

การเตรียมไกด์ดานที่มีพื้นผิวเป็นประจุเพื่อการตอบสนองทางชีวภาพอย่างเลือกจำเพาะ

นางสาว เยาวมาลย์ อังกิษาบูรณ์

# ศูนย์วิทยบริพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

สาขาวิชาปีโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พลูเมอร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6713-7

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

PREPARATION OF SURFACE-CHARGED CHITOSAN FOR  
SELECTIVE BIORESPONSES

Miss Yaowamand Angkitpaiboon

ศูนย์วิทยบริพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

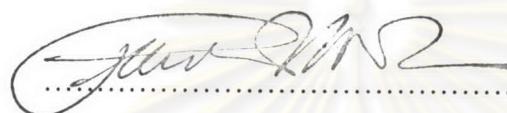
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Petrochemistry and Polymer Science

Faculty of Science  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2004  
ISBN 974-17-6713-7

**Thesis Title** Preparation of surface-charged chitosan for selective bioresponses  
**By** Miss Yaowamand Angkitpaiboon  
**Field of Study** Petrochemistry and Polymer Science  
**Thesis Advisor** Asst. Prof. Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.  
**Thesis Co-Advisor** Asst. Prof. Vipavee P. Hoven, 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  
(Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol, Ph.D.)

  
..... Thesis Co-Advisor  
(Assistant Professor Vipavee P. Hoven, Ph.D.)

  
..... Member  
(Assistant Professor Warinthorn Chavasiri, Ph.D.)

  
..... Member  
(Associate Professor Nuanphun Chantarasiri, Ph.D.)

เยาวมาลย์ อังกิจไพบูลย์: การเตรียมไคโตซานที่มีพื้นผิวเป็นประจุเพื่อการตอบสนองทางชีวภาพอย่างเลือกจำเพาะ (PREPARATION OF SURFACE-CHARGED CHITOSAN FOR SELECTIVE BIORESPONSES) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.วรรุตติ ตั้งสุชาดล; อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.ดร. วิภาวดี โยห์เว่น; 65 หน้า ISBN 974-17-6713-7

พื้นผิวของฟิล์มไคโตซานถูกทำให้มีประจุบวกและลบด้วยวิธีการสองวิธี วิธีการแรกเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอมิโนของไคโตซานกับเมทิลไอโอดีดเกิดเป็นเกลือความเทオร์นารีแอมิโนเนียมแสดงประจุเป็นบวก วิธีที่สองเป็นการติดโมเลกุลที่มีประจุลบของหมู่ชัลโไฟเนตด้วยการทำปฏิกิริยาเรดักท์ฟ้อลคิลเลชันของหมู่แอมิโนในด้วยเกลือของกรด 5-ฟอร์มิล-2-ฟิวแรนชัลโไฟนิก ผลจากการวิเคราะห์โดยเอทีอาร์-เอฟทีไออาร์สเปกโตรสโคปี เอ็กซ์เรย์โฟโตอิเล็กตรอนสเปกโตรสโคปีและเซคเตอร์โพเทนเทียล ช่วยยืนยันการเกิดเป็นหมู่ฟังก์ชันและประจุตามที่ต้องการ ผลจากค่ามุมสัมผัสของน้ำแสดงให้เห็นว่าฟิล์มที่ผ่านการดัดแปลงนั้นมีความชอบน้ำมากกว่าฟิล์มไคโตซานเดิม โปรตีนชนิดต่างๆที่มีค่าไอโซอิเล็กทริกต่างกันได้แก่ อัลบูมิน ไฟบริโนเจน ไลโซไซม์ และไรโบนิวคลีอีส ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการคุณภาพ โปรตีนบนพื้นผิวฟิล์มไคโตซานที่ผ่านการดัดแปลงแล้ว ผลงานการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสามารถทำให้เกิดประจุบนพื้นผิวโดยปฏิกิริยาต่างๆภายนอกซึ่งประจุดังกล่าวมีผลกระทบต่อการคุณภาพโปรตีน

## ศูนย์วิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร ปีตรีเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่อนิสิต ๑๗๒๒๐๙

สาขาวิชา ปีตรีเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ปีการศึกษา ๒๕๔๗ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

