



## รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียมวัสดุนาโนที่มีเดนไดรเมอร์เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน  
และการประยุกต์กับสิ่งทอ

# รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเตรียมวัสดุนาโนที่มีเดนไดรเมอร์เป็นองค์ประกอบพื้นฐาน  
และการประยุกต์กับสิ่งทอ

รศ. ดร. กาวี ศรีกุลกิจ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ) และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ที่สนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณ ดร. ไพรัตน์ ปุญญาเจริญนนท์ และ ดร. เบญจมาศ คล้ายเครือญาติ นิสิตปริญญาเอกในขณะนั้นในฐานะนักวิจัยผู้ช่วยโครงการที่มีส่วนสำคัญทำให้โครงการสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบคุณภาควิชาวัสดุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับใช้เป็นสถานที่ในการดำเนินการของโครงการนี้

## บทคัดย่อ

โครงการนี้แบ่งออกเป็น 2 เรื่องย่อยประกอบด้วย กราฟต์เดนไดรเมอร์ลงบนอนุภาคนาโนซิลิกา และประยุกต์บนผ้าฝ้าย และการเตรียมโคโตซานดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีน

โครงการการกราฟต์เดนไดรเมอร์ลงบนอนุภาคนาโนซิลิกาและประยุกต์บนผ้าฝ้าย เริ่มต้นด้วยการกราฟต์ไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนลงบนผิวของซิลิกาชนิดความละเอียดสูง ตามด้วยการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันที่ปลายสายโซ่โมเลกุลให้เป็นหมู่กรดฟอสฟอนิกโดยปฏิกิริยาแบบแมนนิช เพื่อเปลี่ยนเป็นฟอสฟอริเลตไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนกราฟต์ซิลิกา จากนั้นนำไปตกแต่งลงบนผ้าฝ้ายเพื่อผลิตผ้าทอไฟฟ้า ผลที่ได้คือผ้าที่ผ่านการตกแต่งมีความสามารถในการชะลอการลุกลามของไฟได้ ภายหลังจากการซักพบว่าฟอสฟอริเลตไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนกราฟต์ซิลิกามีความคงทนต่อการซักดีกว่าฟอสฟอริเลตไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีน นอกจากนี้พบว่าความคงทนต่อแรงดันทะลุของผ้าที่ตกแต่งด้วยฟอสฟอริเลตไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนพอลิเมอร์มีค่าต่ำกว่าซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากมีปริมาณหมู่กรดฟอสฟอนิกมากกว่า ความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นจะช่วยเร่งการการสลายตัวของผ้าฝ้ายเนื่องจากความร้อน

โครงการการสังเคราะห์แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนที่มีปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ และใช้ในการดัดแปรโคโตซาน โคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณที่มากเกินไปจะสามารถละลายน้ำได้ และโคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีมากเมื่อเทียบกับโคโตซานปกติ เมื่อนำไปเคลือบบนผ้าฝ้ายพบว่าผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนบรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ S. Aureus ได้ดีมาก

**คำสำคัญ** ไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีน ฟอสฟอริเลตไฮเพอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนกราฟต์ซิลิกา ผ้าทอไฟฟ้า แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีน โคโตซาน และ สมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

## Abstract

This project contained two research works as follows:

The first project was about the grafting of hyperbranched polyamidoamine (PAMAM) polymer onto ultrafine silica followed by functionalization via the introduction of phosphonic acid groups into the branch ends. Then, the phosphonylated PAMAM grafted silica was applied onto cotton fabric to produce fire retardant phosphonated cellulose. After washing test, the phosphorylated hyperbranched PAMAM grafted silica showed better retention of fire retardancy than phosphorylated hyperbranched PAMAM polymer, indicating its wash-off resistancy performance. In addition, the bursting strength of phosphorylated hyperbranched PAMAM polymers finished cotton was worst than phosphorylated hyperbranched PAMAM grafted silica finished cotton. This might be due to the effect of more phosphonic acid groups content of phosphorylated hyperbranched PAMAM polymers. As a result, its higher acidity accelerated the thermal degradation of cotton fabric during fixation of phosphorylated hyperbranched PAMAM polymers.

The second project was concerned with the synthesis of cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (PAMAM) containing terminal methyl ester end group for modifying flake chitosan. The cationic hyperbranched PAMAM-chitosan was applied onto cotton fabric at 1 wt% add-on using a padding method and was found to have a good antimicrobial performance against *S. aureus* compared to that obtained with unmodified chitosan.

**Keywords :** Hyperbranched Polyamidoamine , Phosphonylated PAMAM Grafted Silica , Fire Retardant Fabric, Cationic Hyperbranched Dendritic Polyamidoamine , Chitosan and Antimicrobial Activity

## บทนำ

ในปัจจุบันคำว่านาโนเทคโนโลยีคงเป็นที่คุ้นหูของหลายๆคน กระแสความสนใจในเทคโนโลยีนี้คงเนื่องมาจากการนำเสนอจุดขายที่แสดงให้เห็นว่านาโนเทคโนโลยีสามารถสร้างสิ่งที่เพื่อฝันให้เป็นจริงเหมือนในหนังฮอลลีวูด ยกตัวอย่างเช่น โดยอาศัยนาโนเทคโนโลยีมนุษย์สามารถสร้างหุ่นยนต์จิ๋วที่มีขนาดเท่าเม็ดเลือดแดงหรือเล็กกว่า ยกตัวอย่างเช่น extracellular materials ซึ่งเป็นโปรตีนนาโนไฟเบอร์มีแกนกลางคือ hydrophobic core ผิวชั้นนอกเป็นสายไซโปรตีน รูปทรงของนาโนไฟเบอร์ที่ได้มีลักษณะเหมือนฝักข้าวโพด สมบัติพิเศษของมันคือ มันสามารถไปจับกับดีเอ็นเอได้แบบเฉพาะเจาะจง และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการซ่อมแซมเซลล์ที่ตายแล้วกลับฟื้นขึ้นมา ซึ่งความน่าทึ่งของนาโนไฟเบอร์ตัวนี้เมื่อนำให้กับหนูที่เป็นอัมพฤกษ์ภายใน 60 วัน หนูสามารถกลับมาเดินได้ นอกจากนี้เอื้อประโยชน์แก่วิทยาการทางด้านแพทยศาสตร์ นาโนเทคโนโลยียังก่อให้เกิดความเจริญก้าวหน้าในอีกหลายๆศาสตร์เช่น วัสดุศาสตร์ อิเลคทรอนิกส์ และ ไบโอเทคโนโลยี เช่นในปัจจุบันนาโนเทคโนโลยีก็ได้เข้าไปมีบทบาทแล้วไม่ว่าวันแม้แต่วัสดุสิ่งทอเอง ซึ่งก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีสมบัติโดดเด่นเมื่อเทียบกับการใช้เทคโนโลยีที่มีอยู่ในปัจจุบัน ปัญหาที่ทำนายของการใช้ประโยชน์ของอนุภาคนาโนคือปัญหาการเกาะกลุ่มกันของอนุภาค (agglomerate) การบังคับให้อนุภาคนาโนให้อยู่อย่างอิสระไม่ให้อาเกาะกลุ่มกันจึงต้องอาศัยเทคโนโลยีการจัดการที่เหมาะสม เช่นการห่อหุ้มด้วยพอลิเมอร์ (วัสดุอินทรีย์) ซึ่งนอกจากช่วยป้องกันไม่ให้อนุภาครวมตัวกันแล้ววัสดุที่ห่อหุ้มยังสามารถยึดเกาะกับผิวสิ่งทอได้ดีอีกด้วย วัสดุห่อหุ้มที่น่าสนใจและแสดงสมบัติของนาโนพอลิเมอร์ได้ตัวคือ เดนไดรเมอร์ (dendrimers) พอลิเมอร์ชนิดนี้มีหมู่ฟังก์ชันจำนวนมากและสามารถกราฟต์ลงบนอนุภาคนาโนอื่นๆ เช่น ซิลิกา หรือ ซิงค์ออกไซด์ ทำให้ได้สมบัติผสมระหว่างวัสดุอินทรีย์และวัสดุนินทรีย์อยู่ในวัสดุนาโนตัวเดียวกัน เช่นซิลิกาช่วยเพิ่มสมบัติความขรุขระในระดับนาโนบนพื้นผิว ช่วยเสริมความสามารถในการหน่วงไฟในวัสดุสิ่งทอ ซิงค์ออกไซด์มีสมบัติกระเจิงรังสียูวี ช่วยปกป้องรังสียูวีในการทำลายผิวหนัง หรือทำลายสืบนวัสดุสิ่งทอ ในขณะที่เดนไดรเมอร์ที่กราฟต์ติดกับอนุภาคเหล่านี้ยังทำหน้าที่ได้หลายอย่างขึ้นอยู่กับการปรับเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของเดนไดรเมอร์ ในขณะเดียวกันยังทำหน้าที่ช่วยในการทำให้อนุภาคนินทรีย์เกาะติดกับวัสดุสิ่งทอได้ด้วย ดังนั้นจึงคาดว่าจะทำให้สามารถพัฒนาวัสดุชนิดใหม่ๆมาใช้กับผลิตภัณฑ์สิ่งทอของไทยต่อไป

จากที่กล่าวมาข้างต้น ผู้วิจัยสนใจการพัฒนาวัสดุนาโนที่มีเดนไดรเมอร์เป็นองค์ประกอบหลัก จึงขอลำถึงรายละเอียดของพอลิเมอร์ตัวนี้ เดนไดรเมอร์เป็นนาโนพอลิเมอร์เตรียมได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยวิธีการควบคุมวิธีการสังเคราะห์แบบขั้นตอนและซ้ำแล้วซ้ำอีก

(repetitive multistep synthesis) โดยเริ่มต้นจากโมเลกุลแกนกลาง (core molecule) แล้วแตกกิ่งก้าน(branch) ออกไปอย่างมีสมมาตร เทคโนโลยีการสังเคราะห์โมเลกุลแบบนี้จะทำให้สามารถควบคุมการเติบโตของขนาดอนุภาคนาโนพอลิเมอร์ได้ทีละนาโนเมตร ทั้งขนาด และรูปร่างก็จะสามารถควบคุมได้ตามต้องการ ซึ่งโดยปกติจะอยู่ในช่วง 1-10 นาโนเมตร นาโนพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้เรียกว่า dendrimers และ hyperbranched polymer ในปัจจุบันได้มีผู้ศึกษาประโยชน์ของนาโนพอลิเมอร์ในกลุ่มนี้อย่างกว้างขวาง ซึ่งยืนยันได้จากมีบทความวิจัยเกี่ยวกับเรื่องนี้ประมาณ 5000 กว่าบทความ และมีผลิตภัณฑ์นาโนในกลุ่มนี้ออกมาในเชิงพาณิชย์แล้ว ตัวที่โดดเด่นที่สุดจะอยู่ในผลิตภัณฑ์กลุ่มเวชภัณฑ์

จุดเด่นของ dendrimers คือ ที่ผิวรอบนอก(periphery) ของมันคือหมู่ทำปฏิกิริยา (reactive sites) ดังนั้นทำให้เราสามารถดัดแปลงปลายกิ่งของ dendrimers ให้สามารถทำหน้าที่เป็นอะไรได้ตามต้องการ เช่นทำให้ผิวของวัสดุตัวนี้เป็นประจุบวก (cationic dendrimers) หรือประจุลบ (anionic dendrimers) จึงสามารถทำให้เป็นวัสดุที่มีประจุที่พื้นผิวอย่างมหาศาล ทำให้วัสดุตัวนี้มีความสามารถในการเกาะยึดติดกับวัสดุตัวอื่นได้เป็นอย่างดีและยังสามารถกราฟต์เดนไดรเมอร์ลงบนอนุภาคนาโนอินทรีย์ หรือ ซิงค์ออกไซด์ได้ ทำให้สามารถเตรียมวัสดุนาโนคอมพอสิตที่แสดงสมบัติหลากหลาย ซึ่งผู้วิจัยมีความคิดที่พัฒนานวัตกรรมของเทคโนโลยีการสังเคราะห์ dendrimers ลงบนอนุภาคนาโนชนิดต่าง ๆ เพื่อผลิตวัสดุนาโนคอมพอสิตที่ใช้สำหรับกระบวนการผลิตสิ่งทอเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี อันจะเป็นการนำไปสู่การพัฒนาอุตสาหกรรมสิ่งทอของไทยให้สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้

## วิธีการทดลอง

### โครงการ 1

การสังเคราะห์และเติมหมู่ฟังก์ชันของอนุภาคนาโนพอลิเมอร์ของพอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์

#### 1. แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

เดนไดรติกพอลิเมอร์ (dendritic polymer) เป็นพอลิเมอร์ที่ค้นพบล่าสุด มีโครงสร้างแตกต่างจากพอลิเมอร์แบบโซ่ตรง (linear) แบบกิ่ง (branched) และแบบโครงร่างตาข่าย (crosslinked) ในกลุ่มของเดนไดรติกพอลิเมอร์ยังสามารถแบ่งกลุ่มย่อยได้อีก 4 กลุ่มคือ random hyperbranched, dendrigrafted, dendrons และ dendrimers

ลักษณะเด่นอันเป็นเอกลักษณ์ของเดนไดรเมอร์ (dendrimer) คือเป็นพอลิเมอร์ที่มีลักษณะเป็นทรงกลม ที่มีโครงสร้างแบบ core-shell ที่มีความสมมาตร มีค่าการกระจายน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ( $M_w/M_n = 1.00-1.05$ ) และมีขนาดอนุภาคอยู่ในระดับนาโนเมตร และที่สำคัญบริเวณผิวของอนุภาคเดนไดรเมอร์หมู่เคมีจำนวนมาก จำนวนหมู่เคมีที่ผิวจะขึ้นอยู่กักระดับเจนเนอเรชัน (generation) เมื่อระดับเจนเนอเรชันสูงขึ้น จำนวนหมู่เคมีที่ผิวจะเพิ่มขึ้นทวีคูณ ซึ่งหมู่เคมีดังกล่าวนี้สามารถถูกทำดัดแปรได้หลากหลาย ทำให้เดนไดรเมอร์ถูกนำไปใช้งานได้หลายรูปแบบ

พอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ (polyamidoamine dendrimer หรือ PAMAM) เป็นเดนไดรเมอร์ตัวแรกที่มีการผลิตทางการค้า ซึ่งเตรียมได้จากวิธีการสังเคราะห์แบบไดเวอร์เจนต์ (divergent method) โดยการใช้เอทิลีนไดอะมีนเป็นแกนกลาง (core) ทำการสังเคราะห์โดยการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง 2 กระบวนการคือ

