

การเตรียมและการศึกษาการปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาคแคลเซียมแอลจินเนต-อนุพันธ์โคโทซานที่
บรรจุกลูโคซามีน



นายวิทยา ภมรวานนท์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาปิโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2556
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



5372330623

PREPARATION AND GLUCOSAMINE RELEASE STUDIES OF GLUCOSAMINE-LOADED
CALCIUM ALGINATE-DERIVATIZED CHITOSAN PARTICLES

Mr. Wittaya Pamornwaranon



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 2013
Copyright of Chulalongkorn University

วิทยา ภมรรวณนที : การเตรียมและการศึกษาการปล่อยกลูโคซามีนของอนุภาค แคลเซียมแอลจีเนต-อนุพันธ์ไคโทซานที่บรรจุกลูโคซามีน. (PREPARATION AND GLUCOSAMINE RELEASE STUDIES OF GLUCOSAMINE-LOADED CALCIUM ALGINATE-DERIVATIZED CHITOSAN PARTICLES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. วราวุฒิ ตั้งพสุธาตล, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. ปราณี โรจนสีทธิศักดิ์, 57 หน้า.

อนุภาคระดับไมโครเมตรของพอลิเมอร์ธรรมชาติ เตรียมจากสารเชิงซ้อนพอลิอิเล็กโทรไลต์ของ แคลเซียม, แอลจีเนต, และไคโทซานหรือ เอ็น-บิวทิลไคโทซาน เพื่อกักเก็บกลูโคซามีน ไฮโดรคอลลอยด์ซึ่งเป็นสารละลายน้ำ เอ็น-บิวทิลไคโทซานสังเคราะห์จากปฏิกิริยารีดักทีฟแอลคิลเลชันโดยใช้บิวทิลอลดีไฮด์ไคโทซานที่มีระดับการแทนที่สูงถึง 46% อนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนมีขนาดอยู่ในช่วง 300-400 นาโนเมตร ประจุนผิวอนุภาคเป็นลบ ค่าความต่างศักย์ซีต้าอยู่ในช่วง -26 ถึง -29 มิลลิโวลต์ ลักษณะของอนุภาคที่มี เอ็น-บิวทิลไคโทซานล้อมรอบแอลจีเนตแสดงให้เห็นโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน การใช้เอ็น-บิวทิลไคโทซานที่มีระดับของหมู่บิวทิลแทนที่สูง นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของประสิทธิภาพการบรรจุกลูโคซามีนไฮโดรคอลลอยด์สูงถึง 67% จากการศึกษาการปล่อยกลูโคซามีนพบว่า มีผลของการระบุดอกของกลูโคซามีนในช่วงเวลา 3 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นอัตราการปล่อยช้าลงและคงที่หลังจากผ่านไป 6 ชั่วโมงในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.4) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนถูกนำไปใช้ผสมกับสารก่อเจลของคาโบพอล เพื่อเตรียมเป็นตำรับยาทาผิวหนัง การศึกษาการปล่อยกลูโคซามีนผ่านการเลียนแบบผิวหนังโดยใช้เซลล์โลสแอซิเทตเมมเบรน พบว่ากลูโคซามีนปลดปล่อยอย่างต่อเนื่องถึงระยะเวลา 8 ชั่วโมง หลังจาก 12 ชั่วโมงผ่านไปการปล่อยกลูโคซามีนด้วยอัตราที่ช้าลงจนคงที่ นอกจากนี้ในการศึกษาเสถียรภาพทางกายภาพของอนุภาคที่บรรจุกลูโคซามีนโดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องพบว่า ขนาดของอนุภาคจะเกิดการรวมตัวทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นภายในระยะเวลา 7 วัน

สาขาวิชา ปีโตรเคมีและวิทยาศาสตร์พอลิเมอร์
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อ นิสิต วิชา ภมรรวณนที
ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก *[Signature]*

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม *[Signature]*

5372330623 : MAJOR PETROCHEMISTRY AND POLYMER SCIENCE

KEYWORDS: ALGINATE / CHITOSAN / N-BUTYL CHITOSAN / GLUCOSAMINE /
CONTROLLED RELEASE

WITTAYA PAMORNWARANON: PREPARATION AND GLUCOSAMINE RELEASE
STUDIES OF GLUCOSAMINE-LOADED CALCIUM ALGINATE-DERIVATIZED
CHITOSAN PARTICLES. ADVISOR: ASST. PROF. VARAWUT
TANGPASUTHADOL, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. PRANEE
ROJSITTHISAK, Ph.D., 57 pp.