# # 4572442123: MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE  
 KEYWORD: CHITOSAN, SURFACE-CHARGED FILMS, QUATERNARY AMMONIUM GROUP, SULFONATED GROUP, PROTEIN ADSORPTION

YAOWAMAND ANGKITPAIBOON: PREPARATION OF SURFACE-CHARGED CHITOSAN FOR SELECTIVE BIORESPONSES. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. VARAWUT TANGPASUTHADOL, Ph.D. THESIS CO-ADVISOR: ASST. PROF. VIPAVEE P. HOVEN, Ph.D. 65 pp ISBN 974-17-6713-7

Two methods were used to create positive and negative charges on chitosan films. The first method involves the reaction between amino groups (-NH<sub>2</sub>) of chitosan with methyl iodide (MeI) to form positively-charged quaternary ammonium salts. The second method is to attach a molecule containing a negatively-charged sulfonate group by reductive alkylation of amino groups using 5-formyl-2-furan sulfonic acid (FFSA). Attenuated total reflectance infrared spectroscopy (ATR-IR), x-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and zeta potential measurement confirmed the presence of the designated functional groups on the films and charge formation. Both modified films were more hydrophilic than the non-modified film, as determined by water contact angle measurement. Various proteins having different isoelectric point (pI); albumin, fibrinogen, lysozyme and RNase, were used for studies of protein adsorption. This study has demonstrated that it is conceivable to generate surface charges on chitosan which influence its response to protein adsorption by heterogeneous reactions.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Program Petrochemistry and Polymer Science ..... Student's signature ..... *Yaowamand*

Field of study Petrochemistry and Polymer Science Advisor's signature ..... *Varawut*

Academic year ..... 2004 Co-advisor's signature ..... *Vipavee Hoven*

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research would have never been finished in a timely manner if not for endless efforts of my thesis advisor, Assistant Professor Dr. Varawut Tangpasuthadol and my thesis co-advisor, Assistant Professor Dr. Vipavee P. Hoven who always provide me the suggestion and encouragement throughout the course of this work.

I am sincerely grateful to Associate Professor Dr. Supawan Tantayanon; Assistant Professor Dr. Warinthorn Chavasiri and Associate Professor Dr. Nuanphun Chantarasiri for their invaluable suggestion as committee members. I would also like to acknowledge Prof. Dr. Suda Kiatkamjornwong for her invaluable comments and suggestions on research.

Special thanks go to Sensor Research Group for ATR-FTIR facility, Ms. Tomomi Ito and Associate Professor Yasuhiko Iwasaki from Tokyo Medical and Dental University for their assistance with zeta potential measurements and National Synchrotron Research Center for XPS facility. I gratefully acknowledge a research funding for graduate students from Graduate School of Chulalongkorn University and Research Team Promotion Grant, Thailand Research Fund (Principal Investigator: Prof. Dr. Suda Kiatkamjornwong) for financial support. I appreciate suggestions, comments and encouragement from all members of Organic Synthesis Research Unit.

Finally, I would like to affectionately give all gratitude to my family for patient support throughout my entire study.

คุณยุทธกร พยุง  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI .....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH .....	v
ACKNOWLEDGEMENTS .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF FIGURES .....	x
LIST OF TABLES .....	xii
LIST OF SCHEMES .....	xiii
LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS .....	xiv
CHAPTER I INTRODUCTION .....	1
1.1. Statement of the problem .....	1
1.2. Objectives .....	1
1.3. Scope of the investigation .....	2
1.4. Theory .....	3
1.4.1. Chitosan .....	3
1.4.2. Chemical modification of chitosan .....	4
1.4.3. Surface characterization .....	8
1.4.3.1 Attenuated total reflectance infrared (ATR-IR) spectroscopy .....	9
1.4.3.2 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) .....	10
1.4.3.3 Air-water contact angle measurement .....	12
1.4.3.4 Zeta-potential .....	14
1.4.4 Protein adsorption on polymer surface .....	16
CHAPTER II EXPERIMENTAL .....	21
2.1 Experimental design .....	21
2.2 Materials .....	21
2.3 Equipment .....	22