- ปฏิกิริยาการรวมตัวแบบไมเคิล (Michael addition) ของเมทิลอะคริเลต (methyl acrylate (MA) กับหมู่เอมีนอิสระ (free amine group)
- และปฏิกิริยาอะมิเดชัน (amidation) ของหมู่เอสเทอร์กับเอทิลีนไดอะมีน (ethylenediamine (EDA)

นอกจากการใช้งานในรูปของพอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ บริสุทธิ์แล้ว ยังมีการวิจัยศึกษาการทำกราฟท์ (grafting) ของพอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ ลงบนผิวของวัสดุอื่น เช่น ซิลิกา (silica) และเขม่าดำ (carbon black) เพื่อนำไปใช้เป็นสารตัวเติมและฟิสิกเมนต์สำหรับวัสดุพอลิเมอร์ เพื่อผลิต



อนุภาคนาโนไฮบริด (hybrid nanoparticles) ที่มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดปัญหาการรวมตัวเป็นก้อนของอนุภาคอีกด้วย

งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะทำการสังเคราะห์และดัดแปรหมู่ฟังก์ชันของพอลิอะมีโดเอมีนเดนไดรเมอร์ให้ได้อนุพันธ์สารประกอบที่มีสมบัติและการนำไปใช้งานเฉพาะอย่าง เช่น สารหน่วงไฟ (flame retardant) โดยในการเตรียมอนุพันธ์ของสารที่ให้สมบัติหน่วงไฟ จะเป็นการทำปฏิกิริยาของพอลิอะมีโดเอมีนเดนไดรเมอร์เพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของ phosphorylated PAMAM โดยการเกิดปฏิกิริยากับฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) และกรดฟอสฟอรัส (Phosphorus acid) จากนั้นนำสารประกอบที่ได้ ทำการตกแต่งลงบนผ้าฝ้าย ทดสอบสมบัติของสารประกอบที่ได้

## 1.2 วิธีดำเนินการวิจัย

### 1.2.1. การสังเคราะห์ PAMAM Dendrimer

- ทำการสังเคราะห์ PAMAM Dendrimer ด้วยวิธี Divergent โดยใช้ปฏิกิริยา Michael addition และ amidation
- วิเคราะห์หมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR และ NMR spectroscopy
- วิเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในตัวอย่างด้วยเทคนิค Elemental Analysis
- วิเคราะห์น้ำหนักของตัวอย่างด้วยเทคนิค Gel Permeation Chromatography (GPC)

### 1.2.2. การเตรียม Grafted “dendrimer-like” highly branched polymer บนผิวของซิลิกา

- เตรียม Grafted silica โดยการทำปฏิกิริยาระหว่างซิลิกา กับ 3-Aminopropyltriethoxysilane
- Grafted PAMAM dendrimer บนผิวของ silane grafted silica ด้วยปฏิกิริยา Michael addition และ amidation
- วิเคราะห์ปริมาณของหมู่เอมีนด้วยเทคนิคการไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ไซต์

- วิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ grafting บนซิลิกาด้วยเทคนิค TGA
- วิเคราะห์หาหมู่ฟังก์ชันด้วยเทคนิค FTIR
- เเคราะห์องค์ประกอบของธาตุในตัวอย่างด้วยเทคนิค Elemental Analysis

#### 1.2.3. การเตรียมอนุพันธ์ของ Phosphorylated PAMAM และ Phosphorylated PAMAM

grafted silica

- จัดแปรรูเอมีนบนผิวของ PAMAM และ PAMAM grafted silica โดยการทำปฏิกิริยากับฟอร์  
มัลดีไฮด์ และกรดฟอสฟอรัส
- วิเคราะห์โครงสร้างเคมีด้วยเทคนิค FTIR และ NMR

#### 1.2.4 การตกแต่งสารดัดแปลงบนผ้าฝ้าย

#### 1.2.5 การทดสอบ

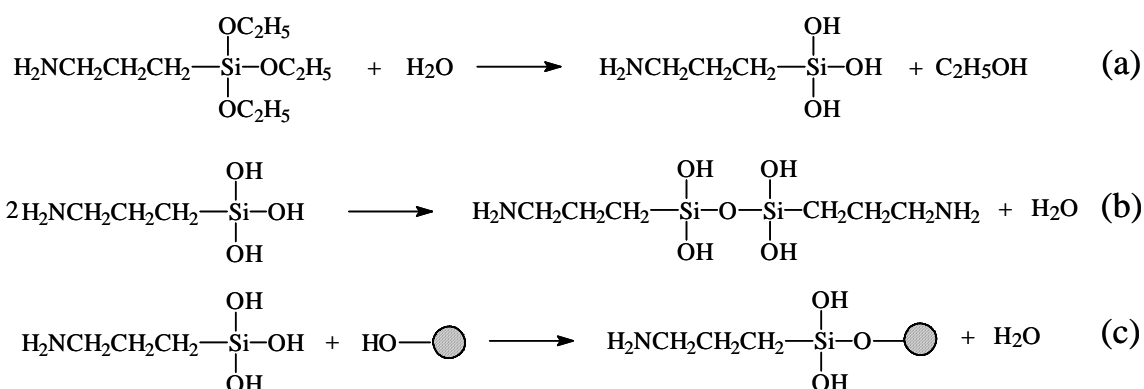
- ทดสอบความแข็งแรงของผ้า
- ตรวจสอบลักษณะพื้นผิวเส้นใยโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)
- ทดสอบสมบัติการติดไฟ

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

### 1.3 การสังเคราะห์และเติมหมู่ฟังก์ชันของอนุภาคนาโนพอลิเมอร์ของพอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์

#### 1.3.1 การเติมหมู่อะมิโนลงบนผิวของซิลิกา

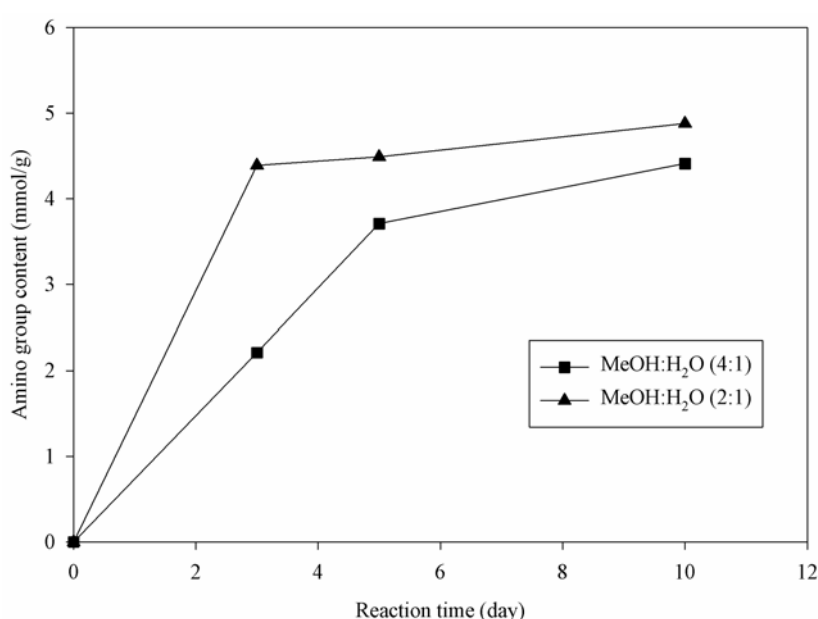
การดัดแปรหมู่ฟังก์ชันที่ผิวของอนุภาคซิลิกาทำได้โดยการใช้ปฏิกิริยาควบแน่นของหมู่ไฮดรอกซิลของซิลิกา กับ 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลน ผลของปฏิกิริยาจะทำให้เกิดหมู่อะมิโนที่ผิวของซิลิกาซึ่งจะแสดงลักษณะเป็นหมู่ฟังก์ชันเริ่มต้นที่วงไวของการกราฟต์ด้วยพอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นจะเป็นแบบการเร่งปฏิกิริยาด้วยตัวเองของหมู่เอมีนของ 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลน กลไกการเกิดไฮโดรไลซิสในน้ำของหมู่ไตรเอทอกซีจะเกิดหมู่ไฮดรอกซิลขึ้น จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาการควบแน่นระหว่างหมู่ไฮดรอกซิลของ 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลน กับหมู่ไฮดรอกซิลของซิลิกาที่ผิวดังที่แสดงในรูปที่ 1 ปฏิกิริยาการควบแน่นด้วยตัวเองของ 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลนสามารถเกิดขึ้นได้และจะให้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการในปฏิกิริยาปริมาณของน้ำในระบบจะมีผลต่อปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสของหมู่ไตรเอทอกซี และปฏิกิริยาการควบแน่นที่ผิวของซิลิกา



รูปที่ 1. Equation of hydrolysis reaction from alkoxysilanes (a) and self condensation reaction

(b) or (c) condensation reaction between APTES and silica.

อัตราการเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสและการควบแน่นสามารถควบคุมได้โดยการใช้ของผสมของน้ำและเมทานอล ในการศึกษาที่ใช้อัตราส่วนผสมของเมทานอลต่อน้ำเป็น 4:1 และ 2:1 เมื่อสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของหมู่อะมิโนบนผิวของซิลิกากับระยะเวลาในการทดลองแสดงดังรูปที่ 2 ปริมาณของหมู่อะมิโนจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของน้ำและระยะเวลาการเกิดปฏิกิริยา น้ำจะมีผลในการเปลี่ยนหมู่ไตรเอทอกซีไปเป็นหมู่ไซลานอล ดังนั้นปริมาณน้ำสามารถบอกอัตราการไฮโดรไลซิสได้ ปริมาณหมู่ไซลานอลที่เพิ่มขึ้นจะเพิ่มอัตราการควบแน่นของหมู่ไซลานอล ในงานวิจัยนี้จะใช้อัตราส่วนผสมของเมทานอลกับน้ำที่ 2:1 ใช้ระยะเวลาในการไฮโดรไลซิสซิลิกานาน 3 วัน

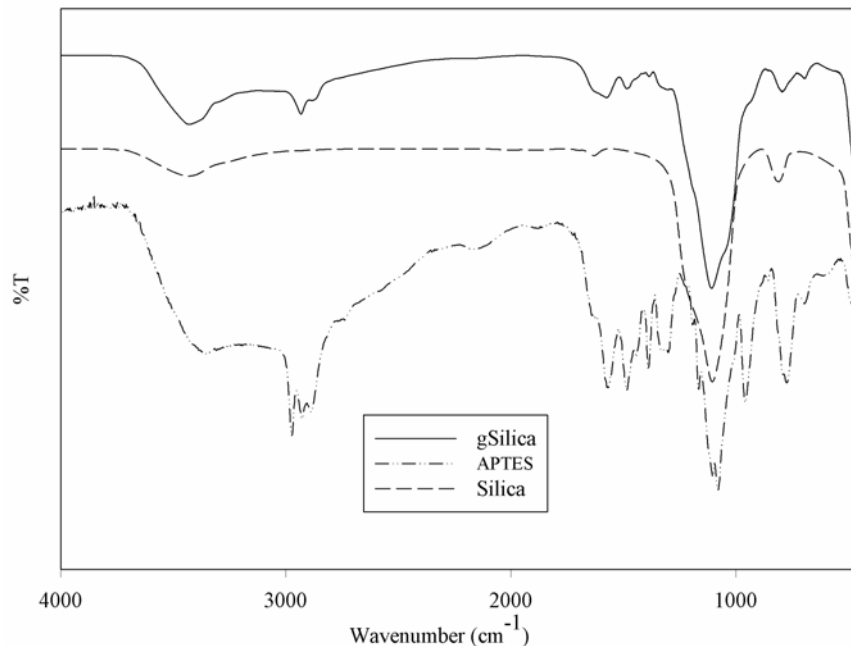


รูปที่ 2. Amino group content measured on APTES treated silica

of methanol and water versus reaction time

หลักฐานการเกิดปฏิกิริยาของ 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลนบนซิลิกายืนยันได้โดยการวิเคราะห์ด้วย FTIR ในรูปที่ 3 เป็นการเปรียบเทียบ FTIR สเปกตราระหว่างซิลิกาที่กราฟต์ด้วย 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลน ซิลิกาเริ่มต้น และ 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลน ผลที่ได้พบว่าซิลิกาที่กราฟต์ด้วย 3-อะมิโนพรอพิลไตรเอทอกซีไซเลนจะแสดงค่าความถี่ในการดูดกลืนที่ตำแหน่ง  $2932\text{ cm}^{-1}$ ,  $1640\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นตำแหน่งของ C-H stretching และหมู่เอมีนปฐมภูมิ ตามลำดับ ตำแหน่งของการดูดกลืนของซิลิกาที่ตำแหน่ง  $1630\text{ cm}^{-1}$  เลื่อนไปเป็น  $1640\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นคุณลักษณะของหมู่เอมีนแบบปฐมภูมิ และตำแหน่งการดูดกลืนใหม่ที่  $2932$  และ  $2884\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็น

ลักษณะของหมู่  $\text{CH}_2$  ที่ไม่สมมาตรและสมมาตร ในบริเวณของหมู่ไซลันอล ( $3200 - 3400 \text{ cm}^{-1}$ ) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปแบบสเปกตรัมเนื่องจากอันตรกิริยาของไฮโดรเจนที่เพิ่มขึ้นจากการดัดแปรผิวของอนุภาค

