

***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

I 28375579

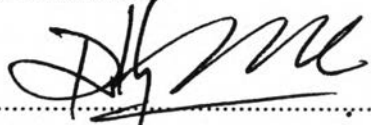
**Thesis Title:** *N*-Carboxyacyl Chitosan and their Characterization for  
Potential Use in Medical Applications  
**By:** Chutima Vanichvattanadecha  
**Program:** Polymer Science  
**Thesis Advisors:** Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit  
Prof. Pitt Supaphol  
Prof. Seiichi Tokura

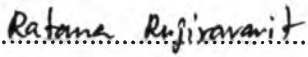
---

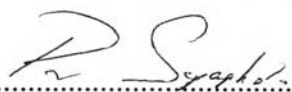
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn  
University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of  
Philosophy.

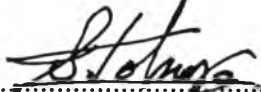
  
..... Dean  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

**Thesis Committee:**

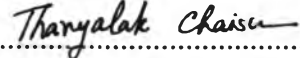
  
.....  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

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

  
.....  
(Prof. Pitt Supaphol)

  
.....  
(Prof. Seiichi Tokura)

  
.....  
(Prof. Hiroshi Tamura)

  
.....  
(Dr. Thanyalak Chaisuwan)

## ABSTRACT

4782002063: Polymer Science Program

Chutima Vanichvattanadecha: *N*-Carboxyacetyl 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

ชุตติมา วาณิชวัฒนเดชา : การสังเคราะห์และการวิเคราะห์คุณสมบัติของคาร์บอกซีเอซิดไคโตซาน เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ (*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 พิล์มที่สามารถเกิดพันธะเชื่อมโยงได้ด้วยตัวมันเองของเอ็น-มาลีโออิลไคโตซานนั้นสามารถบ่งชี้ได้จากการลดลงของการบวมตัวและการลดลงของน้ำหนักที่หายไปของฟิล์มเมื่อเวลาที่ใช้ในเก็บฟิล์มเพิ่มขึ้น นอกจากนี้พฤติกรรมการบวมตัวของอนุพันธ์นี้ยังขึ้นกับค่าพีเอชและค่าไอออนิกสเตรนจ์ของสารละลายด้วย สำหรับไฮโดรเจลของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานนั้นถูกขึ้นรูปโดยมีการเชื่อมโยงพันธะของหมู่ซัคซินิกแอนไฮไดรด์ภายในโครงสร้างของไคโตซานซึ่งเกิดผ่านการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนเชิงซ้อนระหว่างไคโตซานกับซิริคแอซิด พบว่าการเพิ่มขึ้นของการแทนที่โดยหมู่ซัคซินิกแอนไฮไดรด์ทำให้การเชื่อมโยงระหว่างพันธะ, การดูดซับสีเขียวที่มีประจุบวก, ความว่องไวต่อการสลายตัวโดยไลโซไซม์เพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ความไม่เป็นพิษของไฮโดรเจลของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานต่อเซลล์ผิวหนังของหนูถูกยืนยันด้วยวิธีการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธีทางอ้อม การฉายรังสีแกมมาที่ความเข้มต่ำ (5-30 kGy) ไปยังสารละลายเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานที่มีความเข้มข้นต่ำนั้นทำให้น้ำหนักโมเลกุลของเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานลดลงอย่างมากและจากการวิเคราะห์โครงสร้างของอนุพันธ์ที่ถูกฉายรังสีพบว่า การฉายรังสีทำให้เกิดจากการขาดออกของสายโซ่หลักที่พันธะเชื่อมระหว่างโพลีแซคคาไรด์ (พันธะไกลโคซิดิก) และทำให้หมู่แทนที่บางส่วนถูกกำจัดออก จากผลการวิเคราะห์สมบัติทางเคมีกายภาพและความสามารถในการย่อยสลายได้ทางชีวภาพและความไม่เป็นพิษต่อเซลล์นั้นทำให้วัสดุขึ้นรูปของเอ็น-มาลีโออิลไคโตซานและเอ็น-ซัคซินิลไคโตซานมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ นอกจากนี้เอ็น-ซัคซินิลไคโตซานที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำยังสามารถผลิตได้จากการฉายรังสีแกมมาในช่วงความเข้มต่ำนี้ไปยังสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำของผลิตภัณฑ์ของเอ็น-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