Submicron biopolymeric particles prepared from polyelectrolyte complex between calcium, alginate, and chitosan or *N*-butyl chitosan were prepared with the aim to entrap water- soluble glucosamine hydrochloride (GH). *N*-butyl chitosan was synthesized by reductive alkylation using butyraldehyde, with degree of substitution (DS) of 46%. The particle size was in a range of 300-400 nm with zeta potentials of -26 to -29 mV. Transmission electron microscopy (TEM) was used to reveal *N*-butyl chitosan shell surrounding alginate core. Using *N*-butyl chitosan with high degree of butylation led to an increase in GH loading efficiency of up to 67%. GH release profile exhibited burst effect in 3 h. Then the release rate decreased slowly and reached equilibrium after 6 h of incubation in phosphate buffer pH 7.4 at 37°C. The GH-loaded particles were formulated in gel form by mixing into carbopol gel. Simulated skin permeation study of GH from particle in gel using cellulose acetate membrane with pore size 0.2 μm shown that GH was continuously released up to 8 h. After 12 h, GH was slowly released until constant. Finally, physical stability of particles in the suspension and gel containing GH-loaded particles was evaluated at room temperature. The particle size was found to be significantly larger after storing in the gel for more than 7 days, suggesting aggregation of particles.

Field of Study: Petrochemistry and
Polymer Science

Academic Year: 2013

Student's Signature Wittaya Pamornwaranon

Advisor's Signature Prof. Varawut Tangpasuthadol

Co-Advisor's Signature Pranee Rojsitthisak

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis was successfully achieved from the cooperation of many individuals. First of all, I would like to express my appreciation to my major advisor, Assistant Professor Varawut Tangpasuthadol for his valuable comments, suggestion and support given through out my study.

The another important person that i would like to express gratitude and appreciation to my co-advisor. Assistant Professor Praanee Rojsitthisak for her kindness, helpful suggestion and all support through out this work.

I wish to express my grateful thank to Associate Professor Pattarapan Prasassarakich, chairman of thesis committee, Associate Professor Voravee Hoven, examiner for their valuable advice. I also express my appreciation to Dr. Wanida Janvikul from National Metal and Materials Technology Center (MTEC), thesis external committee for her kindness and valuable comments.

The financial support for this project was provided by CU GRADUATE SCHOOL THESIS GRANT and National Research Project Management (NRPM) , Office of the National Research Council of Thailand, for providing research fund. The authors also would like to thank Metallurgy and Materials Science Research Institute for providing laboratory and equipment facilities.

Finally, I would like to express my honest thanks to my friends, my family, and especially my parents for their help, cheerful, and encouragement.



CONTENTS

	Page
THAI ABSTRACT	iv
ENGLISH ABSTRACT	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	ix
LIST OF FIGURES	x
LIST OF ABBREVIATIONS	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
1.1 Statement of problem	1
1.2 Objectives	2
CHAPTER II THEORY AND LITERATURE REVIEW	3
2.1 Alginate and chitosan-a co-biopolymer as a drug carriers.....	3
2.2 Controlled release system	7
2.2.1 Diffusion controlled release.....	7
2.2.2 Swelling controlled release	8
2.2.3 Erosion controlled release.....	9
2.3 Glucosamine	9
2.4 Transdermal delivery systems.....	11
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	13
3.1 Materials	13
3.2 Methods.....	14
3.2.1 Synthesis of <i>N</i> -butyl chitosan (NBC).....	14
3.2.2 Particle preparation of GH-loaded particles.....	15
3.2.3 Particles analysis.....	16
3.2.3.1 Determination of particle size and zeta potential	16
3.2.3.2 Morphology analysis.....	16
3.2.3.3 Evaluation of loading efficiency.....	17