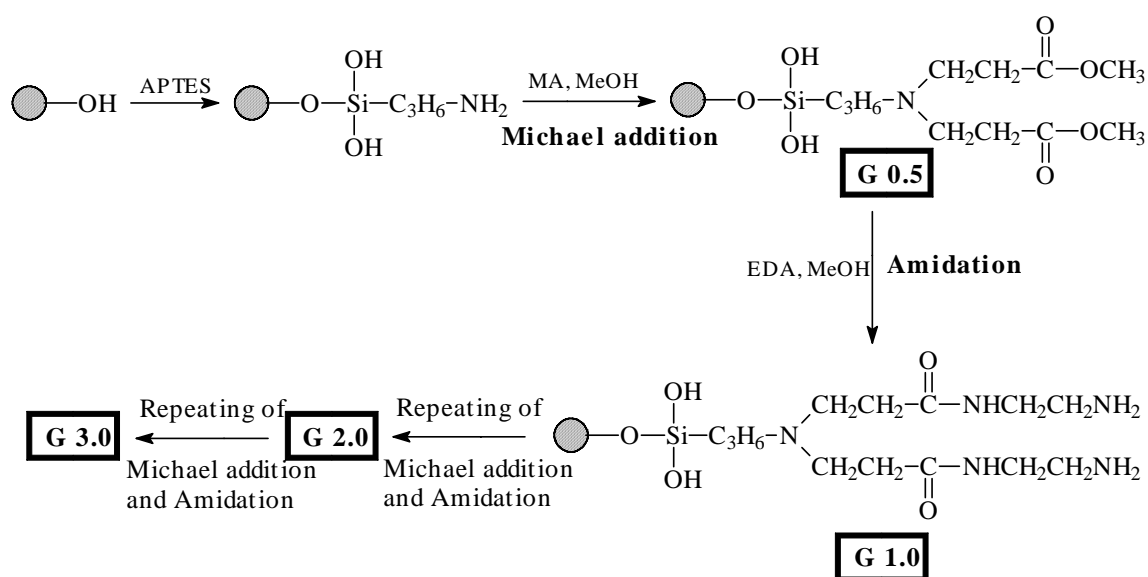


รูปที่ 3 FTIR spectra of silica, APTES and APTES grafted silica

### 1.3.2 การกราฟต์พอลิอะมิโดเอมีนจากผิวของซิลิกา

หลังจากการเติมหมู่อะมิโนชนิดปฐมภูมิลงบนผิวของซิลิกาแล้ว การกราฟต์พอลิอะมิโดเอมีนลงบนผิวของซิลิกาสามารถทำได้ด้วยขั้นตอน 2 ขั้นตอน คือ ปฏิบัติการเติมแบบไมเคิลและอะมิเดชัน เช่นเดียวกับขั้นตอนการสังเคราะห์พอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ ขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยากับเมทิลอะคริเลตและเอทิลีนไดอะมีนจะใช้เทคนิคการวิเคราะห์ด้วย FTIR เพื่อติดตามปฏิกิริยาการเติมแบบไมเคิลและปฏิกิริยาอะมิเดชัน ในขั้นตอนปฏิกิริยาการเติมแบบไมเคิล (ผลิตภัณฑ์ G0.5 G1.5 และ G2.5) หมู่เอสเทอร์ที่ปลายสายโซ่แสดงตำแหน่งการดูดกลืนที่  $1740 \text{ cm}^{-1}$  ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวจะหายไปอย่างสมบูรณ์จากสเปกตรัมในตัวอย่าง G1.0 G2.0 และ G3.0 ที่ได้จากขั้นตอนปฏิกิริยาอะมิเดชัน ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ปลายสายโซ่เป็นหมู่เอมีนที่แสดงตำแหน่งการดูดกลืนของ NH บริเวณตำแหน่ง  $3000 - 3350 \text{ cm}^{-1}$  ความเข้มของการดูดกลืนของตำแหน่งดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม

ระดับของเจนเนอเรชันซึ่งแสดงให้เห็นว่าหมู่เอมีนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มเจนเนอเรชันของพอลิอะมิโดเอมีน เมื่อพิจารณาเฉพาะของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาเจนเนอเรชัน 3.0 ตำแหน่งการดูดกลืนของสเปกตรัมที่ 1649 และ 1568  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นตำแหน่งที่แสดงคุณลักษณะของแอมได์ 1 และแอมได์ 2 และตำแหน่งการดูดกลืนที่ 3281 และ 3086  $\text{cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงคุณลักษณะของแอมได์ A และแอมได์ B ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันตำแหน่ง 2900  $\text{cm}^{-1}$  ของ CH ที่แสดงผลอย่างชัดเจนในตัวอย่างเจนเนอเรชัน G0.5 G1.5 และ G2.5 จะลดความเข้มข้นลงเนื่องจากผลของ NH ที่ล้อมรอบอยู่ ปฏิบัติการสังเคราะห์พอลิอะมิโดเอมีนลงบนผิวของซิลิกาตามหลักทฤษฎีแสดงได้ดังแผนภาพที่ 1



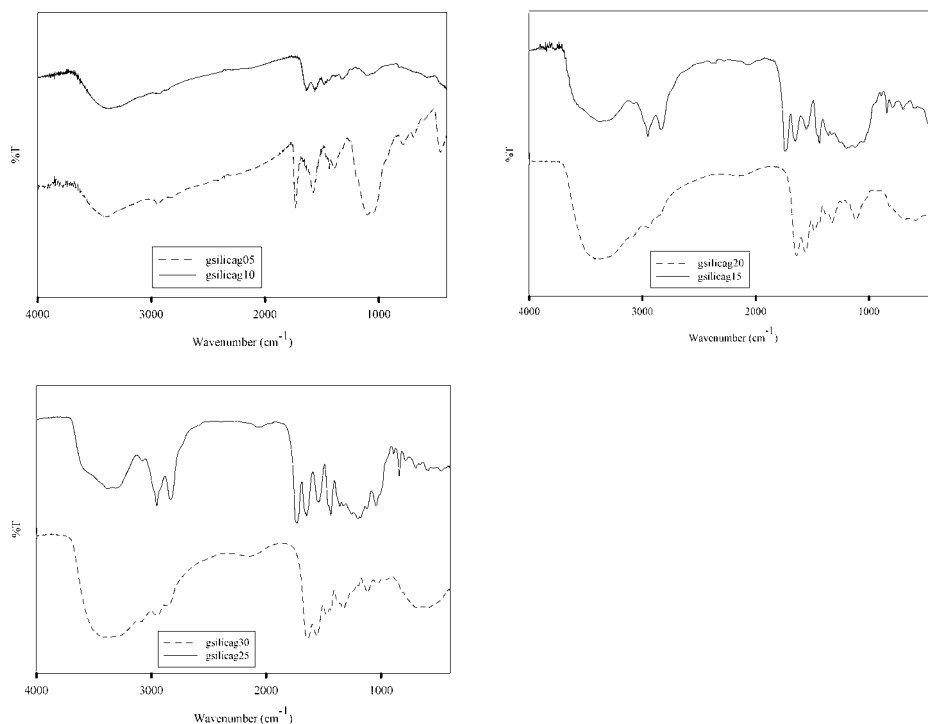
แผนภาพที่ 1 The theoretical synthesis of PAMAM grafted silica

ตารางที่ 1 Grafting percentage of PAMAM onto silica surface.

	Generation					
	0.5	1	1.5	2.0	2.5	3.0
Grafting(%)	18	18	68	962	2433	2500

TGA thermogram ของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาจากเจนเนอเรชัน G0.5 ถึง G3.0 แสดงได้ในรูปที่ 5 ในตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การกราฟต์ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของเจนเนอเรชันซึ่งแสดงให้เห็น

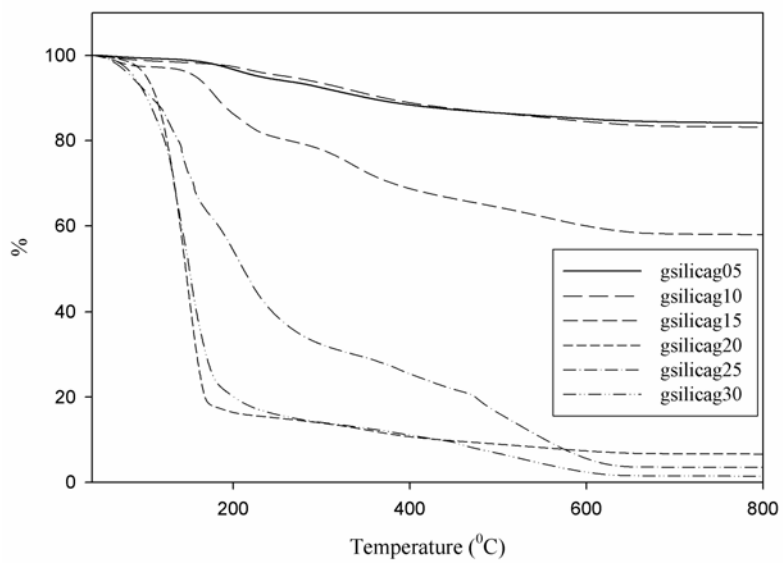
เห็นว่าพอลิอะมิโดเอมีนเกิดการแพร่ขยายจากกลุ่มเอมีนที่ผิวของซิลิกา จากผลที่ได้จะพบว่าเปอร์เซ็นต์การกราฟต์จะเพิ่มขึ้นอย่างทวีคูณซึ่งสัมพันธ์กับคุณลักษณะการสังเคราะห์พอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ ปริมาณของหมู่อะมิโนซึ่งคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การกราฟต์ ในตารางที่ 2 แสดงปริมาณหมู่อะมิโนของตัวอย่างเจนเนอเรชัน G1.0 G2.0 และ G3.0 ในความเป็นจริงแล้วปริมาณหมู่เอมีนที่วัดได้ในแต่ละเจนเนอเรชันจะมีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้ตามหลักทฤษฎี ซึ่งบนพื้นฐานของปฏิกิริยาแล้วมีเหตุผลที่เป็นไปได้อยู่ 2 อย่างที่สามารถบอกได้ว่าทำไมค่าที่ได้ตามหลักทฤษฎีมีค่าสูง เหตุผลแรกเนื่องจากผลของการกีดขวางเนื่องจากขนาดของหมู่ปลายสายโซ่โมเลกุลที่หนาแน่น ซึ่งในขั้นตอนการสังเคราะห์ที่เพิ่มขึ้นผลของความหนาแน่นของหมู่เอมีนจะเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การแพร่ขยายของกิ่งก้านของเดนไดรเมอร์ถูกขัดขวาง อีกเหตุผลหนึ่งคือ การเพิ่มปริมาณหมู่อะมิโนในขั้นตอนปฏิกิริยาอะมิเดชัน จะเกิดปฏิกิริยาข้างเคียงของเอทิลีนไดเอมีนหนึ่งโมเลกุลกับหมู่เอสเทอร์ 2 หมู่เกิดการเชื่อมขวางทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลดังที่แสดงในรูปที่ 6 ซึ่งมีผลให้หมู่เอสเทอร์ลดลงในขั้นตอนปฏิกิริยาถัดมา



รูปที่ 4 FTIR spectra of PAMAM grafted silica 0.5-3.0 generation

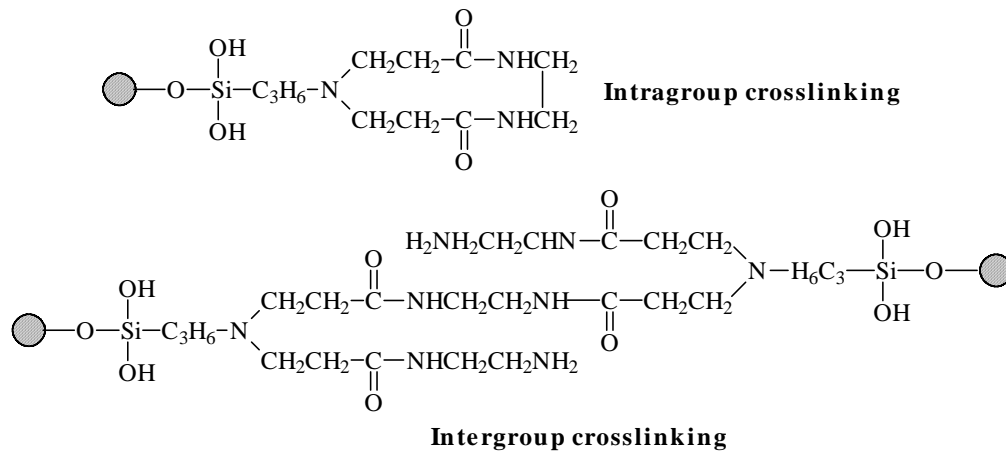
ตารางที่ 2 Amino group content on the surface of PAMAM grafted silica

Generation	Amino group content (mmol/g)	
	Observed	Theoretical
0.0	3.90	-
1.0	4.84	7.80
2.0	3.87	15.60
3.0	4.35	31.20



รูปที่ 5 TGA thermogram of PAMAM grafted silica 0.5 – 3.0 generations

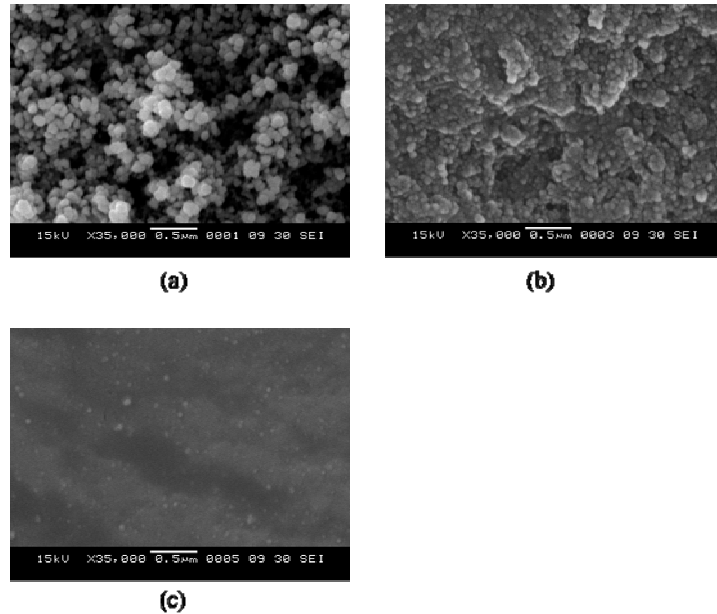




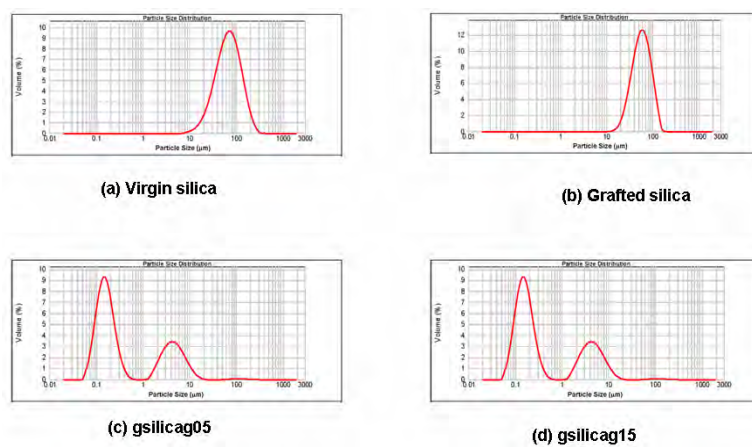
รูปที่ 6 Intra- and intergroup reaction of terminal amine group and terminal ester group of PAMAM grafted silica