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	viii
List of Figures	ix
Abbreviations	xii
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II LITERATURE REVIEW</b>	<b>3</b>
<b>III PREPARATION AND PHYSICO-CHEMICAL, AND PROPERTIES CHARACTERISTICS OF <i>N</i>-MALEOYL CHITOSAN FILMS</b>	<b>21</b>
3.1 Abstract	21
3.2 Introduction	21
3.3 Experimental	22
3.4 Results and Discussion	25
3.5 Conclusions	27
3.6 Acknowledgements	28
3.7 References	28

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
<b>IV SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF N-SUCCINYL CHITOSAN HYDROGEL FOR MEDICAL APPLICATION</b>	<b>38</b>
4.1 Abstract	38
4.2 Introduction	38
4.3 Experimental	41
4.4 Results and Discussion	45
4.5 Conclusions	50
4.6 Acknowledgements	50
4.7 References	51
<b>V EFFECT OF GAMMA RADIATION ON DILUTE AQUEOUS SOLUTIONS AND THIN FILMS OF N-SUCCINYL CHITOSAN</b>	<b>73</b>
5.1 Abstract	73
5.2 Introduction	73
5.3 Experimental	75
5.4 Results and Discussion	79
5.5 Conclusions	86
5.6 Acknowledgements	87
5.7 References	88
<b>VI CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>108</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>111</b>
<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>118</b>

## LIST OF TABLES

<b>TABLE</b>		<b>PAGE</b>
<b>CHAPTER II</b>		
2.1	Production of chitin in various conditions	5
2.2	The deacetylation process in various conditions	6
2.3	The water soluble derivatives of chitosan and their biological properties	13
2.4	The water soluble derivatives of chitosan and their biological properties	14
<b>CHAPTER IV</b>		
4.1	Synthesis conditions and characteristics of <i>N</i> -succinyl chitosan ( <i>N</i> -SC) products	72
<b>CHAPTER V</b>		
5.1	Synthesis conditions and characteristics of <i>N</i> -succinyl chitosan ( <i>N</i> -SC) products	102
5.2	Solubility of chitosan and <i>N</i> -SC products at various pH levels	103
5.3	SEC data of chitosan and <i>N</i> -SC products, after their dilute aqueous solutions had been exposed to $\gamma$ -ray radiation	104
5.4	SEC data of chitosan and <i>N</i> -SC products, after their films had been exposed to $\gamma$ -ray radiation	105
5.5	Analysis of FT-IR peak ratios of chitosan and <i>N</i> -SC products after their dilute aqueous solutions had been exposed to $\gamma$ -ray radiation	106
5.6	Elemental analysis data of chitosan and <i>N</i> -SC products, after their dilute aqueous solutions had been exposed to $\gamma$ -ray radiation	107



## LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
<b>CHAPTER II</b>		
2.1	Chemical structure of cellulose	4
2.2	Chemical structure of chitin and chitosan	4
2.3	Chemical structure of hyaluronic acid	8
2.4	Synthesis of <i>N</i> -carboxyacyl chitosan in methanol system	15
2.5	Synthesis of <i>N</i> -succinyl chitosan in dimethyl sulfoxide system	16
2.6	Synthesis of <i>N</i> -carboxyacyl chitosan in pyridine system	16
2.7	The crosslinking process of <i>N</i> -succinyl chitosan	18
<b>CHAPTER III</b>		
3.1	The FT-IR spectra of chitosan film (lower line) and Na <i>N</i> -maleoyl chitosan film (upper line)	30
3.2	The degree of swelling at different storage time of Na <i>N</i> -maleoyl chitosan films	31
3.3	The percentage of weight loss at different storage time of Na <i>N</i> -maleoyl chitosan films	32
3.4	The crosslink density of Na <i>N</i> -maleoyl chitosan films at different time of storage	33
3.5	The degree of swelling at different pH of 10 days Na <i>N</i> -maleoyl chitosan films	34
3.6	The degree of swelling at different ionic strength of 10 days Na <i>N</i> -maleoyl chitosan films. (▼ at pH= 9.0, ○ at pH=7.4, ● at pH= 2.0)	35
3.7	The tensile strength at different time of Na <i>N</i> - maleoyl chitosan films	36
3.8	The elongation at break at different time of Na <i>N</i> -maleoyl chitosan films	37