	Page
2.3.1 Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy .....	22
2.3.2 Attenuated total reflectance infrared (ATR-IR) spectroscopy .....	22
2.3.3 Air-water contact angle measurement .....	22
2.3.4 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) .....	23
2.3.5 Zeta-potential measurement .....	23
2.3.6 UV-spectroscopy .....	24
2.4 Preparation of chitosan films .....	24
2.5 Preparation of positively-charged chitosan film .....	24
2.6 Preparation of negatively-charged chitosan film .....	24
2.7 Protein adsorption .....	25
 CHAPTER III RESULTS AND DISCUSSION .....	 26
3.1. Determination of % degree of deacetylation (%DD) of chitosan by <sup>1</sup> H NMR .....	26
3.2. Preparation of positively-charged chitosan film .....	28
3.2.1. Effect of reaction time .....	32
3.2.2. Effect of MeI: NH <sub>2</sub> ratio .....	33
3.3. Preparation of negatively-charged chitosan film .....	36
3.3.1. Effect of reaction time .....	40
3.3.2. Effect of FFSA: NH <sub>2</sub> ratio .....	41
3.4. Charge characteristic by zeta-potential measurement .....	44
3.5. Protein adsorption of surface-modified chitosan films .....	45
3.5.1. Adsorption isotherm .....	45
3.5.2. Effect of surface charge on protein adsorption .....	48
3.5.2.1 Albumin (BSA) and fibrinogen (FIB) .....	49
3.5.2.2 Lysozyme (LYZ) and Ribonuclease (RNase) .....	51

CHAPTER IV CONCLUSIONS AND SUGGESTION .....	54
REFERENCES .....	55
APPENDICES .....	59
APPENDIX A .....	60
APPENDIX B .....	61
VITAE .....	65



ศูนย์วิทยบรังษยการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1.1 Diagram of ATR-IR .....	9
1.2 Schematic energy diagram of the X-ray photoelectron emission process and of excited ion decay .....	11
1.3 Effect of take-off angle to the depth profile .....	11
1.4 Equilibrium of the three-phase boundary on solid surface .....	12
1.5 A liquid droplet in equilibrium with a horizontal surface surrounded by a gas .....	13
1.6 Stern model of the electrochemical double layer .....	15
1.7 Schematic illustration of alternate layer-by-layer adsorption of polyanion and polycation onto a positively charged substrate .....	17
1.8 Schematic representation of the attraction and repulsion of proteins at the interfaces of polymer substrate .....	18
1.9 Three fundamental interaction forces involved in the protein adsorption .....	20
2.1 Instrument set up for the measurement of air-water contact angle .....	23
3.1 $^1\text{H}$ NMR spectrum of chitosan from Seafresh Chitosan (Lab) Co., Ltd. (Solvent: 1% $\text{CF}_3\text{COOD}$ in $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C) .....	27
3.2 $^1\text{H}$ NMR spectrum of QAC-film reacted with (a)3 ,(b) 6 and(c)12 equivalent of MeI (solvent: 1% $\text{CF}_3\text{COOH}$ in $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C). ....	29
3.3 Contour plots from $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ correlation of QAC film .....	30
3.4 Correlation between air-water contact angle of QAC film and reaction time using 0.46 M MeI in MeOH at 40 °C. (n=5) .....	32
3.5 Correlation between air-water contact angle QAC film and MeI: $\text{NH}_2$ ratio using MeI in MeOH for 8 h. (n=5) .....	33
3.6 XPS survey spectrum of chitosan film .....	34
3.7 XPS survey spectrum of QAC film .....	34
3.8 ATR-IR spectra of (a) chitosan film, QAC films as products of chitosan films reacted with (b) 3, (c) 6 and (d) 12 equivalent of MeI .....	36
3.9 $^1\text{H}$ NMR spectrum of SFC film reacted with (a) 1, (b) 3 and (c) 5 equivalent of FFSA (solvent:1% $\text{CF}_3\text{COOH}$ in $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C). ....	37