### 1.3.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SEM และการวัดขนาดอนุภาค

โดยธรรมชาติของผงอนุภาคนาโนซิลิกามักจะเกิดการรวมตัวเป็นก้อนและเกิดเป็นกลุ่มอนุภาคนาโนที่มีขนาดไมครอน ซึ่งการเกิดอันตรกิริยาทางกายภาพของอนุภาคนาโนจะทำให้การแยกอนุภาคทำได้ยากมากโดยวิธีการให้แรงเชิงกลเพื่อให้อนุภาคอยู่อย่างอิสระเนื่องจากอนุภาคมีพื้นที่ผิวสูงมาก ในการศึกษาการศึกษาผลของการกราฟต์พอลิอะมิโดเอมีนเดนไดรเมอร์ลงบนผิวของซิลิกาต่อการรวมตัวของอนุภาคและความเสถียร ซึ่งวิเคราะห์ผลได้โดยใช้เทคนิค SEM และการวัดขนาดอนุภาค ภาพถ่ายของ SEM แสดงได้ดังรูปที่ 7 อย่างเช่นที่กล่าวมา อนุภาคของซิลิกามักจะเกิดการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนซึ่งเป็นที่เข้าใจกันว่าแรงทางกายภาพอย่างเช่นพันธะไฮโดรเจนมีผลต่อการรวมตัวของอนุภาค หลังจากขั้นตอนการกราฟต์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของการกระจายตัวของอนุภาคหรือขนาดของการรวมตัวดังเช่นที่แสดงในรูปที่ 8 ซึ่งจากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดเอมีนที่กราฟต์ลงบนผิวของซิลิกาจะทำให้เกิดการกระจายตัวของอนุภาคที่รวมตัว ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากผลของหมู่กีดขวางของไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดเอมีนที่กราฟต์ลงบนผิวของซิลิกา เมื่อสังเกตจากภาพถ่าย SEM ไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดเอมีนที่กราฟต์ลงบนผิวของซิลิกาจะส่งผลให้ลดขนาดอนุภาคของการรวมตัว ขนาดของอนุภาคตัวอย่างที่วัดได้ด้วยเทคนิคการกระเจิงแสงเลเซอร์ ในรูปที่ 8 แสดงการกระจายขนาดอนุภาคเปรียบเทียบระหว่างซิลิกาเริ่มต้นกับไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกา จากที่เห็นพบว่าขนาดอนุภาคก่อนการสังเคราะห์จะมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 100 ไมครอน และเมื่อผ่านการดัดแปรผิวแล้วขนาดอนุภาคจะลดลงเป็นขนาดโดยประมาณ 100 นาโนเมตร



รูปที่ 7 The SEM images of (a) silica, (b) PAMAM grafted silica 0.5 generation and (c) PAMAM grafted silica 1.0 generation.

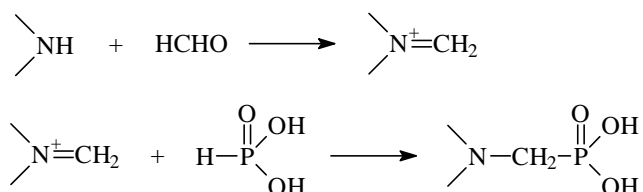
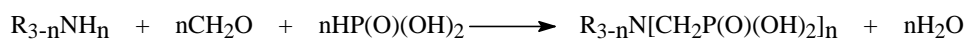


รูปที่ 8 The particle size distribution of (a) virgin silica, (b) grafted silica, (c) PAMAM grafted silica 0.5 generation and (d) PAMAM grafted silica 1.5 generation.

### 1.3.4 การทำฟอสฟอริเลชันของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกา

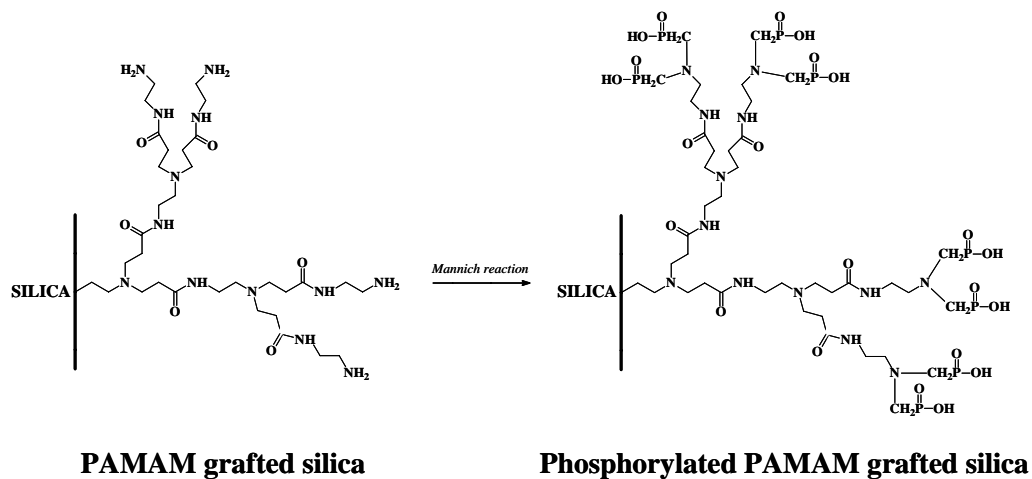
การเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันของหมู่เอมีนเพื่อให้พอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกามีคุณสมบัติพิเศษในการวิจัยนี้หมู่เอมีนจะถูกเปลี่ยนเป็นหมู่ฟอสฟอนิกซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าให้สมบัติในการจับ

อนุภาคโลหะและการหน่วงไฟ วิธีการเปลี่ยนหมู่ฟังก์ชันทำได้โดยปฏิกิริยาแบบ Mannich โดยการเกิดปฏิกิริยาของกรดฟอสฟอรัสกับฟอร์มัลดีไฮด์และหมู่เอมีนชนิดปฐมภูมิ ปฏิกิริยานี้จะเกิดได้ที่ค่า pH ต่ำๆ เช่นที่ใช้ปริมาณกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นประมาณ 2-3 โมลต่อโมลของหมู่เอมีน กลไกการเกิดปฏิกิริยาแบบ Mannich ของเอมีน ฟอร์มัลดีไฮด์ และกรดฟอสฟอรัสแสดงได้ดังแผนภาพที่ 2



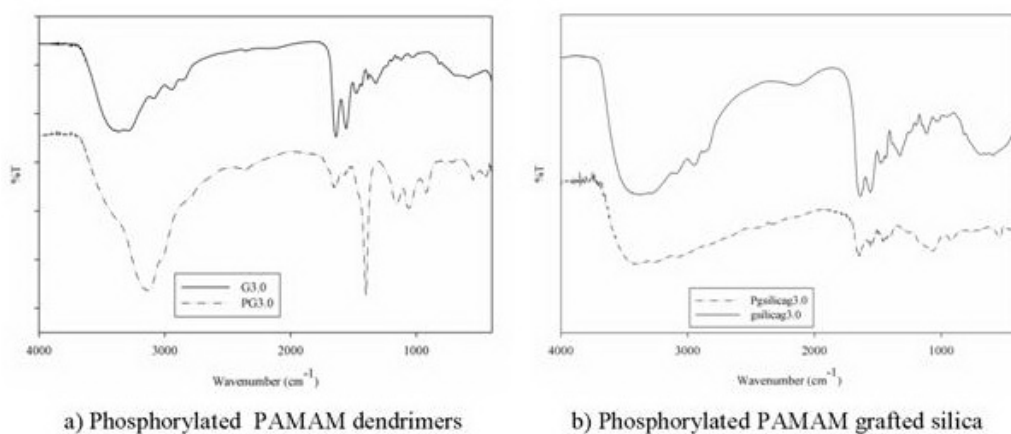
แผนภาพที่ 2 Mannich reaction involving an amine, formaldehyde and phosphorous acid

ในการทดลองนี้ทำให้เกิดหมู่กรดฟอสฟอนิกที่ผิวของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกา ซึ่งโครงสร้างตามทฤษฎีของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกทำฟอสฟอรีเลชันแสดงดังรูปที่ 9 ผลของผลิตภัณฑ์ที่ได้สามารถตรวจสอบลักษณะได้โดยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FTIR และสเปกตรัมของ FTIR แสดงในรูปที่ 10 หลังจากการดัดแปรหมู่ฟังก์ชันจะเกิดตำแหน่งการดูดกลืนใหม่ที่แสดงให้เห็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกา ตำแหน่งการดูดกลืนของหมู่กรดฟอสฟอนิกเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง  $1182\text{ cm}^{-1}$   $1078\text{ cm}^{-1}$  และ  $923\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งเป็นลักษณะของหมู่ (P=O), (P-OH) และ (P-O) ตามลำดับ และพบว่าตำแหน่งการดูดกลืนของ N-H stretching ที่ตำแหน่ง  $3500\text{ cm}^{-1}$  ในพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าถูกใช้ไปในปฏิกิริยาแบบ Mannich การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค  $^1\text{H NMR}$  ที่แสดงในรูปที่ 11 พบว่า สเปกตรัมของพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกฟอสฟอรีเลตจะแสดงสัญญาณของหมู่ C(1)-H<sub>2</sub> และ C(2)-H<sub>2</sub> และเมทิลีนที่ติดกับอนุภาคฟอสฟอรัสที่ตำแหน่ง 3.6 และ 3.7 ppm. ตามลำดับ ผลการตรวจสอบลักษณะด้วยเทคนิค FT-IR และ  $^1\text{H NMR}$  ยืนยันได้ว่าประสบความสำเร็จในการสังเคราะห์หมู่กรดฟอสฟอนิกแทนที่หมู่เอมีนในพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกา ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติเฉพาะ

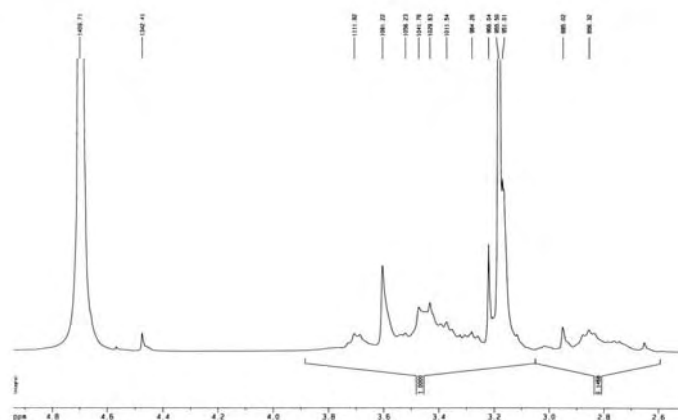


รูปที่ 9 The theoretical structure of phosphorylated PAMAM dendrimers and PAMAM

grafted silica.



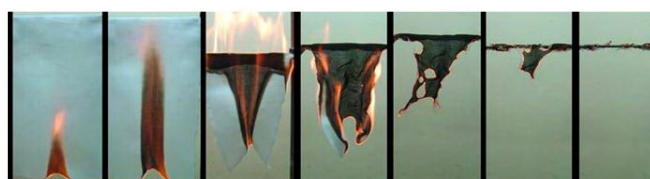
รูปที่ 10 FTIR สเปกตรัมของ phosphorylated PAMAM dendrimers and PAMAM grafted silica



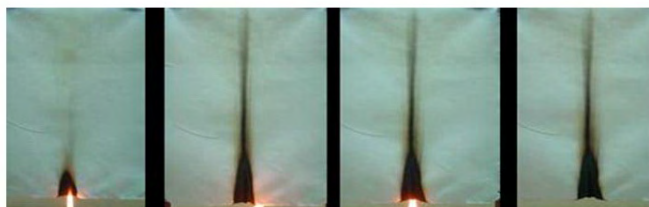
รูปที่ 11  $^1\text{H}$  NMR สเปกตรัมของ phosphorylated PAMAM grafted silica

### 1.3.5 ผลการทดสอบการหน่วงไฟ

จากที่กล่าวมาข้างต้น พอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกฟอสฟอริเลตจะให้สมบัติการจับอนุมูลอิสระและการหน่วงไฟ การประเมินค่าเบื้องต้นของผลการหน่วงไฟของสารตัวอย่างบนผ้าฝ้าย โดยคาดหมายว่าผ้าฝ้ายที่ผ่านการตกแต่งด้วยพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกฟอสฟอริเลตจะช่วยทำให้ผ้าฝ้ายต้านไฟได้ ผ้าที่ผ่านการตกแต่งจะนำไปทดสอบการลุกไหม้ไฟในแนวดิ่งโดยเปรียบเทียบกับผ้าฝ้ายที่ยังไม่ผ่านการตกแต่ง ผลการทดสอบที่ได้แสดงในรูปที่ 12 พบว่าผ้าฝ้ายที่ผ่านการตกแต่งด้วยพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกฟอสฟอริเลตจะให้สมบัติการหน่วงไฟที่ดีเยี่ยม กลไกการหน่วงไฟของสารประกอบที่มีฟอสฟอรัสแสดงให้เห็นว่า สารประกอบของฟอสฟอรัสจะเกิดปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของแอนไฮโดรกลูโคสป้องกันไม่ให้เกิดเลโวกลูโคซาน ซึ่งจะเป็นการช่วยลดปริมาณของเชื้อเพลิงในการติดไฟและยังช่วยเพิ่มการเกิดชาร์ พอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกฟอสฟอริเลตจะให้ความปลอดภัยในการใช้งานและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับสารหน่วงไฟประเภทอื่นที่ประกอบด้วยธาตุที่เป็นพิษ เช่น โบรอน และฮาโลเจน จากโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้จะพบว่า ในโครงสร้างประกอบด้วยไนโตรเจนซึ่งจะแสดงสมบัติช่วยเสริมสมบัติการหน่วงไฟร่วมกับฟอสฟอรัส ในไนโตรเจนจะช่วยเพิ่ม Electrophilicity ของฟอสฟอรัสทำให้แสดงสมบัติเป็นกรดลิวอิสที่แรง และช่วยเพิ่มการเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันกับหมู่ไฮดรอกซิลของคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของแอนไฮโดรกลูโคส [16] ดังนั้นพอลิอะมิโดเอมีนกราฟต์ซิลิกาที่ถูกฟอสฟอริเลตที่สังเคราะห์ได้จะให้ศักยภาพในการเป็นวัสดุที่สามารถหน่วงไฟได้ดี



(a) ผ้าฝ้ายก่อนตกแต่งสำเร็จ



(b) ผ้าฝ้ายตกแต่งด้วย phosphorylated PAMAM dendrimers

รูปที่ 12 The flame retardancy of phosphorylated PAMAM dendrimer.

### 1.3.6. สรุปผลการทดลอง

การกราฟต์ไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนเดนไดรเมอร์ลงบนผิวของซิลิกาที่ถูกดัดแปรสามารถทำได้โดยการเกิดปฏิกิริยาแบบสลับไปมาระหว่างปฏิกิริยาการเติมแบบไมเคิลของซิลิกาที่มีหมู่อะมิโนกับเมทิลอะคริเลต และปฏิกิริยาอะมิเดชันของหมู่เมทิลเอสเทอร์กับเอทิลีนไดแอมีน ซิลิกาที่ถูกกราฟต์ด้วยไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนจะถูกสังเคราะห์จนถึงเจนเนอเรชัน 3 ซึ่งจะให้เปอร์เซ็นต์การกราฟต์ที่คำนวณได้จากเทคนิคการวิเคราะห์ด้วย TGA อยู่ที่ 2500 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณหมู่อะมิโนของตัวอย่างเจนเนอเรชัน G1.0 G2.0 และ G3.0 อยู่ที่ 4.84 3.87 และ 4.35 มิลลิโมลต่อกรัม ตามลำดับ ค่าที่ได้จากการทดลองพบว่ามีค่าต่ำกว่าค่าที่คำนวณได้ตามทฤษฎี ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากผลของการกีดขวางและการเกิดการเชื่อมขวางที่เกิดขึ้นภายในและระหว่างหมู่เคมีของอนุภาค ซิลิกาที่ถูกกราฟต์ด้วยไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนจะช่วยเพิ่มความสามารถในการกระจายตัวของอนุภาค ขนาดของอนุภาคที่รวมตัวก่อนการกราฟต์มีขนาดโดยประมาณ 100 ไมครอน และภายหลังการกราฟต์ขนาดอนุภาคจะลดลงอยู่ในระดับ 100 นาโนเมตร การทำฟอสฟอรีเลชันหมู่แอมีนของไฮเปอร์บรานซ์พอลิอะมิโดแอมีนเดนไดรเมอร์ทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาแบบ Mannich ผลที่ได้จะประกอบด้วยหมู่กรดฟอสฟอนิกที่ให้สมบัติในการหน่วงไฟที่ดีเยี่ยมซึ่งสามารถใช้งานทางด้านสิ่งทอได้ แต่อย่างไรก็ตามสารประกอบที่เตรียมได้มีความสามารถในการละลายน้ำสูง ซึ่งจะลดความสามารถในการยึดติดกับวัสดุลงเมื่อนำไปใช้นับวัสดุพวกเซลลูโลส

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสภาวิจัยแห่งชาติและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้การสนับสนุนด้านค่าใช้จ่ายในการวิจัย

### 1.3.7 เอกสารอ้างอิง

1. D.A.Tomalia. *Prog. Polym. Sci.* 30(2005) 294-324.
2. D.A. Tomalia, H. Baker, J. Dewald, M. Hall, G. Kallos, S Martin. *Polym. J. (Tokyo)* 17(1985) 117-132.
3. F. Autenta, W. Hayes, S. Rannard. *Eur. Polym. J.* 39(2003) 1742-1771.
4. D.K. Smith, A.R. Hirst, C.S. Love, J.R. Hardy, S.V. Brignell, B. Huang. *Prog. Polym. Sci.* 30(2005) 220-293.

5. B. Pan, F. Gao, L. Ao, H. Tian, R. He, D. Cui. *Colloid Surf. A.* 259(2005) 89-94.
6. X. Shi, W. Lesniak, M.T. Islam, M.C. Muñiz, L.P. Balogh, J.R. Baker Jr. *Colloid Surf. A.* 272(2006) 139-150.
7. S.M. Ahmed, D.M. Budd, N.B. McKeown, K.P. Evans, G.L. Beaumont, C. Donaldson, C.M. Brennan. *Polymer.* 42(2001) 889-896.
8. I.J. Majoros, B. Keszler, S. Woehler, T. Bull, J.R. Baker Jr. *Macromolecules.* 36(2003) 5526-5529.
9. J.M. Heldt, N.F. Durand, M. Salmain, A. Vessière, G. Jaouen. *J. Organometallic Chem.* 689(2004) 4775-4782.
10. T. Yoshimaru, S. Abe, K. Esumi. *Colloid Surf. A.* 251(2004) 141-144.
11. R. Qu, Y. Niu, C. Sun, C. Ji, C. Wang, G. Cheng. *Micro. Meso. Mat.* 97(2006) 58-65.
12. N. Tsubokawa, H. Ichioka, T. Satoh, S. Hayashi, K. Fujiki. *React. Funct. Polym.* 37(1998) 75-82.
13. X.Z. Wu, P. Liu, Q.S. Pu, Q.Y. Sun, Z.X. Su. *Talanta.* 62(2004) 918-923.
14. Y. Taniguchi, K. Shirai, H. Saitoh, T. Yamauchi, N. Tsubokawa. *Polymer* 46(2005) 2541-2543.
15. A. Simon, T. Cohen-Bouhacina, M.C. Porté, J.P. Aimé, C. Baquey. *J. Colloid. Interface Sci.* 251(2002) 278-283.
16. C. Tomasino. *Chemistry & Technology of Fabric Preparation & Finishing*. Department of textile engineering, chemistry and science. College of textile North Carolina State University.

## โครงการ 2

### การเตรียมไคโตซานดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีน

Chemical modification of chitosan with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine and its antimicrobial activity on cotton fabric

#### 2.1 บทนำ

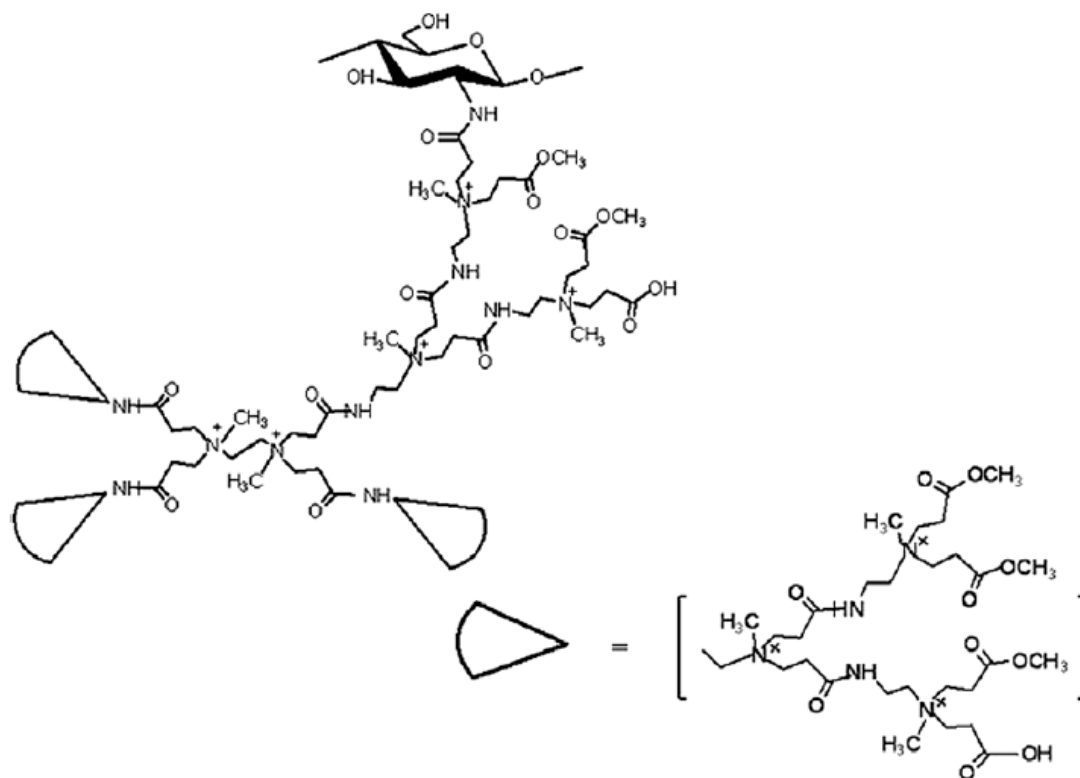
ไคโตซานเป็นอนุพันธ์ของไคติน ได้มาจากธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ ย่อยสลายได้ทางชีวภาพและมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และเป็นที่ทราบกันดีว่าสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานเป็นผลมากจากการที่ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่มีประจุบวกซึ่งสามารถจับกับส่วนที่เป็นประจุลบของโปรตีนที่อยู่ในจุลินทรีย์ได้ ประจุบวกของไคโตซานจะเกิดขึ้นได้ก็ต่อเมื่อไคโตซานอยู่ในสภาวะกรด ( $\text{pH} < 6$ ) ดังนั้นจึงทำให้ในการใช้งานไคโตซานมีข้อจำกัด นอกจากนี้สมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไคโตซานยังขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลอีกด้วย ไคโตซานจะสามารถละลายน้ำได้ในสภาวะกรดเท่านั้นและนี่ก็เป็นข้อจำกัดที่สำคัญในการนำไคโตซานไปใช้งาน และเป็นที่มาของงานวิจัยที่ศึกษาและพัฒนาอนุพันธ์ของไคโตซานเพื่อให้ได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่กว้างขึ้น วิธีหนึ่งที่สามารถทำได้ก็คือการเพิ่มหมู่ quaternary ammonium เข้าไปในสายโซ่ไคโตซาน

ตัวอย่างของการดัดแปรไคโตซานเชิงเคมีเพื่อให้ได้อนุพันธ์ของไคโตซาน ได้แก่ N-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium) propyl] chitosan chloride ซึ่งสามารถเพิ่มสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Lim & Hudson, 2004) นอกจากนี้ยังมี polyethyleneimine grafted chitosan (Kim et al., 2007) และ trimethylated chitosan (Kean, Roth, & Thanou, 2005) ที่สามารถเพิ่ม transfection efficiency และเมื่อเร็วๆ นี้ hyperbranched polyamidoamine (PAMAM) ซึ่งเป็นพอลิเมอร์ที่มีกิ่งก้านสาขามากมาย และมีหมู่ที่ผิวจำนวนมากได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้งานทางด้านต่างๆ เช่น ใช้เป็น nanoscopic containers (SayedSweet, Hedstrand, Spider, & Tomalia, 1997) ใช้ในการรักษาโรค (Majoros, Williams, & Baker, 2008) และใช้เป็น ultrafine colloid stabilizer (Marty, Martinez-Aripe, Mingotaud, & Mingotaud, 2008) นอกจากนี้ยังมีการดัดแปรหมู่ที่ผิวให้เป็นหมู่อื่นๆ ที่ต้องการนำไปใช้ประโยชน์ได้อีกมากมายเช่น หมู่ acetamid, hydroxyl, carboxyl หรือ quaternary ammonium จากตัวอย่างดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการนำ hyperbranched polyamidoamine (PAMAM) ไปใช้งานได้หลากหลาย (Vogtle, Gestermann, Hesse, Schwier, & Windisch, 2000) ยกตัวอย่างเช่น quaternized PAMAM dendrimers มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ (Chen et al., 2000) นอกจากนี้ 'dendrimer-like' hyperbranched polyamidoamine ยังสามารถรวมตัวกับซิลิกา (Punyacharoennon & Srikulkit, 2008)



หรือผงไคโตซานได้ด้วย (Tsubokawa & Takayama, 2000) ผลที่ได้ดังกล่าวถือได้ว่าเป็นวัสดุผสม (hybrid materials) ที่สามารถนำไปใช้งานได้หลากหลาย

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการกราฟท์แคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนลงบนสายโซ่ของไคโตซาน และตรวจสอบลักษณะเฉพาะ โดยมีจุดประสงค์เพื่อให้ได้ไคโตซานที่สามารถละลายน้ำได้ในช่วงพีเอชที่กว้างขึ้นและมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ขั้นตอนแรกเป็นการสังเคราะห์ไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนตามวิธีของโทมาเลียโดยใช้ปฏิกิริยาการรวมตัวแบบไมเคิล (Michael addition) สลับกับปฏิกิริยาแอมิเดชัน (Tomalia et al., 1985) งานวิจัยนี้จะสังเคราะห์ไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนไปจนถึงรุ่น 2.5 จากนั้นจะทำปฏิกิริยาเพื่อเติมหมู่เมทิลโดยอาศัยไดเมทิลซัลเฟตเพื่อให้ได้แคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์เพื่อใช้ในการดัดแปรไคโตซาน โครงสร้างของแคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีน-ไคโตซานแสดงดังรูปที่ 1 การตรวจสอบลักษณะเฉพาะของไคโตซานดัดแปรใช้เทคนิคการวิเคราะห์ธาตุ พูรีเยร์ทรานสฟอร์มมอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี เทอร์โมกราวิเมตริก และเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน และใช้ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีน (แคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีน-ไคโตซาน) ในการตกแต่งผ้าฝ้าย และศึกษาผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิด *Staphylococcus aureus* เทียบกับไคโตซานที่ไม่ผ่านการดัดแปร



## รูปที่ 1 โครงสร้างของแคตไอออนไนเซพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมีโดเอมีน-โคโตซาน

### 2.2 การทดลอง

#### 2.2.1 วัสดุ

ผงโคโตซาน (commercial-grade, approx. 85% degree of deacetylation น้ำหนักโมเลกุล  $10^6$  Da จากบริษัท Ebase

เอทิลีนไดเอมีน (ethylene diamine, EDA) จากบริษัท Fluka (Switzerland)

เมทิลอะคริเลต (methyl acrylate, MA) จากบริษัท Fluka (Switzerland)

เมทานอล (methanol, commercial-grade) จากบริษัท TSL Chemical (Thailand) ซึ่งจะนำมากลั่นก่อนการใช้งาน

ไดเมทิลซัลเฟต (dimethyl sulphate, commercial grade) ได้รับการอนุเคราะห์จากบริษัท Modern Dyestuff & Pigment (Thailand)

กรดอะซิติก (glacial acetic acid) จากบริษัท Merck Chemicals

ผ้าฝ้ายทอที่ผ่านการฟอกขาว (น้ำหนัก 120 กรัมต่อตารางเมตร) จากบริษัท Bigger Text (Thailand)

