# *N*-CARBOXYACYL CHITOSAN AND THEIR CHARACTERIZATION FOR POTENTIAL USE IN MEDICAL APPLICATIONS

Chutima Vanichvattanadecha

A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University
2010

| | |
|---|---|
| **Thesis Title:** | *N*-Carboxyacyl Chitosan and their Characterization for Potential Use in Medical Applications |
| **By:** | Chutima Vanichvattanadecha |
| **Program:** | Polymer Science |
| **Thesis Advisors:** | Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit |
| | Prof. Pitt Supaphol |
| | Prof. Seiichi Tokura |

Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy.

..... Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

**Thesis Committee:**

..... (Asst. Prof. Pomthong Malakul)

..... (Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)

..... (Prof. Pitt Supaphol)

..... (Prof. Seiichi Tokura)

..... (Prof. Hiroshi Tamura)

..... (Dr. Thanyalak Chaisuwan)

# ABSTRACT

4782002063: Polymer Science Program
Chutima Vanichvattanadecha: *N*-Carboxyacyl Chitosan and their Characterizations for Potential Use in Medical Applications.
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, Prof. Pitt Supaphol and Prof. Seiichi Tokura 120 pp.
Keywords: Chitosan / *N*-maleoyl chitosan / *N*-succinyl chitosan

*N*-maleoyl chitosan and *N*-succinyl chitosan which are both water soluble chitosan derivatives, were successfully synthesized by the introduction of maleic anhydride and succinic anhydride into the amino group of chitosan, respectively. The self-crosslinkable *N*-maleoyl chitosan films were indicated by the reduction of their swelling and weight loss behaviours toward the storage time of films. Moreover, the swelling behaviour of this chitosan derivative was also sensitive to the changes of pH and ionic strength of the solutions. For *N*-succinyl chitosan, hydrogel of this chitosan derivative was fabricated by direct crosslinking of chitosan with succinic anhydride via the chitosan-citric acid complexation. It was found that the increase of succinylation of the hydrogel resulted in an enhancement of succinyl linkage, cationic dye absorbability, susceptibility to the lysozyme degradation. Moreover, the non-toxicity of these *N*-succinyl chitosan hydrogel films toward the mouse fibroblast cells was confirmed by indirect cytotoxicity evaluation. After exposure to low dose (5-30kGy) of gamma radiation, the reduction of molecular weight of *N*-succinyl chitosan products in their dilute aqueous solution system was greater than in their solid film state. The structural analysis suggested that the radiolysis of *N*-succinyl chitosan products was mainly occurred at the glycosidic linkages and *N*-succinyl groups were partially eliminated. As results of their physicochemical properties, biodegradability and cytotoxicity, both fabricated *N*-maleoyl chitosan and *N*-succinyl chitosan have a potential use for applying in medical applications. In addition, low molecular weight of *N*-succinyl chitosan can be effectively produced by using gamma radiation at dilute aqueous solutions.

# บทคัดย่อ

ชุติมา วาณิชวัฒนเดชา : การสังเคราะห์และการวิเคราะห์คุณสมบัติของคาร์บอกซีเอซิลไคโตซานเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ (*N*-Carboxyacyl Chitosan and their Characterization for Potential Use in Medical Applications) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. รัตนา รุจิรวนิช ศ. ดร. พิชญ์ ศุภผล และ ศ. ดร. เซอิชิ โทกุระ 120 หน้า

