

**PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-COATED
ALGINATE NANOPARTICLES CONTAINING DACARBAZINE**

Miss Aranee Torcharoenrungduan

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmaceutical Technology**

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

การเตรียมและการศึกษาลักษณะเฉพาะของอัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลของคาร์บอน
ที่เคลือบด้วยไคโตซาน

นางสาว อารณี ต่อเจริญรุ่งเดือน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

500554

อารณี ต่อเจริญรุ่งเรือง : การเตรียมและการศึกษาลักษณะเฉพาะของอัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิล
ของคาคาร์บาซินที่เคลือบด้วยไคโตซาน (PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF
CHITOSAN-COATED ALGINATE NANOPARTICLES CONTAINING DACARBAZINE)
อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.อุบลทิพย์ นิมมานนิตย์, 79 หน้า

อัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลของคาคาร์บาซินที่เคลือบด้วยไคโตซาน เตรียมโดยการทำให้เกิดพรีเจล
ของอัลจินเตนและแคลเซียมคลอไรด์ ตามด้วยการจับแข็งซ้อนระหว่างอัลจินเตนและไคโตซาน ในการศึกษา
ได้เตรียมสูตรตำรับ 6 สูตร โดยใช้ปริมาณคาคาร์บาซินต่างกัน 3 ขนาด (1, 2 และ 5 มิลลิกรัม) และใช้
ไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลและระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล ต่างกัน 2 ขนาด (น้ำหนักโมเลกุล 15000
คาลตัน, ระดับการกำจัดหมู่อะซิทิล 90% และ น้ำหนักโมเลกุล 100000 คาลตัน, ระดับการกำจัดหมู่
อะซิทิล 95%) ลักษณะอนุภาคของคาคาร์บาซินนาโนพาร์ทิเคิลที่ได้มีรูปร่างกลม อัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิล
ที่มีคาคาร์บาซิน 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมที่เคลือบด้วยไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 15000 คาลตัน และ
อัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลที่มีคาคาร์บาซิน 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมที่เคลือบด้วยไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล
100000 คาลตัน มีขนาดอนุภาคเท่ากับ 489.03 ± 2.39 , 538.33 ± 5.69 , 556.90 ± 10.55 , 548.67 ± 7.51 ,
 559.00 ± 6.56 และ 584.77 ± 17.18 นาโนเมตร ตามลำดับ ดัชนีการกระจายขนาดอนุภาค เท่ากับ
 0.57 ± 0.03 , 0.30 ± 0.01 , 0.54 ± 0.03 , 0.38 ± 0.01 , 0.42 ± 0.06 และ 0.41 ± 0.03 ตามลำดับ ประจุนผิว
อนุภาคเป็นลบ ค่าความต่างศักย์ซีต้า เท่ากับ -28.13 ± 0.40 , -28.30 ± 0.53 , -28.97 ± 0.15 , -28.03 ± 0.29 ,
 -28.03 ± 0.47 และ -28.07 ± 0.21 มิลลิโวลต์ ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้พบว่า ขนาดอนุภาคเพิ่มขึ้นเมื่อ
ปริมาณของคาคาร์บาซินมาก คาคาร์บาซินมีผลต่อประจุนผิวอนุภาคโดยเพิ่มความเป็นลบของค่าความ
ต่างศักย์ซีต้าโดยไม่ขึ้นกับขนาดยาในขณะที่น้ำหนักโมเลกุลของไคโตซานไม่มีผลต่อค่าความต่างศักย์ซีต้า
ประสิทธิภาพการกักเก็บคาคาร์บาซินอัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลที่มีคาคาร์บาซิน 1, 2 และ 5 มิลลิกรัมที่
เคลือบด้วยไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 15000 คาลตัน และ อัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลที่มีคาคาร์บาซิน 1,
2 และ 5 มิลลิกรัมที่เคลือบด้วยไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 100000 คาลตัน เท่ากับ 38.19 ± 0.84 %,
 40.14 ± 0.35 % , 31.36 ± 1.14 % , 39.21 ± 0.56 % , 41.55 ± 0.49 % และ 33.34 ± 1.46 % ตามลำดับ
อัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลที่มีคาคาร์บาซิน 2 มิลลิกรัมที่เคลือบด้วยไคโตซานซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 15000
คาลตัน และ 100000 คาลตัน แสดงประสิทธิภาพการกักเก็บสูงสุด ความคงตัวของคาคาร์บาซินในรูป
อัลจินเตนาโนพาร์ทิเคิลที่เคลือบด้วยไคโตซาน ในสารละลายกรดซิตริกที่มีค่าความเป็นกรด 3-4 และใน
สารละลายน้ำเกลือ ไม่ว่าจะเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ดีกว่าคาคาร์บาซินที่ไม่ได้
อยู่ในรูปนาโนพาร์ทิเคิล เมื่อเก็บไว้ไม่เกิน 72 ชั่วโมง

สาขาวิชา เทคโนโลยีเภสัชกรรม ลายมือชื่อนิสิต..... อารณี ต่อเจริญรุ่งเรือง
ปีการศึกษา.....2550.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....*Ubolthip Nimmannit*

4976854133: MAJOR PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY

KEY WORD: DACARBAZINE / NANOPARTICLES / ALGINATE / CHITOSAN

ARANEE TORCHAROENRUNGDUAN: PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF CHITOSAN-COATED ALGINATE NANOPARTICLES CONTAINING DACARBAZINE. THESIS PRINCIPAL ADVISOR: ASSOC. PROF. UBONTHIP NIMMANNIT, Ph.D., 79 pp.