	Page
3.2.3.4 Analysis of glucosamine by PITC derivatization and HPLC.....	18
3.2.4 Release study of GH from particles	19
3.2.5 Formulation of gel containing GH-loaded particles	19
3.2.5.1 permeation study of drug through cellulose acetate membrane	20
3.2.6 Stability test.....	21
3.2.7 Statistical analysis.....	21
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	23
4.1 <i>N</i> -butyl chitosan synthesis – controlling <i>N</i> -butylation on chitosan	23
4.1.1 Structure characterization	25
4.2 Particles preparation.....	27
4.3 Evaluation of GH contents	30
4.4 Release study.....	35
4.4.1 GH release study of particles in phosphate buffer medium.....	35
4.4.2 In vitro drug permeation through membrane	37
4.4.2.1 Preparation of carbopol gel containing GH-loaded particles	37
4.4.2.2 GH permeation profiles	37
4.5 Stability test	39
4.5.1 Physical stability in suspension of GH-loaded particles	39
4.5.2 Physical stability of formula gel.....	40
CHAPTER V CONCLUSIONS	42
REFERENCES	43
APPENDIX.....	45
VITA.....	57



LIST OF TABLES

	Page
Table 3.1 Formulation of gel preparation	20
Table 4.1 Physical appearance and yield of <i>N</i> -butyl chitosan by controlling a proportion of butyraldehyde to amino group on chitosan	24
Table 4.2 Chemical shift (δ) of <i>N</i> -butyl chitosan.....	24
Table 4.3 Degree of substitution (DS) of butyl group on chitosan	26
Table 4.4 Characteristics of GH loaded calcium-alginate-chitosan and calcium-alginate- <i>N</i> -butyl chitosan particles	27
Table 4.5 Comparison of particle yields obtained from two particle separation methods	29
Table 4.6 The influence of GH:ALG mass ratio on loading efficiency of different types of GH-loaded particles	33
Table 4.7 The GH content, the loading efficiency of GH and the loading capacity of GH in the particles were determined by method I (GH:alginate weight ratio of 2.5:1), all data shown were averaged from three sets of experiments	34
Table 4.8 The GH content, the loading efficiency of GH in particles was determined by method II and %recovery of GH (GH:alginate weight ratio of 2.5:1). All data shown were averaged from three sets of experiments	35
Table 4.9 Initial amount of GH in 5 g of particles.....	35
Table 4.10 Appearance and pH of gel preparation.....	37
Table 4.11 Linear relationship and Flux of GH-gel, GH-ALG-CTS gel and GH-ALG-46%NBC gel across cellulose acetate membrane at 0-8 h.....	39
Table 4.12 The pH, mean particle size, and zeta potential of GH-ALG-CTS particles and GH-ALG-46%NBC particles in suspension for stability tests for 60 days.....	40
Table 4.13 The physical appearance and GH content of gel formulation stored at 1st day and 30th day	41



LIST OF FIGURES

	Page
Figure 2.1 Copolymer of α -L-guluronic acid and β -D-mannuronic acid in alginate.....	3
Figure 2.2 Structure of chitin and chitosan	4
Figure 2.3 Reductive alkylation mechanism of chitosan.....	4
Figure 2.4 The effect of order of mixing on the particle size.....	5
Figure 2.5 The effect of Ca^{2+} : alginate mass ratio on the particle size of calcium-alginate-poly-L-lysine (■) and calcium-alginate-chitosan (□), 0.6 mg/ml of alginate concentration and 0.1 of cationic polymer ratio	6
Figure 2.6 The effect of cationic polymer to alginate mass ratio on the particle size of calcium-alginate-poly-L-lysine (■) and calcium-alginate-chitosan (●), 0.6 mg/ml of alginate concentration and 0.17 of Ca^{2+} : alginate mass ratio	7
Figure 2.7 Schematic of diffusion-controlled release [15].....	8
Figure 2.8 Schematic of swelling-controlled release [15].....	8
Figure 2.9 Schematic of erosion-controlled release [15]	9
Figure 2.10 Chemical structure of glucosamine hydrochloride.....	10
Figure 2.11 Transdermal profile of Mediflex TM glucosamine cream in human volunteers during the course of 8-hr study [20].....	12
Figure 2.12 Comparing the efficiency of Mediflex TM glucosamine cream and oral delivery of glucosamine into blood of adult mice [20]	12
Figure 3.1 Synthesis of <i>N</i> -butyl chitosan.....	14
Figure 3.2 Derivatization of glucosamine	17
Figure 3.3 The components of Franz diffusion cell cell [23] (a) and instrument setup for permeation study (b).....	22
Figure 4.1 ¹ H NMR spectra of <i>N</i> -butyl chitosan.....	25
Figure 4.2 Transmission electron micrographs of particles: (a) GH-ALG-CTS and (b) GH-ALG-46%NBC stained by phosphotungstic acid; (c) GH-ALG-CTS and (d) GH-ALG-46%NBC stained by 1% uranyl acetate.....	28