#### 2.2.2 การสังเคราะห์ไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมีโดเอมีน

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาการรวมตัวแบบไมเคิล (Michael addition) ดำเนินการดังต่อไปนี้ ผสมเอทิลีนไดเอมีน (50 กรัม, 0.833 โมล) ลงในเมทานอล 200 มิลลิลิตร และหยดสารละลายที่เตรียมได้นี้ลงในสารละลายผสมระหว่างเมทิลอะคริเลต (350 กรัม, 4.069 โมล) กับเมทานอล 200 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้อุณหภูมิเพิ่มขึ้นจนถึงอุณหภูมิห้องแล้วกวนต่อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง การกำจัดตัวทำละลายและเมทิลอะคริเลตที่มากเกินไปทำโดยใช้เครื่องระเหยสารเป็นไอแบบหมุน (rotary evaporator) โดยลดความดันอากาศ และทำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งในขั้นตอนนี้จะได้ไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมีโดเอมีน ชั้น 0.5 ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์

ขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเอมิเตชัน ดำเนินการดังต่อไปนี้ หยดสารละลายผสมของไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิโดแอมีน ชั้น 0.5 ปริมาณ 100 กรัม ในเมทานอล 100 มิลลิลิตร ลงในสารละลายผสมของเอทิลีนไดเอมีน (60 กรัม, 1 โมล หรือมากกว่าปริมาณของเมทิลเอสเทอร์ 4 เท่า) ในเมทานอล 300 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสโดยควบคุมอัตราการหยดไม่ให้เร็วเกินไป กล่าวคือไม่ให้อุณหภูมิสูงเกินอุณหภูมิห้อง หลังจากหยดเอทิลีนไดเอมีนหมดกานของผสมต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงกำจัดเอทิลีนไดเอมีนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออก โดยลดความดันอากาศ และทำที่อุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนนี้จะได้ไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิโดแอมีน ชั้น 1.0 ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเอมีน

สังเคราะห์ด้วยปฏิกิริยาการเติมแบบไมเคิลและปฏิกิริยาอะมิเตชันสลับกันไปมาจนกระทั่งได้ไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิโดแอมีน ชั้น 2.5

### 2.2.3 การทำปฏิกิริยาเมทิลเลชันของไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมิโดแอมีนที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์

ปฏิกิริยาเมทิลเลชันเกิดขึ้นจากการเติมไดเมทิลซัลเฟต 13 กรัม (0.1 โมล) ลงในสารละลายผสมระหว่างไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 (มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์) (20 กรัม, 0.007 โมล) ในเมทานอล 200 มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 9.5–10 ปฏิกิริยาเมทิลเลชันจะเกิดขึ้นทันทีที่อุณหภูมิห้องซึ่งมีผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบลดลงอย่างช้าๆ จึงต้องควบคุมความเป็นกรด-ด่างโดยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้นเพื่อให้ปฏิกิริยาเมทิลเลชันดำเนินต่อไป โดยจะต้องรักษาค่าความเป็นกรด-ด่างของระบบให้เป็น 7 ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่อุณหภูมิห้องและกวนอย่างต่อเนื่อง หลังจากหยดไดเมทิลซัลเฟตหมดแล้ว กวนของผสมต่อไปอีก 30 นาที เพื่อให้ได้แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมิโดแอมีนที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์ที่จะใช้ในขั้นตอนต่อไปโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์

### 2.2.4 การตัดแปรงโคโตซานด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมิโดแอมีนที่มีหมู่ฟังก์ชันที่ปลายเป็นเมทิลเอสเทอร์

ในงานวิจัยนี้จะศึกษาปริมาณของแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิโดแอมีนที่ใช้ในการการตัดแปรงโคโตซาน คือ ใช้แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิโดแอมีนร้อยละ 10 และ 50 โดยน้ำหนักของโคโตซาน และใช้ในปริมาณมากเกินไป (5 เท่าของปริมาณโคโตซาน) โดยดำเนินการดังต่อไปนี้ นำของผสมระหว่างโคโตซานกับแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 ละลายในกรดอะ

ซิติคความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วกวนด้วยอัตราเร็ว 700 รอบต่อนาที จนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน (กรณีที่ใช้แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 10 และ 50 โดยน้ำหนักของไคโตซาน) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายให้เป็น 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ จากนั้นกวนต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 วัน เพื่อให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่แอมิโนในสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานกับหมู่เมทิลเอสเทอร์ของแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีน กรณีที่ใช้แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 10 และ 50 โดยน้ำหนักของไคโตซานนั้นจะเกิดสารแขวนลอยที่เป็นของแข็งขึ้น จึงต้องกรองผ่านน้ำกลั่น ซึ่งจะได้เป็นก้อนของแข็งฟูที่ยังเปียกอยู่ (wet cake) จากนั้นนำไปเก็บในตู้ดูดความชื้นเพื่อนำไปตรวจสอบลักษณะเฉพาะต่อไป ในกรณีที่ใช้แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนมากเกินไปจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นของเหลวหนืดซึ่งต้องตกตะกอนในเมทานอลก่อนที่จะนำไปกรองและล้างด้วยน้ำ

## 2.2.5 สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานดัดแปร และผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซาน หรือไคโตซานดัดแปร

นำฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานดัดแปร และผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซาน หรือไคโตซานดัดแปรมาทดสอบสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ในการทดสอบ โดยการเลี้ยงเชื้อแล้วนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่เกิดจากชั้นทดสอบ โดยคำนวณตามสมการต่อไปนี้

$$\text{Reduction (\%)} = (B - A)/B \times 100$$

ขณะที่ A และ B คือ จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/ml) จากชุดทดลองและชุดควบคุม ที่บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 2.2.6 การตรวจสอบลักษณะเฉพาะ

เทคนิคการวิเคราะห์ธาตุ (CHN analysis) ใช้เครื่อง PerkinElmer 2400 series II CHNS/O Analyzer

ฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี (frequency range 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ , 64 consecutive scans, 4  $\text{cm}^{-1}$  resolution) ใช้เครื่อง Nicolet 6700 FT-IR spectrometer)

นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ( $^1\text{H}$  NMR, 300 MHz) ใช้เครื่อง Bruker DPX-300 spectrometer

เอกซ์เรย์ดิฟแฟรกชัน (X-ray diffraction, XRD) ใช้เครื่อง PW 3710 Philips diffractometer

เทอร์โมกราวิเมตริก (Thermal gravimetric analysis, TGA) ใช้เครื่อง Mettler Toledo Stare System DCS822e Module ใช้ heating rate of 10 °C/min จาก 30 to 900 °C ภายใต้ nitrogen gas

ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ใช้เครื่อง JEOL Model JSM-5410LV

## 2.2.7 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

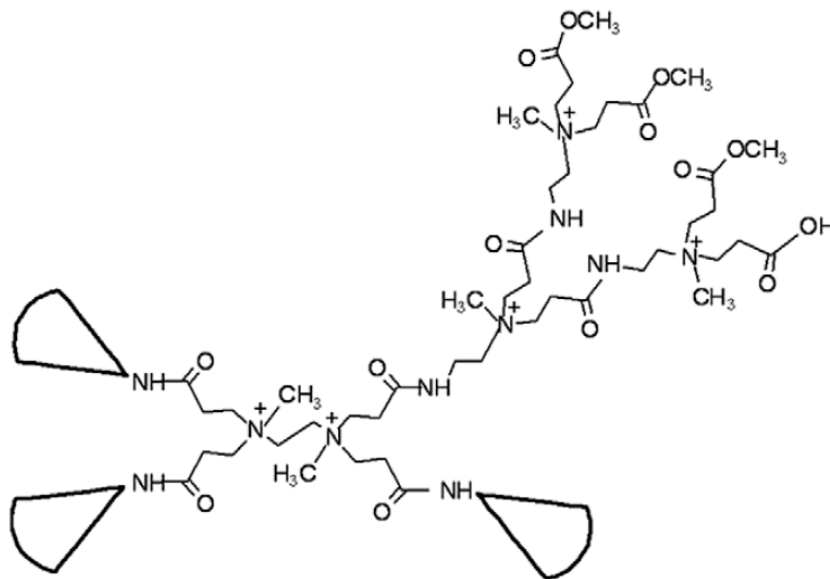
### 2.2.7.1 การวิเคราะห์ธาตุ

ผลการวิเคราะห์ธาตุ คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ของไคโตซาน และไคโตซานดัดแปร แสดงดังตารางที่ 1 จากตารางจะเห็นว่าปริมาณธาตุคาร์บอนและไนโตรเจนของไคโตซานที่ดัดแปรด้วย แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดเอมีนอย่างชัดเจน ในขณะที่ปริมาณธาตุไฮโดรเจนมีความแปรปรวน ทั้งนี้เนื่องมาจากไคโตซานที่ผ่านการดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดเอมีนมีความสามารถในการดูดความชื้นได้ดีค่าที่ได้อาจมีปริมาณธาตุไฮโดรเจนในอะตอมของน้ำรวมอยู่ด้วย

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ธาตุ คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ของไคโตซาน และไคโตซานดัดแปร

Sample	%C	%H	%N
Chitosan (CTS)	40.20	7.25	7.42
10 wt.% PAMAM-CTS	37.55	7.06	7.03
50 wt.% PAMAM-CTS	19.77	8.04	3.21
Excessive PAMAM-CTS	33.07	7.12	6.10

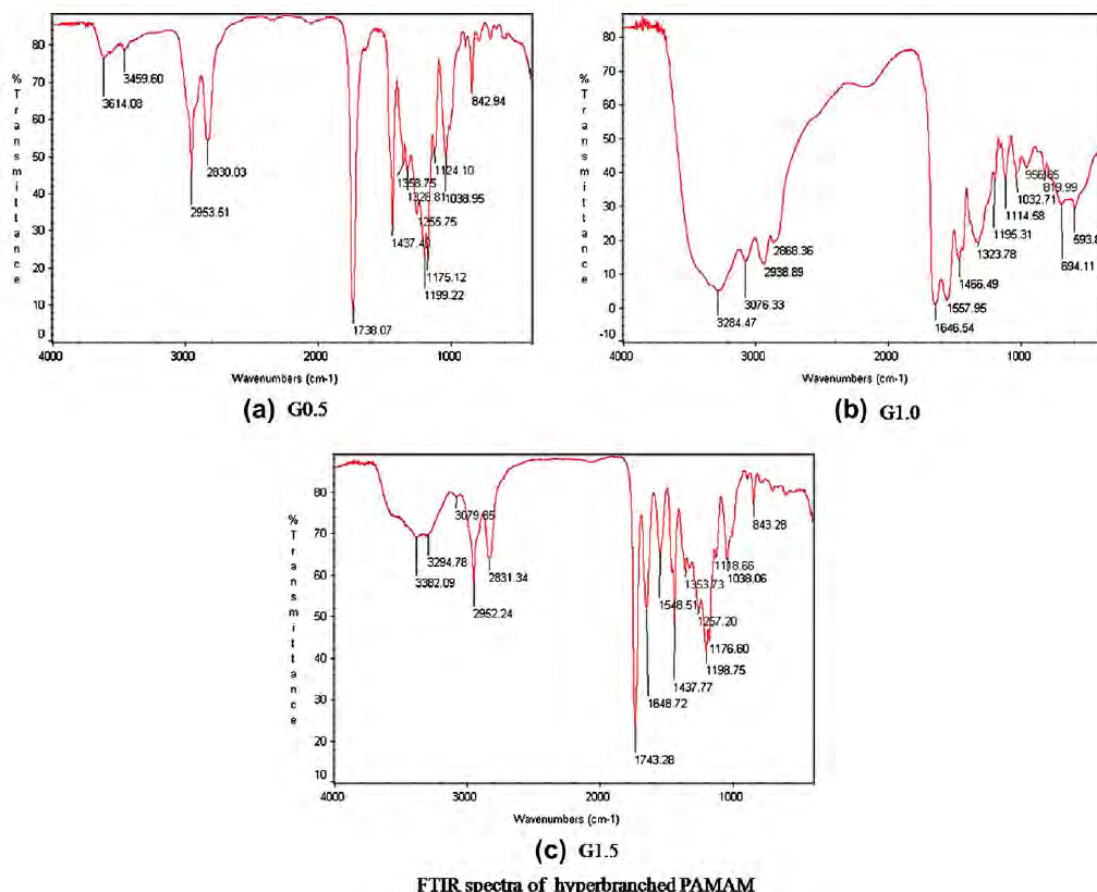
จากการทดลองพบว่าไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดเอมีนในปริมาณมากเกินไปจะสามารถละลายน้ำในช่วงพีเอชที่เป็นกลางได้ ทั้งนี้เนื่องมาจากโครงสร้างโมเลกุลมีการเชื่อมขวางกันอย่างหลวมๆ ซึ่งโครงสร้างของไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดเอมีนรุ่น 2.5 แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างของโคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5

#### 2.2.7.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคฟูรีเยร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี

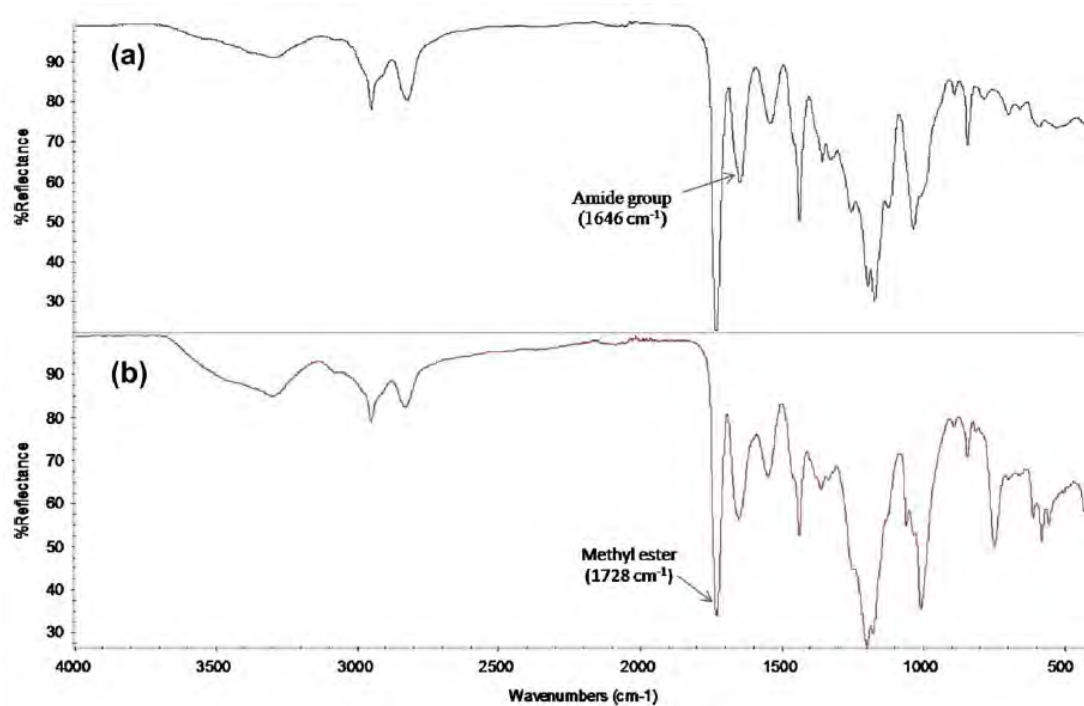
สเปกตรัมฟูรีเยร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 0.5, 1 และ 1.5 แสดงดังรูปที่ 3 จากรูปจะเห็นได้ว่าไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 0.5 จะปรากฏพีคที่บริเวณ  $1740\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงลักษณะของหมู่เมทิลเอสเทอร์แสดงว่าเกิดปฏิกิริยาการเติมแบบไมเคิล และพีคนี้จะไม่ปรากฏในสเปกตรัมฟูรีเยร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 1 และในรุ่นนี้จะเกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่แอมีนจึงปรากฏพีคกว้างที่บริเวณ  $3000\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$  และพีคที่ประมาณ  $1640\text{ cm}^{-1}$  ที่แสดงลักษณะเฉพาะของหมู่ N-H และ  $\text{NH}_2$  ตามลำดับ ส่วนสเปกตรัมฟูรีเยร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 1.5 จะปรากฏพีคที่บริเวณ  $1740\text{ cm}^{-1}$  และพีคที่ประมาณ  $1640\text{ cm}^{-1}$  ซึ่งแสดงลักษณะของหมู่เมทิลเอสเทอร์และแอมีนตามลำดับ



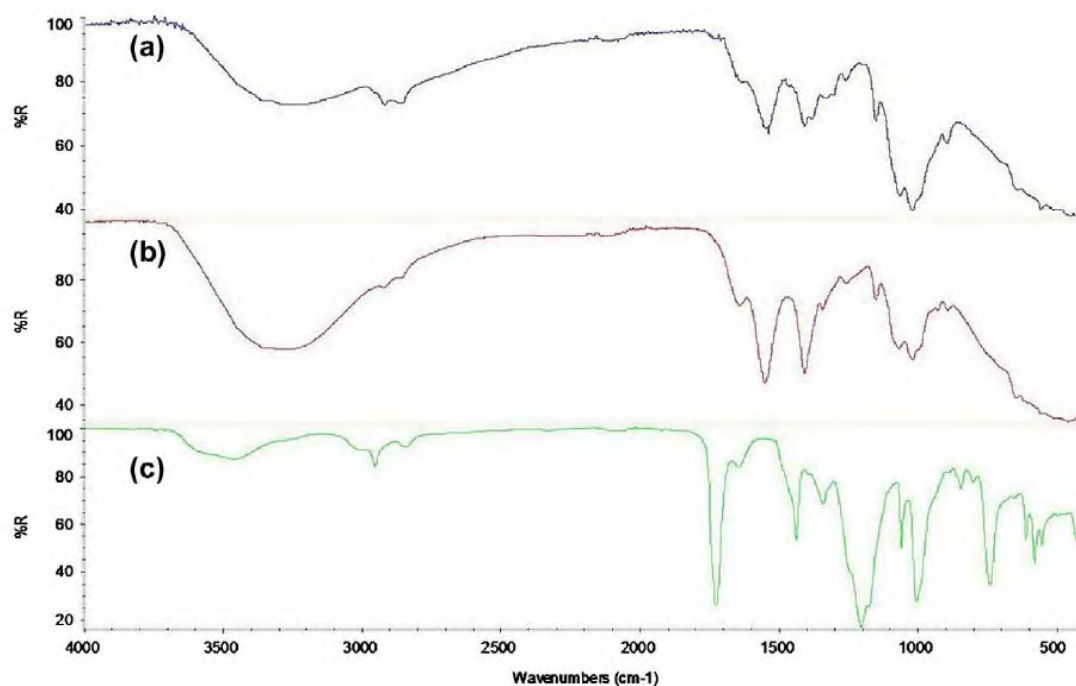
รูปที่ 3 สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 0.5, 1 และ 1.5

สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 และแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 แสดงดังรูปที่ 4 เมื่อเปรียบเทียบสเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 และแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 ที่บริเวณ  $1728\text{ cm}^{-1}$  จะเห็นได้ว่าความเข้มของพีคนี้ในแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนจะน้อยกว่าของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีน ทั้งนี้ น่าจะมีสาเหตุมาจากหมู่เอสเทอร์ถูกไฮโดรไลต์ไปเป็นหมู่คาร์บอกซิลระหว่างกระบวนการทำให้มีประจุ

สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของโคโตซาน โคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 50 และโคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณมากเกินไปแสดงดังรูปที่ 5



รูปที่ 4 สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของ (a) ไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 และ (b) แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5





รูปที่ 5 สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของ (a) ไคโตซาน (b) ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 50 และ (c) ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณมากเกินไป

จากรูปที่ 5 สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไคโตซาน ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 50 มีลักษณะคล้ายคลึงกัน ยกเว้นพีคของแอมไนด์ ที่  $1646\text{ cm}^{-1}$  ของไคโตซานจะน้อยกว่าของไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 50 อย่างชัดเจน แสดงว่าไคโตซานที่ผ่านการดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนมีปริมาณหมู่แอมไนด์มากกว่าไคโตซานที่ไม่ผ่านการดัดแปร

ส่วนสเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดของไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณมากเกินไปจะปรากฏพีคของหมู่เมทิลเอสเทอร์ที่  $1720\text{ cm}^{-1}$  อย่างชัดเจน โครงสร้างของไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณมากเกินไปแสดงดังรูปที่ 1

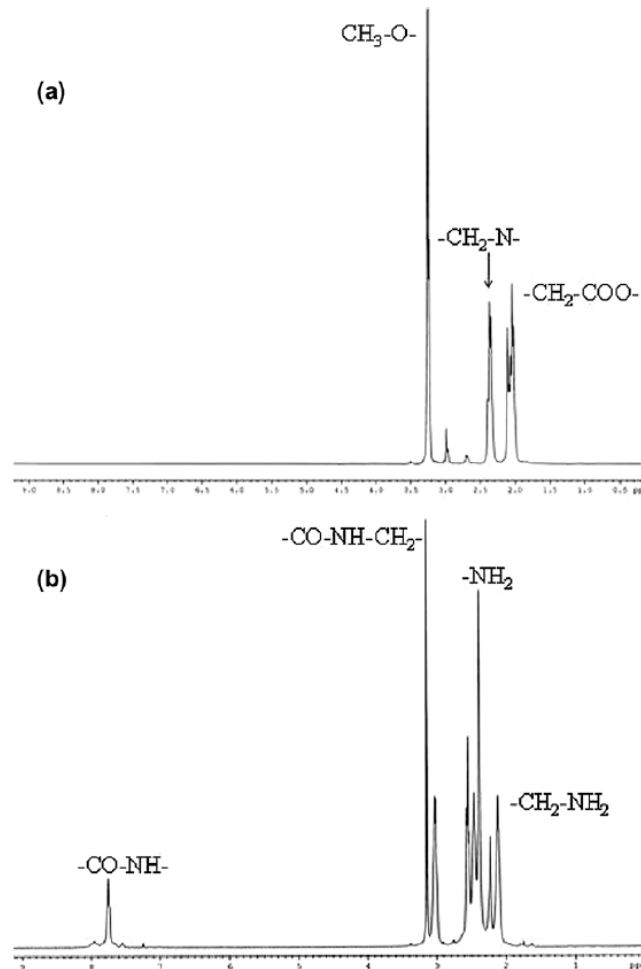
#### 2.2.7.2 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 0.5 และไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 1 แสดงดังรูปที่ 6 สเปกตรัมของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 0.5 ปรากฏพีคของหมู่เมทิลเอสเทอร์ที่ประมาณ 3.8 ppm ซึ่งจะไม่ปรากฏพีคของหมู่แอมไนด์แสดงว่าไม่มีการทำปฏิกิริยาระหว่างเอทิลีนไดแอมีนกับหมู่เมทิลเอสเทอร์ การป้องกันการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการใช้เอทานอลมากเกินไป พีคของเมทิลเอสเทอร์จะไม่ปรากฏในไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 1 แต่จะปรากฏพีคของพันธะแอมไนด์ที่ประมาณ 7.8 ppm

โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 แสดงดังรูปที่ 7 จากสเปกตรัมจะเห็นพีคที่เด่นชัดของเมทิลเอสเทอร์ที่ประมาณ 3.8 ppm และปรากฏพีคของเมทิลโปรตอนที่อยู่ใกล้หมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมที่ประมาณ 3.1 ppm แสดงว่าปฏิกิริยาเมทิลเลชันสามารถทำให้เกิดหมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมในโครงสร้างของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนส่งผลให้เกิดประจุบวกขึ้นในโครงสร้าง

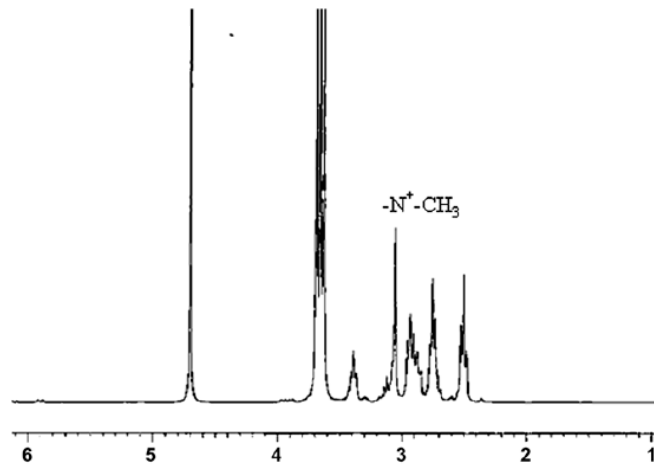
โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของไคโตซาน และไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 แสดงดังรูปที่ 8 จากโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของไคโตซานจะปรากฏพีคที่แสดงเอกลักษณ์ของไคโตซานที่บริเวณ 3.4, 3.2 และ 2.6 ppm ที่แสดงถึง H3- H6 และ H2 ตามลำดับ สำหรับโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 จะ

สังเกตเห็นพีคระหว่าง 2.2-3.6 ซึ่งแสดงลักษณะของโปรตอนไคโตซานและโปรตอนของไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดเอมีน และยังปรากฏพีคของเมทิลโปรตอนที่อยู่หมู่ควอเตอร์นารีแอมโมเนียมที่ประมาณ 3.1 ppm อีกด้วย



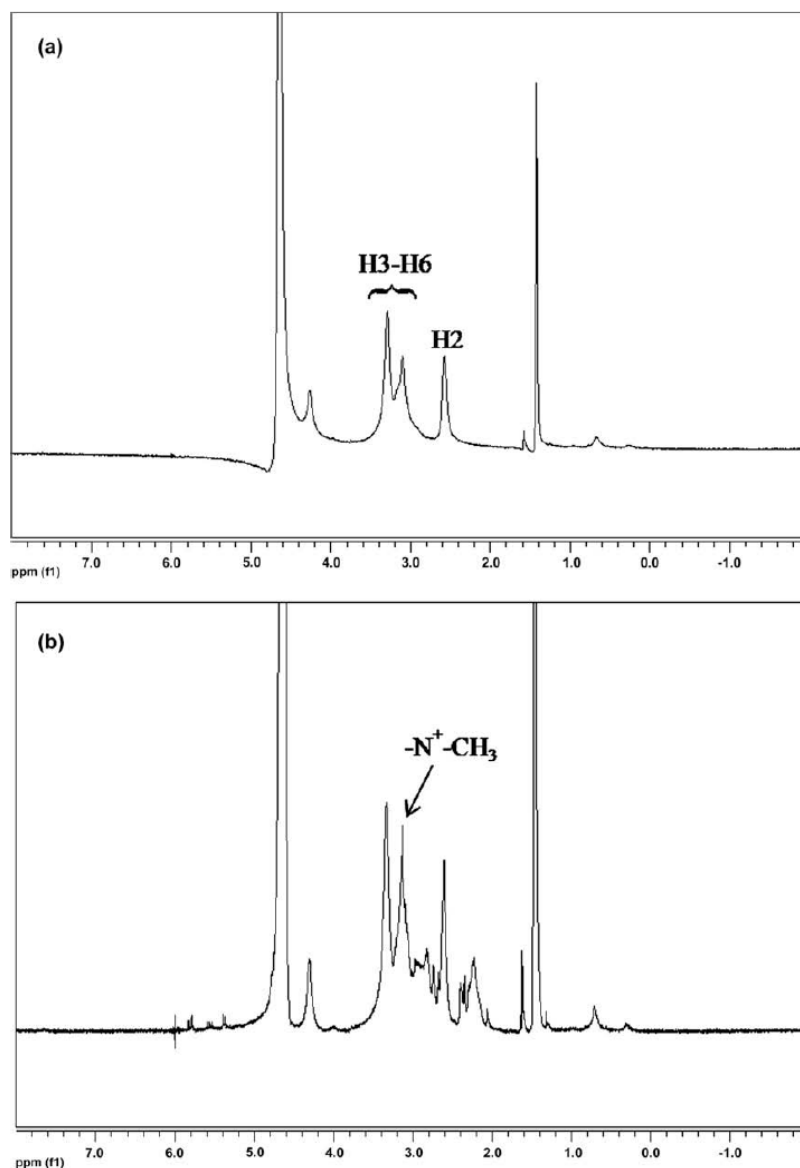
รูปที่ 6 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของ

(a) ไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดเอมีนรุ่น 0.5 (b) ไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดเอมีนรุ่น 1