3.10	Contour plots from $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ correlation of SFC-film .....	38
3.11	Correlation between air-water contact angle of SFC film and reaction time using 0.10 M FFSA in MeOH. (n=5) .....	40
3.12	Correlation between air-water contact angle and FFSA: $\text{NH}_2$ ratio using FFSA in MeOH for 24 h. (n=5) .....	41
3.13	XPS survey spectrum of SFC-film .....	42
3.14	ATR-IR spectra of (a) chitosan film, SFC films as products of chitosan films reacted with (b) 1 and (c) 5 equivalent of FFSA .....	43
3.15	Zeta-potential data of unmodified and modified chitosan films .....	44
3.16	Adsorption isotherms of BSA on unmodified and modified chitosan films .....	46
3.17	Adsorption isotherms of FIB on unmodified and modified chitosan films .....	46
3.18	Adsorption isotherms of LYZ on unmodified and modified chitosan films .....	48
3.19	Adsorption isotherms of RNase on unmodified and modified chitosan films .....	48
3.20	Comparison of BSA adsorption on unmodified and modified chitosan films .....	50
3.21	Comparison of FIB adsorption on unmodified and modified chitosan films .....	50
3.22	Comparison of LYZ adsorption on unmodified and modified chitosan films .....	51
3.23	Comparison of RNase adsorption on unmodified and modified chitosan films .....	52
A-1	XPS survey spectrum of chitosan film immerses in solvent combined NaI .....	60
B-1	Formation of purple complex with BCA and cuprous ion generated from the biuret reaction .....	61
B-2	A calibration curve of the amount of albumin adsorbed and the absorbance obtained from BCA microassay .....	63

## LIST OF TABLES

Figure	Page
1.1 Typical protein characteristics .....	3
3.1 Information from $^1\text{H}$ NMR spectrum of chitosan used in this study .....	27
3.2 Peak assignment for $^1\text{H}$ NMR spectrum of QAC film .....	30
3.3 Percentage of degree of substitution (%DS) of quaternary ammonium group on chitosan films after reacting with MeI in MeOH for 8 h as determined by $^1\text{H}$ -NMR .....	31
3.4 XPS atomic composition of chitosan and QAC films .....	35
3.5 Peak assignment for $^1\text{H}$ NMR spectrum for SFC film .....	38
3.6 Percentage of degree of substitution (%DS) of sulfonate group on chitosan films after reacting with FFSA in MeOH for 24 h as determined by $^1\text{H}$ -NMR .....	39
3.7 XPS atomic composition of chitosan and SFC film .....	42
3.8 Physical properties of proteins used in this investigation .....	45
A-1 XPS atomic composition of modified and unmodified chitosan film .....	60
B-1 Standard BSA solution, for the calibration curve .....	62
B-2 The amount of protein adsorption per surface area ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) of modified chitosan film, as initial concentration 1 mg/ml .....	64
B-3 Air-Water contact angle of modified and unmodified chitosan film .....	64

## LIST OF SCHEMES

Scheme	Page
1.1 Structures of chitin and chitosan .....	4
1.2 Nucleophilic reaction of chitosan .....	4
1.3 Synthesis of quaternary ammonium chitosan (QAC) .....	5
1.4 Synthesis of quaternary ammonium salt of <i>N</i> -alkyl chitosan .....	6
1.5 Synthesis of sulfonate derivatives of chitosan .....	7
1.6 Synthesis of <i>N</i> -sulfofurfuryl chitosan .....	8
1.7 Chemical structure of ionic and non-ionic monomers used .....	17
1.8 Attachment of carboxylic acid derivatives on to the surface of chitosan film <i>via</i> amide linkages .....	19
3.1 Reaction between chitosan film and MeI .....	28
3.2 Reaction between chitosan film and FFSA .....	28


  
**ศูนย์วิทยาศาสตร์พยากรณ์**  
**จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย**

## LIST OF ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

% DD	: Percent degree of deacetylation
QAC	: Quaternary ammonium chitosan
SFC	: <i>N</i> -sulfofurfuryl chitosan
NMR	: Nuclear magnetic resonance spectroscopy
ATR-FTIR	: Attenuated Total Reflectance-Fourier Transform Infrared Spectroscopy
XPS	: X-ray photoelectron spectroscopy
FFSA	: 5-Formyl-2-furan sulfonic acid, sodium salt
%DS	: Percent degree of substitution
PBS	: Phosphate buffer saline
BCA	: Bicinchoninic acid
BSA	: Bovine serum albumin
FIB	: Bovine serum fibrinogen
LYZ	: Lysozyme
RNase	: Ribonuclease
SDS	: Sodium dedecyl sulfate
°C	: Degree Celcius
h	: Hour
ml	: Milliliter
$\theta$	: Angle of incidence
$\mu$	: Micro