	Page
Figure 4.3 SEM micrographs of separated components after centrifugation using centrifugal filter tube (A) filtrate and (B) filtered solid	30
Figure 4.4 Reaction mechanism of phenylthiocarbonyl-glucosamine synthesis from glucosamine and phenylisothiocyanate.....	31
Figure 4.5 ¹ H NMR spectrum of phenylthiocarbonyl-glucosamine	32
Figure 4.6 A HPLC chromatogram of 500 µg/ml phenylthiocarbonyl-glucosamine at flow rate 1.5 mL/min with retention time 5.866	32
Figure 4.7 Comparison of cumulative GH release percentage from the particles having different butyl content of chitosan (GH: alginate weight ratio =2.5: 1)	36
Figure 4.8 Permeation profiles of 1%GH-gel, GH-ALG-CTS gel and GH-ALG-46%NBC gel across cellulose acetate membrane, a magnified plot of the first 8 h of incubation is also shown	38
Figure 4.9 Comparison of %cumulative GH release of 1% GH-gel, GH-ALG-CTS gel and GH-ALG-46%NBC gel across cellulose acetate membrane.....	39
Figure 4.10 Photographs of gel formulation stored at 1st day and 30th day; A) 1%GH-gel, B) GH-ALG-CTS gel and C) GH-ALG-46%NBC	41



LIST OF ABBREVIATIONS

ALG	: alginate
CTS	: chitosan
GH	: glucosamine hydrochloride
GAGs	: glycosaminoglycans
NBC	: <i>N</i> -butyl chitosan
TMC	: <i>N,N,N</i> -trimethylammonium chitosan chloride
GTMAC	: glycidyl-trimethyl-ammonium chloride
HTCC	: <i>N</i> -[(2-hydroxyl-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride
EtOH	: ethanol
MeOH	: methanol
ACN	: acetonitrile
TFA	: trifluoroacetic acid
PBS	: phosphate buffer saline
PA	: phosphotungstic acid
UA	: uranyl acetate
PITC	: phenylisothiocyanate
TGC	: transdermal glucosamine cream
PTFE	: polytetrafluoroethylene
DD	: degree of deacetylation
DS	: degree of substitution
LE	: loading efficiency
LC	: loading capacity
MW	: molecular weight
MWCO	: molecular weight cutoff
eq	: equivalent
SD	: standard deviation
PDI	: polydispersity index



NMR	: Nuclear magnetic resonance spectroscopy
TEM	: Transmission electron microscopy
SEM	: Scanning electron microscopy
DLS	: Dynamic light scattering
HPLC	: High performance liquid chromatography
UV	: ultra violet
kDa	: kilo dalton
h	: hour
min	: minute
s	: second
g	: gram
mg	: milligram
μg	: microgram
ml	: milliliter
μl	: microliter
cm	: centimeter
mm	: millimeter
nm	: nanometer
$^{\circ}\text{C}$: degree Celsius
$^{\circ}\text{F}$: degree Fahrenheit
ppm	: part per million
mV	: millivolt
M	: molar
rpm	: round per minute
pH	: power of hydrogen ion or the negative logarithm (base ten)
F	: flux
Q_p	: Cumulative amount of drug permeated through a unit area of membrane



$C_{G,1}$: concentration of glucosamine
V	: volume
A	: area
w/w	: weight/weight
v/v	: volume/volume
%	: percentage

