

การสังเคราะห์แคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนเดนไดรเมอร์
และการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กับโคโคซาน



นางสาวเบญจมาศ คล้ายเครือญาติ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวัสดุศาสตร์ ภาควิชาวัสดุศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



**SYNTHESIS OF CATIONIC HYPERBRANCHED POLYAMIDOAMINE
DENDRIMER AND COMPARISON OF ITS ANTIMICROBIAL
ACTIVITY WITH CHITOSAN**

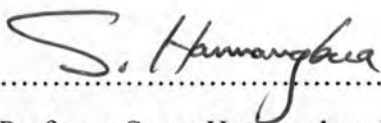
Miss Benjamas Klaykruayat

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Materials Science
Department of Materials Science
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic year 2009
Copyright of Chulalongkorn University**


522161

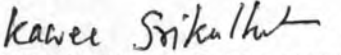
Thesis Title SYNTHESIS OF CATIONIC HYPERBRANCHED
POLYAMIDOAMINE DENDRIMER AND COMPARISON
OF ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY WITH CHITOSAN
By Miss Benjamas Klaykruayat
Field of Study Materials Science
Thesis Advisor Associate Professor Kawee Srikulkit, Ph.D.
Thesis Co-Advisor Krisana Siraleartmukul, Ph.D.


Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial
Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

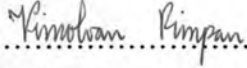
.....Dean of the Faculty of Science
(Professor Supot Hannongbua, Dr.rer.nat.)


THESIS COMMITTEE


.....Chairman
(Assistant Professor Sirithan Jiemsirilers, Ph.D.)

.....Advisor
(Associate Professor Kawee Srikulkit, Ph.D.)

.....Co-Advisor
(Krisana Siraleartmukul, Ph.D.)

.....Examiner
(Associate Professor Vimolvan Pimpan, Ph.D.)

.....Examiner
(Assistant Professor Siriwan Kittinaovarat, Ph.D.)

.....External Examiner
(Nattaya Punrattanasin, Ph.D.)

เบญจมาศ คล้ายเครือญาติ : การสังเคราะห์แคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์พอลิแอมิโดแอมินเดนไดรเมอร์และการเปรียบเทียบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กับไคโตซาน. (SYNTHESIS OF CATIONIC HYPERBRANCHED POLYAMIDOAMINE DENDRIMER AND COMPARISON OF ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY WITH CHITOSAN)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.ภาวิ ศรีกุลกิจ, อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ดร. กฤษณา ศิริเลิศมุกด, 105 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้สังเคราะห์แคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินที่มีปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ และใช้ในการดัดแปรไคโตซาน ไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาต่อเนื่องแบบซ้ำ ของปฏิกิริยาการรวมตัวแบบไมเคิลและปฏิกิริยาแอมิเดชันจนได้ไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินที่มีปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ แล้วจึงนำไปทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันกับไดเมทิลซัลเฟต โครงสร้างของไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินและแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินตรวจสอบด้วยเทคนิคฟูเรียร์-ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี การดัดแปรไคโตซานด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินเกิดขึ้นจากการทำปฏิกิริยาระหว่างหมู่เมทิลเอสเทอร์ที่ปลายของพอลิแอมิโดแอมิน กับหมู่แอมินของไคโตซาน ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน จากปฏิกิริยานี้จะทำให้เกิดพันธะแอมไนด์ซึ่งยืนยันด้วยเทคนิคฟูเรียร์-ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินในปริมาณที่มากเกินไปจะสามารถละลายน้ำได้ในสภาวะที่เป็นกลาง การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก และเอกซเรย์ดิฟแฟรคชันแสดงให้เห็นว่าไคโตซานดัดแปรมีหมู่ที่มีความเกาะก่ตออยู่กับสายโซ่โมเลกุลไคโตซาน นอกจากนี้ยังพบว่าฟิล์มไคโตซานและไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมาก อย่างไรก็ตามผ้าฝ้ายที่ผ่านการเคลือบด้วยไคโตซาน และผ้าที่ผ่านการดีพอลิเมอร์ไรซ์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่าผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินและผ้าฝ้ายตกแต่งด้วยไคโตซานร่วมกับแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมินมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีขึ้นเนื่องมาจากผลของประจุบวกของแคตไอออนิกไฮเพอร์บริรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมิน

ภาควิชา วัสดุศาสตร์

สาขาวิชา วัสดุศาสตร์

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนิสิต เมกขมาล คล้ายเครือญาติ

ลายมือชื่อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก Mr. ภาวิ

ลายมือชื่อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม P. Siril.

4773858023 : MAJOR MATERIALS SCIENCE

KEYWORDS : POLYAMIDOAMINE / ANTIMICROBIAL / CHITOSAN

BENJAMAS KLAYKRUYAT : SYNTHESIS OF CATIONIC

HYPERBRANCHED POLYAMIDOAMINE DENDRIMER AND

COMPARISON OF ITS ANTIMICROBIALACTIVITY WITH

CHITOSAN. THESIS ADVISOR : ASSOCIATE PROFESSOR KAWEE

SRIKULKIT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR KRISANA

SIRALEARTMUKUL, Ph.D., 105 pp.

The cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (PAMAM) containing terminal methyl ester end groups was synthesized and employed for modifying bulk chitosan. This modifying agent was synthesized using the repetitive reactions between Michael addition and amidation to obtain the methyl ester group terminated hyperbranched PAMAM and then followed by the methylation of methyl ester terminated hyperbranched dendritic PAMAM (PAMAM-ester) with dimethyl sulphate. Hyperbranched dendritic PAMAM and cationic hyperbranched dendritic PAMAM were characterized by FTIR and ¹H NMR analysis to confirm these structures. The modification of chitosan with cationic hyperbranched PAMAM-ester was carried-out through the reaction of the polyamidoamine methyl ester end group and the chitosan amine group at room temperature for 5 days. The amide linkage was formed and evidenced by FTIR analysis. Chitosan modified with excess amount of cationic hyperbranched PAMAM-ester was water soluble at neutral pH. TGA and XRD analyses provided evidence that the cationic hyperbranched PAMAM-chitosan containing a bulky side group exhibited enhanced chain mobility, resulting in increasing water solubility. Pure chitosan and cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan films showed excellent antimicrobial activity. However, coating of bulk chitosan and in-situ depolymerization of coated chitosan show that chitosan-fabrics showed negative antimicrobial result. On other hand, cotton fabrics treated with cationic hyperbranched dendritic PAMAM have good ability to inhibit the microbial growth. Combined treatment of cotton fabric with chitosan and cationic hyperbranched dendritic PAMAM indicates that cationic hyperbranched dendritic PAMAM moiety played a synergistic effect on antimicrobial activity due to its cationic characteristic.

Department : Materials Science

Student's Signature Benjamas Klaykruyat

Field of Study : Materials Science

Advisor's Signature Kawee Srikulkit

Academic Year : 2009

Co-Advisor's Signature R. Siril

ACKNOWLEDGEMENTS

This dissertation and all of work is dedicated to the people who have helped and supported me throughout my study. Without any of them, this work could not be completed.

I would first like to express the deepest appreciation to my advisor (Associate Professor Dr. Kawee Srikulkit) and co-advisor (Dr. Krisana Siraleartmukul), not only for their persistent support and valuable advice throughout my study, but also for their precious experience which is taught me how to think and how to work. Without them, this research could not be possible.

I would also like to acknowledge the thesis committee: Assistant Professor Dr. Sirithan Jiemsirilers, Associate Professor Dr. Vimolvan Pimpan, Assistant Professor Dr. Siriwan Kittinaovarat, and Dr. Nattaya Punrattanasin for their valuable suggestions and useful comments.

I am grateful to The 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) for financial support. I also greatly appreciate the scholarship from the office of the higher education commission and Thammasat University for providing the financial support during my study.

I am deeply indebted to all lecturers and staffs at Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University. Special thanks to Assistant Professor Dr. Thongdee Leksopi, my coworkers and staffs at Department of Textile Science and Technology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University.

I wish to thank my kind brothers, Dr. Phirat Punyacharoennon and Mr. Nirut Jaruraksakul for their support and valuable suggestions.

Finally, I would like to extend special appreciation to my dearest family (my grandmother, my parents and my sister) for their endless support, care and love throughout my life. Thanks also to my friends (Dr. Ohm, Poo, Vaew, Pui, Auang, Birth, Bo, Chi, Ohm, Mew, Peut, Aeh, Note) for their encouragement and unforgettable friendship.

CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI	iv
ABSTRACT IN ENGLISH	v
ACKNOWLEDGEMENTS	vi
CONTENTS	vii
LIST OF TABLES	xi
LIST OF FIGURES	xii
CHAPTER I INTRODUCTION	1
CHAPTER II THEORY AND LITERATURE REVIEW	3
2.1 Antimicrobial finishes.....	3
2.1.1 Field of application.....	4
2.1.2 Requirements for antimicrobial finishing.....	7
2.1.3 Modes of antimicrobial action.....	7
2.1.4 Antimicrobial finishing methodologies.....	10
2.1.5 Test methods and assessment.....	11
2.1.5.1 Agar plate method.....	12
2.1.5.2 Soil burial test.....	13
2.1.5.3 Saturated atmosphere test.....	14
2.1.5.4 Count test (bacterial challenge).....	14
2.1.6 Antimicrobial agents for textiles.....	16
2.1.6.1 Metals and metal salts.....	16
2.1.6.2 Quaternary ammonium compounds.....	17
2.1.6.3 PHMB.....	17
2.1.6.4 Triclosan.....	18
2.1.6.5 Dyes.....	19
2.2 Dendritic polymer.....	20
2.2.1 Synthesis of dendritic architecture.....	20
2.2.2 Polyamidoamine dendrimers (PAMAM).....	22
2.2.3 Antimicrobial dendrimer researches.....	24

	Page
2.3 Chitosan.....	24
2.3.1 Antimicrobial activity of chitosan.....	26
2.3.2 Chitosan as antimicrobial agent in textile.....	28
CHAPTER III EXPERIMENTAL SECTION.....	30
3.1 Materials.....	30
3.2 Instruments.....	30
PART A: SYNTHESIS OF CATIONIC HYPERBRANCHED DENDRITIC POLYAMIDOAMINE.....	31
3.3 Synthesis of hyperbranched dendritic polyamidoamine.....	31
3.4 Methylation of methyl ester terminated hyperbranched dendritic polyamidoamine (PAMAM-ester).....	31
3.5 Characterizations of cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine.....	32
3.5.1 FTIR analysis.....	32
3.5.2 ¹ H NMR analysis.....	32
PART B: MODIFICATION OF CHITOSAN WITH CATIONIC HYPERBRANCHED DENDRITIC POLYAMIDOAMINE.....	32
3.6 Modification of chitosan with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine-ester.....	32
3.7 Chitosan and cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan film preparation.....	33
3.8 Characterizations of cationic hyperbranched dendritic PAMAM- chitosan.....	33
3.8.1 FTIR analysis.....	33
3.8.2 ¹ H NMR analysis.....	33
3.8.3 Elemental analysis.....	34
3.8.4 SEM analysis.....	34
3.8.5 TGA analysis.....	34
3.8.6 X-ray diffraction (XRD) analysis.....	34
3.9 Antimicrobial activity of cationic hyperbranched dendritic PAMAM- chitosan.....	35