เอ็น-มาลีโออิลไคโตซานและเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ ซึ่งสังเคราะห์ได้จากการเติมหมู่มาลีอิกแอนไฮไดรด์ และหมู่ซัคซินิกแอนไฮไดรด์เข้าไปติดที่หมู่อะมิโนของไคโตซาน ฟิลม์ที่สามารถเกิดพันธะเชื่อมโยงได้ด้วยตัวมันเองของเอ็น-มาลีโออิลไคโตซานนั้นสามารถบ่งชี้ได้จากการลดลงของการบวมตัวและการลดลงของน้ำหนักที่หายไปของฟิลม์เมื่อเวลาที่ใช้ในเก็บฟิลม์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้พฤติกรรมการบวมตัวของอนุพันธ์นี้ยังขึ้นกับค่าพีเอชและค่าไอออนิกสเตรนจ์ของสารละลายด้วย สำหรับไฮโดรเจลของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานนั้นถูกขึ้นรูปโดยมีการเชื่อมโยงพันธะของหมู่ซัคซินิกแอนไฮไดรด์ภายในโครงสร้างของไคโตซานซึ่งเกิดผ่านการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเชิงซ้อนหว่างไคโตซานกับซิตริกแอซิด พบว่าการเพิ่มขึ้นของการแทนที่โดยหมู่ซัคซินิกแอนไฮไดรด์ทำให้การเชื่อมโยงระหว่างพันธะ,การดูดซับสีย้อมที่มีประจุบวก,ความว่องไวต่อการสลายตัวโดยไลโซโซมเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ความไม่เป็นพิษของไฮโดรเจลของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานต่อเซลล์ผิวหนังของหนูถูกยืนยันด้วยวิธีการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีทางอ้อม การฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มต่ำ (5-30 kGy) ไปยังสารละลายเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานที่มีความเข้มข้นต่ำนั้นทำให้น้ำหนักโมเลกุลของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานลดลงอย่างมากและจากการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุพันธ์ที่ถูกฉายรังสีพบว่า การฉายรังสีทำให้เกิดจากการขาดออกของสายโซ่หลักที่พันธะเชื่อมระหว่างโพลีแซคคาไรด์ (พันธะไกลโคซิดิก)และทำให้หมู่แทนที่บางส่วนถูกกำจัดออก จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพและความไม่เป็นพิษต่อเซลล์นั้นทำให้วัสดุขึ้นรูปของเอ็น-มาลีโออิลไคโตซานและเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ นอกจากนี้เอ็น-ซัคซินิลไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำยังสามารถผลิตได้จากการฉายรังสีแกมมาที่ช่วงความเข้มต่ำนี้ไปยังสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำของผลิตภัณฑ์ของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานนี้อีกด้วย

# ACKNOWLEDGEMENTS

Appreciation is expressed to those who have made contributions to this dissertation. First the author gratefully acknowledges her advisor, Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Pitt Supaphol from The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for giving her beneficial knowledge, meaningful guidance and encouragement all along the way. She also would like to express her sincere thanks to Prof. Seiichi Tokura and Prof. Hiroshi Tamura for giving her useful advises and suggestions as well as their kind taking care while she did a part of her research at Kansai University.

She gratefully acknowledges all faculty members and staffs at The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their knowledge and assistance. Moreover, she would like to give her special thanks to all members in her research group both from the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University and from Biofunctionalization Lab (Kankyou), Kansai University, as well as all of her friends for their kind assistance.

Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, Prof. Pitt Supaphol, Dr. Thanyalak Chaisuwan, and Prof. Hiroshi Tamura are further acknowledged for being her dissertation committees, making valuable comments and suggestions.

She wishes to express her deep gratitude to her family for their unconditioned love, understanding and very supportive during all these years spent for her Ph.D. study.

Finally, the author is deeply indebted to the Development and Promotion of Science and Technology Talent Project (DPST) for providing a full scholarship as well as encouragement for doing a part of research work in Japan, and partial fund from National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials, Thailand and Kansai University, Japan. This work would not be carried out successfully without all financial supports.

## TABLE OF CONTENTS

# LIST OF TABLES

## LIST OF FIGURES

## CHAPTER IV

**FIGURE** **PAGE**

## CHAPTER V

## ABBREVIATIONS

| | |
|---|---|
| *N*-MC | *N*-maleoyl chitosan |
| Na *N*-MC | *N*-maleoyl chitosan sodium salt |
| *N*-SC | *N*-succinyl chitosan |
| Na *N*-SC | *N*- succinyl chitosan sodium salt |
| *N*-SCG | *N*-succinyl chitosan hydrogel |
| *N*-SCW | Water soluble *N*-succinyl chitosan |
| DA | Degree of acetylation |
| DD | Degree of deacetylation |
| DS | Degree of substitution |
| GlcNAc | *N*-acetyl glucosamine |
| GlcN | Glucosamine |
| C;H;N | Carbon;Hydrogen;Nitrogen |
| $M_v$ | The viscosity average molecular weight |
| $M_{w,a}$ | The aggregated chains weight average molecular weight |
| $M_{w,s}$ | The single chain molecular weight |
| MWCO | Molecular weight cut off |
| γ-ray | Gamma ray |
| EA | Elemental analysis |
| FTIR | Fourier-transformed infrared spectrometer |
| $^1$H NMR | $^1$H-Nuclear magnetic resonance |
| UV-vis | Ultra violet-visible spectrophotometer |
| SCE | Size-exclusion chromatography |
| TCPS | Tissue-culture polystyrene plate |
| PBS | Phosphate buffer solution |
| DSS | Sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate |
| DMEM | Dulbecco's modified Eagle's medium |
| FBS | Fetal bovine serum |
| SFM | Serum-free medium |
| MTT | 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide |