loaded- and astaxanthin-loaded-particle d	55
3.26	$^1\text{H-NMR}$ spectrum of mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan (particle e)	58
3.27	IR spectra (KBr) of a) chitosan (compound a) b) <i>N</i> -phthaloylchitosan. (compound b) c) mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan. (particle e).....	58
3.28	UV absorption spectra of mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan (0.13 mg/ml in DMSO).....	59
3.29	UV absorption spectra of freshly prepared mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan (0.05 mg/ml in DMSO).....	59
3.30	a) SEM photographs at 15 kV of mPEG-4-methoxycinnamoyl phthaloylchitosan nanoparticles (particle e) ($\times 8,500$) b) TEM photographs of mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan nanoparticles (particle e) ($\times 80,000$).....	60
3.31	Formulation of nanoparticles e in various stabilizers at room temperature a) no stabilizer (b) gel (c) PEG-400 (d) tween 1% (e) mPEG 5000 [freshly prepared].....	62

3.32	Formulation of nanoparticles e in various stabilizers at room temperature a) no stabilizer (b) gel (c) PEG-400 (d) tween 1% (e) mPEG 5000 [after 3 month].....	62
3.33	¹ H-NMR spectrum of ascorbyl palmitate-loaded-particle e (0.0061 g of deuterated DMSO).....	64
3.34	TEM photographs of particle e before (left) (×80,000) and after (right) ascorbyl palmitate encapsulation. (×80,000).....	64
3.35	SEM photograph at 20 kV of ascorbyl palmitate-loaded-particle e (×22,000).....	65
3.36	TEM photographs of particle e before (left) (×80,000) and after (right) astaxanthin encapsulation (×80,000).....	66
3.37	SEM photographs at 15 kV of astaxanthin-loaded-particle e (×8,500).....	66
3.38	UV absorption spectra of mPEG-4-methoxycinnamoyl-phthaloylchitosan nanoparticles (particle e) (0.11 mg/ mL in DMSO).....	67
3.39	Nanoparticle suspensions from left to right: particle e , ascorbyl palmitate-loaded- and astaxanthin-loaded-particle e	67

List of Tables

Tables	Pages
1 % Diffusion efficiency and % weight of EHMC in the particle d (%w/w).....	49
2 Percentages of <i>trans</i> and <i>cis</i> configuration in the irradiated encapsulated-EHMC and free EHMC.....	50
3 %Encapsulation efficiency (EE) and % weight of the active in the particle d (%w/w).....	55
4 %Diffusion efficiency and % weight of ascorbyl palmitate in the particle e (%w/w).....	65
5. % Encapsulation efficiency (EE) and %weight of the active in the particle e (%w/w).....	67

List of Abbreviations

°C	degree Celsius
cm ⁻¹	per centimeter (s)
cm ⁻¹	unit of wavenumber (IR)
M.W	molecular weight
nm	nanometer (s)
Hz	hertz
mJ	millijoule
mW	milliwatt
IR	Infrared
h	hour
min.	minute
g	gram (s)
mL	milliliter (s)
mV	millivolt
NMR	nuclear magnetic resonance
SEM	Scanning electron microscope
TEM	Transmission electron microscope
%	Percent
ϵ	molar absorptivity
λ	wavelength
ppm	parts per million
UV	ultraviolet
EHMC	2-Ethylhexyl-p-methoxycinnamate
EDCI	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride
DMSO	dimethyl sulfoxide
DMF	dimethyl formamide