	Page
PART C: FABRIC TREATMENT	35
3.10 Coating of bulk chitosan and in-situ depolymerization of coated chitosan.....	35
3.10.1 Treatment of chitosan on cotton fabric.....	35
3.10.2 In-situ depolymerization of coated chitosan.....	37
3.10.3 Washing durability.....	38
3.10.4 Antimicrobial activity.....	39
3.10.5 SEM analysis.....	39
3.10.6 Nitrogen content.....	39
3.11 Treatment of cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine.....	40
3.11.1 Antimicrobial activity.....	40
3.12 Combined treatment of cotton fabric with chitosan and cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine	40
3.12.1 Antimicrobial activity.....	41
3.12.2 FTIR Analysis.....	41
3.12.3 SEM Analysis.....	41
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION	42
PART A: SYNTHESIS OF CATIONIC HYPERBRANCHED DENDRITIC POLYAMIDOAMINE	42
4.1 Synthesis of hyperbranched dendritic polyamidoamine.....	42
4.1.1 FTIR analysis.....	43
4.1.2 ¹ H NMR analysis.....	44
4.2 Synthesis of cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine.....	46
4.2.1 FTIR analysis.....	49
4.2.2 ¹ H NMR analysis.....	50
PART B: MODIFICATION OF CHITOSAN WITH CATIONIC HYPERBRANCHED DENDRITIC POLYAMIDOAMINE	51
4.3 Modification of chitosan with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine-ester.....	51
4.3.1 FTIR analysis.....	51
4.3.2 ¹ H NMR analysis.....	53

	Page
4.3.3 Elemental analysis.....	55
4.3.4 SEM analysis.....	56
4.3.5 TGA analysis of cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan.....	57
4.3.6 X-ray diffraction (XRD).....	59
4.3.7 Antimicrobial activity.....	60
PART C: FABRIC TREATMENT.....	63
4.4 Coating of bulk chitosan and in-situ depolymerization of coated chitosan.....	63
4.4.1 Antimicrobial activity.....	63
4.4.2 SEM analysis.....	64
4.4.3 Nitrogen content.....	66
4.5 Treatment of cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine.....	67
4.6 Combined treatment of cotton fabric with chitosan and cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine	73
4.6.1 Antimicrobial activity.....	73
4.6.2 FTIR Analysis.....	77
4.6.3 SEM Analysis.....	78
CHAPTER V CONCLUSIONS.....	80
REFERENCES.....	82
APPENDIX.....	89
BIOGRAPHY.....	105

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Terms associated with the field of biocides.....	5
2.2	Examples of uses of anti-microbial finishes.....	6
2.3	Increase of PAMAM parameters with the number of generations.....	23
2.4	MIC of Native Chitosan against fungi.....	27
2.5	MIC of Native Chitosan against bacteria.....	27
4.1	Hydrogen (H), carbon (C), and nitrogen (N) percentages (%).....	55
4.2	Antimicrobial activity of chitosan and cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan film.....	61
4.3	Antimicrobial activity of chitosan coated cotton fabrics, depolymerized fabrics and washed fabrics (2 and 5 cycles).....	64
4.4	Nitrogen content of uncoated fabric, chitosan treated fabric and sodium nitrite treated chitosan fabric	69
4.5	Antimicrobial activity of cotton fabric treated with cationic hyperbranched dendritic PAMAM	70
4.6	Antimicrobial activity of cotton fabric treated with chitosan and cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (combined treatment).....	73

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Degradation process (cotton).....	8
2.2	Graph to show possible results of count tests to measure the effectiveness of antibacterial agents.....	15
2.3	Structure of 3-(trihydroxysilyl) propyldimethyloctadecyl ammonium chloride.....	17
2.4	Structure of polyhexamethylene biguanide (PHMB).....	18
2.5	Structure of triclosan.....	19
2.6	Four major classes of macromolecular architecture (I) linear, (II) cross-linked (bridged) and (III) branched. Structure controlled polymers (IV) dendritic.....	20
2.7	Two principle synthetic methods for constructing dendritic macromolecules (dendrons).....	22
2.8	Synthesis of PAMAM dendrimers	23
2.9	Schematic representation of the chitin and chitosan depicting the co-polymer character of the biopolymers.....	25
2.10	Preparation of chitosan from chitin.....	26
3.1	Labtec laboratory exhausted dyeing machine.....	36
3.2	Rapid stenter oven.....	36
3.3	Labtec laboratory exhausted dyeing machine.....	37
3.4	Gyrowash washing machine.....	38
4.1	Theoretical synthesis of hyperbranched dendritic polyamidoamine...	42
4.2	FTIR spectra of G-0.5 hyperbranched polyamidoamine (a), G0.0 hyperbranched polyamidoamine (b) and G0.5 hyperbranched polyamidoamine (c).....	43
4.3	¹ H NMR spectra of G-0.5 hyperbranched PAMAM (a) and G0.0 hyperbranched PAMAM (b).....	45
4.4	Methylation of methyl ester terminated hyperbranched dendritic PAMAM (PAMAM-ester, G-0.5) with dimethyl sulphate.....	46
4.5	Structures of cationic hyperbranched PAMAM.....	48