## CHAPTER IV

FIGURE	PAGE
4.1 Chemical structure of crystal violet dye	56
4.2 FT-IR spectra of chitosan (a) and chitosan-citric acid (b)	57
4.3 Chitosan-citric acid complexation and decomplexation	58
4.4 Comparison FT-IR spectra of chitosan, chitosan citric complex, <i>N</i> -SCG and <i>N</i> -SCW	59
4.5 FT-IR ratio of <i>N</i> -SCW and <i>N</i> -SCG	60
4.6 <sup>1</sup> H-NMR spectra of chitosan and <i>N</i> -SC products.	61
4.7 Degree of substitution of <i>N</i> -SCW and <i>N</i> -SCG	62
4.8 The propose mechanism of <i>N</i> -SCW and <i>N</i> -SCG formations	63
4.9 The swelling ratio of <i>N</i> -SCG films in pH 2.0 and pH 7.4 buffer solution	64
4.10 The weight loss of <i>N</i> -SCG films in pH 2.0 and pH 7.4 buffer solution	65
4.11 The crystal violet dye absorption characteristic of <i>N</i> -SCG films	66
4.12 The release characteristic of crystal violet dye loaded <i>N</i> -SCG films at pH 2.0 buffer solution	67
4.13 The release characteristic of crystal violet dye loaded <i>N</i> -SCG films at pH 7.4 buffer solution	68
4.14 The degradability of <i>N</i> -SCG films in PBS	69
4.15 The degradability of <i>N</i> -SCG films in lysozyme/PBS	70
4.16 Indirect cytotoxicity evaluation of <i>N</i> -SCG films against mouse fibroblasts cells	71

## CHAPTER V

FIGURE	PAGE
5.1 FT-IR spectra of (a) chitosan and <i>N</i> -succinyl chitosan ( <i>N</i> -SC) products: (b) 1 <i>N</i> -SC, (c) 3 <i>N</i> -SC and (d) 5 <i>N</i> -SC	91
5.2 <sup>1</sup> H-NMR spectra of chitosan and <i>N</i> -SC product	92
5.3 SEC chromatograms of chitosan and <i>N</i> -SC products	93
5.4 SEC chromatograms of (a) chitosan and <i>N</i> -SC products: (b) 1 <i>N</i> -SC, (c) 3 <i>N</i> -SC and (d) 5 <i>N</i> -SC, after their dilute aqueous solutions had been exposed to $\gamma$ -ray radiation of varying doses.	94
5.5 SEC chromatograms of (a) chitosan and <i>N</i> -SC products: (b) 1 <i>N</i> -SC, (c) 3 <i>N</i> -SC and (d) 5 <i>N</i> -SC, after their films had been exposed to $\gamma$ -ray radiation of varying doses	95
5.6 Weight-average molecular weights of chitosan and <i>N</i> -SC products after their dilute aqueous solutions and films had been exposed to $\gamma$ -ray radiation of varying doses	96
5.7 FT-IR spectra of neat and irradiated (a) chitosan and <i>N</i> -SC products (b) 1 <i>N</i> -SC, (c) 3 <i>N</i> -SC and (d) 5 <i>N</i> -SC. Keys: 1, neat samples; 2, 5 KGy; 3, 10 kGy and 4, 30 KGy	97
5.8 UV spectra of neat and irradiated (a) chitosan and <i>N</i> -SC products (b) 1 <i>N</i> -SC, (c) 3 <i>N</i> -SC and (d) 5 <i>N</i> -SC	98
5.9 <sup>1</sup> H-NMR spectra of original and irradiated chitosan (30 kGy, dilute aqueous solution)	99
5.10 <sup>1</sup> H-NMR spectra of original and irradiated 5 <i>N</i> -SC (30 kGy, dilute aqueous solution)	100
5.11 Proposed mechanism for <i>N</i> -elimination of irradiated chitosan and <i>N</i> -SC products in their dilute aqueous solution state	101

### ABBREVIATIONS

<i>N</i> -MC	<i>N</i> -maleoyl chitosan
Na <i>N</i> -MC	<i>N</i> -maleoyl chitosan sodium salt
<i>N</i> -SC	<i>N</i> -succinyl chitosan
Na <i>N</i> -SC	<i>N</i> -succinyl chitosan sodium salt
<i>N</i> -SCG	<i>N</i> -succinyl chitosan hydrogel
<i>N</i> -SCW	Water soluble <i>N</i> -succinyl chitosan
DA	Degree of acetylation
DD	Degree of deacetylation
DS	Degree of substitution
GlcNAc	<i>N</i> -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
$\gamma$ -ray	Gamma ray
EA	Elemental analysis
FTIR	Fourier-transformed infrared spectrometer
$^1\text{H}$ NMR	$^1\text{H}$ -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