Chitosan-coated alginate nanoparticles containing dacarbazine were prepared by ionotropic pre-gelation of alginate with calcium chloride followed by complexation between alginate and chitosan. Six formulations using three concentrations of dacarbazine (1, 2 and 5 mg) and two different molecular weight and percent deacetylation of chitosans (MW 15000 Da, 90% deacetylation and MW 100000 Da, 95% deacetylation) were studied. The obtained nanoparticles were spherical. Alginate nanoparticles containing 1, 2 and 5 mg dacarbazine which were coated with 15000 Da chitosan and those which were coated with 100000 Da chitosan had the particle sizes of 489.03 ± 2.39 , 538.33 ± 5.69 , 556.90 ± 10.55 , 548.67 ± 7.51 , 559.00 ± 6.56 and 584.77 ± 17.18 nm, respectively with the polydispersity index of 0.57 ± 0.03 , 0.30 ± 0.01 , 0.54 ± 0.03 , 0.38 ± 0.01 , 0.42 ± 0.06 and 0.41 ± 0.03 , respectively and the zeta potential values of -28.13 ± 0.40 , -28.30 ± 0.53 , -28.97 ± 0.15 , -28.03 ± 0.29 , -28.03 ± 0.47 and -28.07 ± 0.21 mV, respectively. The results showed that the mean particle size of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles increased when the amount of drug increased. The negative value of zeta potential increased independently on the amount of drug, whereas the molecular weight of chitosan did not influence to the zeta potential. The entrapment efficiency of alginate nanoparticles containing 1, 2 and 5 mg dacarbazine which were coated with 15000 Da chitosan and of those which were coated with 100000 Da chitosan were 38.19 ± 0.84 %, 40.14 ± 0.35 %, 31.36 ± 1.14 %, 39.21 ± 0.56 %, 41.55 ± 0.49 % and 33.34 ± 1.46 %, respectively. The obtained nanoparticles which contained 2 mg of dacarbazine coated with chitosan either 15000 Da or 100000 Da showed the highest percentage of entrapment efficiency. The stability in pH 3-4 citric acid solution and in normal saline solution, either at room temperature or at 2-8°C of dacarbazine in chitosan-coated alginate nanoparticles was better than that of free dacarbazine up to 72 hours of storage.

Field of study Pharmaceutical Technology Student's signature..... *Araanee Torcharoenrungduan*
 Academic year.....2007..... Principal Advisor's signature..... *Ubonthip Nimmannit*

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my profound gratitude and appreciation to my advisor, Associate Professor Dr. Ubonthip Nimmannit for her valuable comments and suggestions, her kindness and constant encouragement throughout my study. I am very much obliged to the members of my thesis committee for their scrutiny and discussion.

I would like to thank The Government Pharmaceutical Organization (GPO) for the financial support throughout my study.

I have my sincere thanks to Miss Dontree Katesuwannasink, head of Sterile Production section 1, for her kindness, understanding and support. Also thanks to my subordinates in this section for their support and encouragement.

I would like to express appreciate to all the faculty members in the Pharmaceutical Technology (International Program) for their help and encouragement.

Above all, my deep appreciation goes to my friends and other people, whose names have not been mentioned, for helping me in anyway during the time of my study.

Finally, I would like to express my sincerest and deepest gratitude to my parents for their love, care, understanding and support.

CONTENTS

	PAGE
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	ix
LIST OF FIGURES.....	xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II LITERATURE REVIEW.....	4
1. Melanoma.....	4
2. Dacarbazine.....	8
3. Nanoparticles.....	11
4. Polymeric nanoparticles.....	14
5. Alginates.....	15
6. Chitosans.....	19
7. Chitosan-coated alginate nanoparticles.....	21
8. Freeze-drying.....	22
9. HPLC Method.....	24
10. The stability of the drug.....	25
III MATERIALS AND METHODS.....	27
1. Preparation of chitosan-coated alginate nanoparticles containing dacarbazine.....	29
2. Characterization of nanoparticles.....	30
3. Determination of entrapment efficiency.....	31
4. Freeze-drying process.....	34
5. Stability evaluation.....	34
6. Statistical study.....	35

	PAGE
CHAPTER	
IV RESULTS AND DISCUSSION.....	36
1. Preparation of chitosan-coated alginate nanoparticles containing dacarbazine.....	36
2. Characterization of nanoparticles.....	38
3. Determination of entrapment efficiency	41
4. Freeze-drying process.....	51
5. Stability evaluation.....	53
V CONCLUSIONS.....	62
REFERENCES.....	64
APPENDIX.....	69
VITA.....	79

LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
1. The percent yield of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 dalton.....	36
2. The percent yield of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 dalton.....	37
3. Mean particle size, polydispersity index and zeta potential of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 dalton.....	39
4. Mean particle size, polydispersity index and zeta potential of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 dalton.....	39
5. The percentage of entrapment efficiency of dacarbazine in alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 dalton	42
6. The percentage of entrapment efficiency of dacarbazine in alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 dalton	43
7. The amount of entrapped, unentrapped and % recovery of dacarbazine in alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 dalton	43
8. The amount of entrapped, unentrapped and % recovery of dacarbazine in alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 dalton	44
9. Reproducibility (% RSD) and tailing factor of five replicate injections of the standard solution.....	45
10. The concentration and peak area of dacarbazine standard solutions for analysis.....	46
11. Accuracy of analytical method for dacarbazine nanoparticles obtained from dacarbazine standard solutions.....	47
12. Repeatability (intra-assay precision) of analytical method obtained from sample solutions.....	48
13. Intermediate precision of analytical method obtained from sample solutions.....	48

TABLE	PAGE
14. Linearity of analytical method obtained from dacarbazine standard solutions.....	49
15. Linearity of analytical method obtained from sample solutions.....	50
16. Mean particle size, polydispersity index and zeta potential of freeze-dried dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles after reconstituted.....	53
17. The stability of formula 1 and formula 2 dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles compared with free dacarbazine.....	54
18. Mean particle size of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles with two different molecular weight of chitosan and various in dacarbazine concentration.....	70
19. Polydispersity index (PI) of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles with two different molecular weight of chitosan and various in dacarbazine concentration.....	73
20. Zeta potential of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles with two different molecular weight of chitosan and various in dacarbazine concentration.....	74
21. Amount of unentrapped dacarbazine analyzed from supernatant and washed fraction	77
22. Amount of entrapped dacarbazine analyzed from dacarbazine nanoparticles.....	77
23. The percentage of entrapment efficiency of dacarbazine in chitosan-coated alginate nanoparticles	78

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
1. Structure of dacarbazine	9
2. DTIC metabolic pathway	10
3. Alginate block types: G is guluronic acid, M is mannuronic acid.....	17
4. Probable binding mode between the calcium ion and two G residues.....	17
5. The chemical structure of chitosan.....	20
6. Transmission electron micrographs of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles after ultracentrifugation	37
7. Transmission electron micrographs of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles	41
8. The chromatogram of dacarbazine analysis.....	45
9. The calibration curve of dacarbazine.....	46
10. Transmission electron micrographs of freeze-dried dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles after reconstituted.....	52
11. The percentage of remaining dacarbazine in citric acid at room temperature.....	55
12. The percentage of remaining dacarbazine in citric acid at 2-8°C.....	56
13. The percentage of remaining dacarbazine in normal saline solution (NSS) at room temperature.....	56
14. The percentage of remaining dacarbazine in normal saline solution (NSS) at 2-8°C.....	57
15. The percentage of remaining dacarbazine from dacarbazine chitosan-coated alginate nanopartices formula 1 compared with free dacarbazine in citric acid solution pH 3-4.....	59
16. The percentage of remaining dacarbazine from dacarbazine chitosan-coated alginate nanopartices formula 1 compared with free dacarbazine in normal saline solution (NSS).....	60

FIGURE	PAGE
17. The percentage of remaining dacarbazine from dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles formula 2 compared with free dacarbazine in citric acid solution pH 3-4.....	60
18. The percentage of remaining dacarbazine from dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles formula 2 compared with free dacarbazine in normal saline solution (NSS).....	61
19. Size distribution of dacarbazine alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 containing dacarbazine 1 mg.....	70
20. Size distribution of dacarbazine alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 containing dacarbazine 2 mg.....	71
21. Size distribution of dacarbazine alginate nanoparticles coated with chitosan 15000 containing dacarbazine 5 mg.....	71
22. Size distribution of dacarbazine alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 containing dacarbazine 1 mg.....	71
23. Size distribution of dacarbazine alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 containing dacarbazine 2 mg.....	72
24. Size distribution of dacarbazine alginate nanoparticles coated with chitosan 100000 containing dacarbazine 5 mg.....	72
25. Transmission electron micrographs of dacarbazine chitosan-coated alginate nanoparticles.....	75

LIST OF ABBREVIATIONS

°C	degree Celsius
DTIC	dacarbazine
h	hour
HPLC	high performance liquid chromatography
µg	microgram
µL	microliter
µm	micrometer
M	molar, mole per liter
mM	millimolar, millimole per liter
mg	milligram
mL	milliliter
mm	millimeter
min	minute
mV	millivolt
MW	Molecular Weight
NP	nanoparticles
nm	nanometer
rpm	revolution per minute
sec	second
RSD	relative standard deviation
SD	standard deviation
TEM	transmission electron microscope
USP	United State Pharmacopeia
ICH	The International Conference on Harmonization
UV	ultraviolet