Figure		Page
4.6	FTIR spectra of hyperbranched PAMAM (a) and cationic hyperbranched PAMAM-ester (b).....	49
4.7	¹ H NMR spectrum of cationic hyperbranched PAMAM-ester.....	50
4.8	FTIR spectra of chitosan (a) and 50 wt% and excessive cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan (b and c, respectively)...	52
4.9	Putative structure of cationic hyperbranched PAMAM-chitosan.....	53
4.10	¹ H NMR spectra of chitosan (a) and cationic hyperbranched PAMAM-chitosan (b).....	54
4.11	Partially hydrolysed product occurring during methylation step.....	55
4.12	SEM photographs of chitosan (a), cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan film (10 wt% PAMAM-CTS (b), 50 wt% PAMAM-CTS (c), 100 wt% PAMAM-CTS (d) and 200 wt% PAMAM-CTS (e).....	56
4.13	TGA thermograms of chitosan (a), cationic hyperbranched PAMAM (b) and cationic hyperbranched PAMAM-chitosan (c).....	59
4.14	XRD diffractograms of chitosan and cationic hyperbranched PAMAM-chitosan films.....	60
4.15	Number of bacteria from the blank, CTS, 50 wt% PAMAM-CTS and 100 wt% PAMAM-CTS at 24 hrs. incubation with <i>Staphylococcus aureus</i>	61
4.16	Photographs of cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan products (10 wt% PAMAM-CTS (a) 50 wt% PAMAM-CTS (b) 100 wt% PAMAM-CTS (c) and 200 wt% PAMAM-CTS (d) respectively) after leaving in open air for 7 days.....	63
4.17	Number of bacteria from blank and treated fabric samples at “0” hrs. on <i>Staphylococcus aureus</i> , incubated at 37°C for 24 hrs.....	65
4.18	Number of bacteria from blank and treated fabric samples at “24” hrs. on <i>Staphylococcus aureus</i> , incubated at 37°C for 24 hrs...	66
4.19	SEM photographs of untreated cotton fabric.....	67
4.20	SEM photographs of chitosan treated cotton fabrics.....	67
4.21	SEM photographs of depolymerized chitosan cotton fabric.....	68

Figure		Page
4.22	Number of bacteria from treated fabric samples at “0” hrs. on <i>Staphylococcus aureus</i> , incubated at 37°C for 24 hrs.....	71
4.23	Number of bacteria from treated fabric samples at “24” hrs. on <i>Staphylococcus aureus</i> , incubated at 37°C for 24 hrs.....	72
4.24	Number of bacteria from treated fabric samples at “0” hrs. on <i>Staphylococcus aureus</i> , incubated at 37°C for 24 hrs.....	75
4.25	Number of bacteria from treated fabric samples at “24” hrs. on <i>Staphylococcus aureus</i> , incubated at 37°C for 24 hrs.....	76
4.26	FTIR spectra of cotton fabric treated with G2.5 cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (a) and cotton fabric treated with chitosan and G2.5 cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (b).....	78
4.27	SEM photographs of untreated cotton fabric (top) and cotton fabrics treated with chitosan combined with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (bottom).....	79