รูปที่ 7 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์

พอลิเอมีโดเอมีนรุ่น 2.5

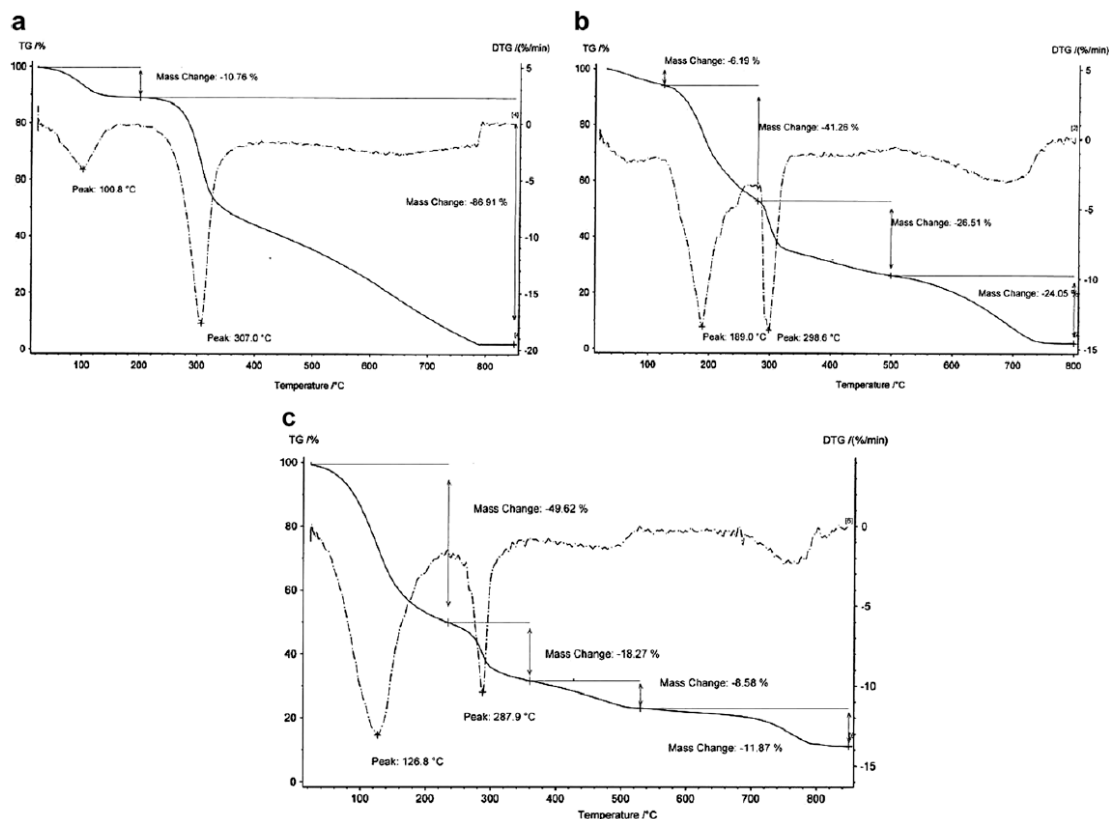


รูปที่ 8 โปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกตรัมของ (a) ไคโตซาน และ (b) ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5

### 2.2.7.3 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริก

เทอร์โมกราวิเมตริกเทอร์โมแกรมของไคโตซาน แคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 และไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนรุ่น 2.5 แสดงดังรูปที่ 9 จากเทอร์โมแกรมจะเห็นได้ว่าไคโตซานมีการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 200 องศาเซลเซียส และมี T<sub>d</sub> เป็น 307 องศาเซลเซียส ส่วนแคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์เดนไดรติกพอลิแอมิโดแ

มีน้ำหนัก 2.5 มีการสลายตัวง่ายกว่าคือเริ่มมีการสลายตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 120 องศาเซลเซียส และมี  $T_d$  เป็น 189 และ 298 องศาเซลเซียส ในขณะที่ไคโตซานที่ตัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิดอามีนรุ่น 2.5 มีการเปลี่ยนแปลงมวลหลายช่วงในระหว่างอุณหภูมิ 100-300 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนแปลงมวลที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 126 องศาเซลเซียส น่าจะเป็นการสลายตัวของส่วนที่เป็นแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิดอามีน ส่วนการเปลี่ยนแปลงมวลที่เกิดขึ้นที่อุณหภูมิ องศาเซลเซียส น่าจะเป็นการสลายตัวของส่วนที่เป็นไคโตซาน



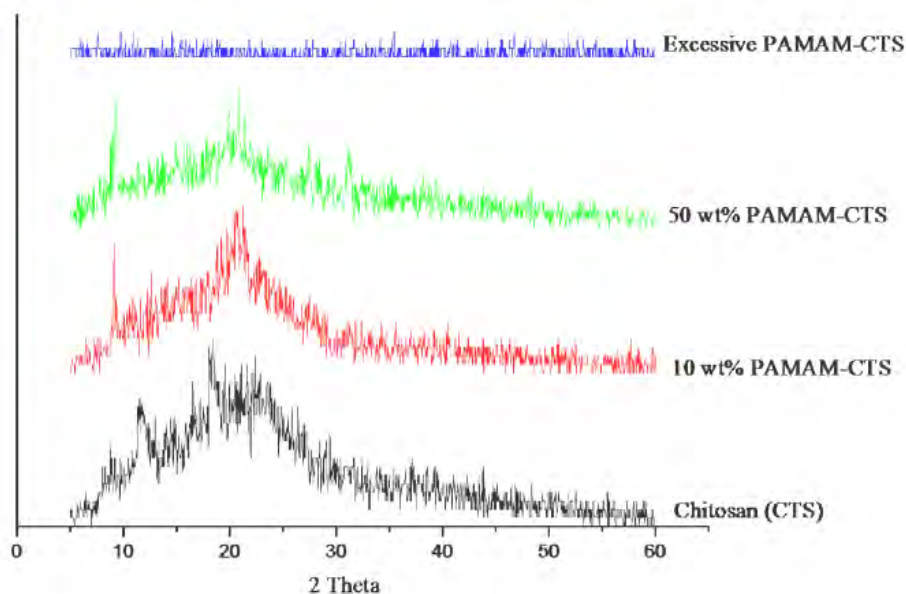
รูปที่ 9 เทอร์โมกราวิเมตริกเทอร์โมแกรมของ (a) ไคโตซาน

(b) แคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์เดนไดรติกพอลิเอมิดอามีนรุ่น 2.5 และ

(c) ไคโตซานที่ตัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิเอมิดอามีนรุ่น 2.5

#### 2.2.7.4 การวิเคราะห์ด้วยเทคนิคเอกซเรย์ดิฟแฟรกชัน

ฟิล์มไคโตซานและไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนจะนำมาทดสอบด้วยเทคนิคเอกซเรย์ดิฟแฟรกชันซึ่งจะใช้หลักการเลี้ยวเบนของรังสีเอกซ์ (X - Ray diffraction) ศึกษาสมบัติความเป็นผลึกของตัวอย่าง เอกซเรย์ดิฟแฟรกโทแกรมของฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนแสดงดังรูปที่ 10 จากเอกซเรย์ดิฟแฟรกโทแกรมของฟิล์มไคโตซาน จะเห็นว่ามีลักษณะของพีคที่กว้างที่ตำแหน่งประมาณ  $2\theta = 15^\circ$  ถึง  $30^\circ$  แสดงลักษณะกึ่งผลึก (Semicrystalline) ของฟิล์มไคโตซาน ส่วนเอกซเรย์ดิฟแฟรกโทแกรมของฟิล์มไคโตซานดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 10 50 และในปริมาณมากเกินไป แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนเพิ่มขึ้น ลักษณะกึ่งผลึกก็จะน้อยลงและแสดงลักษณะอสัณฐานในฟิล์มไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์برانซ์พอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณมากเกินไป ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจากการที่มีส่วนที่เกาะของแคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีนเดนไดรเมอร์มาเกาะที่สายโซ่ของไคโตซานเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะไปขัดขวางความเป็นผลึกของไคโตซาน







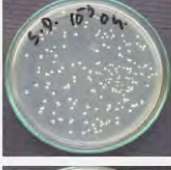





รูปที่ 10 เอกซเรย์ดิฟแฟรกโทแกรมของฟิล์มไคโตซาน และฟิล์มไคโตซานที่ดัดแปรด้วย แคตไอออนิกไฮเพอร์branซ์พอลิแอมิโดแอมีน

#### 2.2.7.5 สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานดัดแปร และผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซาน หรือไคโตซานดัดแปร แสดงดังตารางที่ 2 จากตารางจะเห็นได้ว่าฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานดัดแปรสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ใกล้เคียงกันทั้งนี้เนื่องฟิล์มไคโตซานที่ใช้ในการทดสอบไม่ได้ผ่านการทำให้เป็นกลางดังนั้นสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อาจมาจากผลของกรดอะซิติกที่หลงเหลืออยู่อีกทั้งฟิล์มไคโตซานที่ใช้ในการทดสอบยังมีปริมาณมากกว่าอีกด้วย ส่วนผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซาน และผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซานแล้วนำไปดีฟอลิเมอไรซ์ด้วยโซเดียมไนไตรท์มีร้อยละการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 0 ขณะที่ผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซานดัดแปรมีร้อยละการลดลงของเชื้อจุลินทรีย์เป็น 98.75 สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซานดัดแปรน่าจะเป็นผลมาจากการมีประจุบวกจำนวนมากในโครงสร้างโมเลกุลของไคโตซานดัดแปรซึ่งประจุบวกเหล่านี้จะไปจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย รบกวนการผ่านเข้าออกของสาร ยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอและองค์ประกอบที่จำเป็นของเซลล์แบคทีเรีย ทำให้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

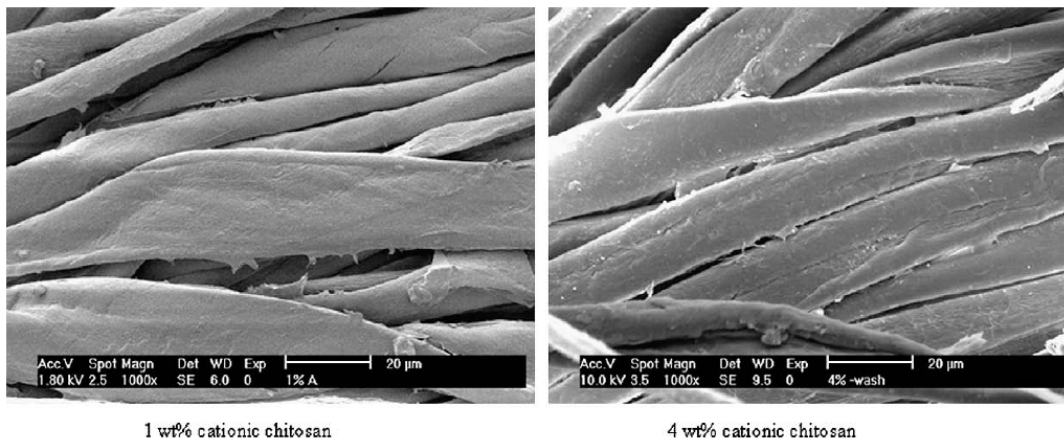
ตารางที่ 2 สมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของฟิล์มไคโตซาน ฟิล์มไคโตซานดัดแปร และผ้าฝ้ายที่ตกแต่งด้วยไคโตซาน หรือไคโตซานดัดแปร

Sample	wt.% add-on (on fabric)	Visual detection (experimental Section 2.5)		%Reduction
		A	B	
CTS film without neutralization (0.33 g)	–			100
Cat. PAMAM-CTS film (0.25 g)	–			99.99
CTS-fabric	1			0
NaNO <sub>2</sub> depolymerized CTS-fabric	1			0
Cat. PAMAM-CTS-fabric	1			98.75

#### 2.2.7.6 การประเมินลักษณะเฉพาะบนผิวหนัง

ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยฝ้ายที่ผ่านการตกแต่งสำเร็จด้วยไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 1 และไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการซัก 5 รอบแสดงดังรูปที่ 11 จะสามารถสังเกตเห็นได้ชัดเจนว่าบนพื้นผิวของผ้าฝ้ายทั้งหมดที่ผ่านการตกแต่งสำเร็จด้วยไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนมีอนุภาคของไคโตซานดัดแปรปกคลุมอยู่ทั่วไป และจะสังเกตเห็นได้ว่าผ้าฝ้ายที่ผ่านการตกแต่งสำเร็จด้วยไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการซัก 5 รอบก็ยังคงมีอนุภาคของไคโตซานดัดแปรปกคลุมอยู่



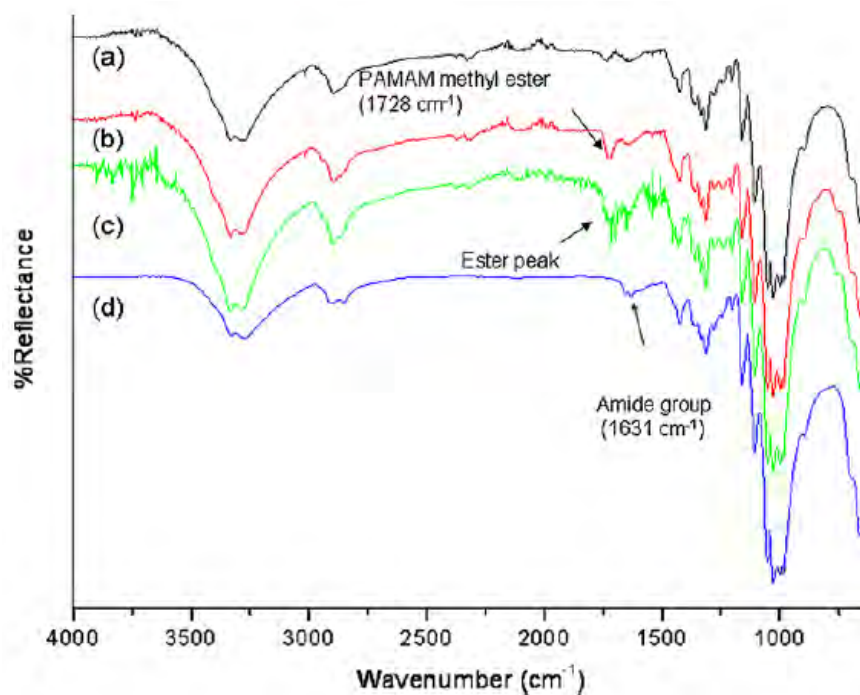


รูปที่ 11 ลักษณะพื้นผิวของเส้นใยฝ้ายที่ตกแต่งสำเร็จด้วยไคโตซานดัดแปร

ร้อยละ 1 และฝ้ายที่ตกแต่งสำเร็จด้วยไคโตซานดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์

พอลิเอมีโดเอมีนร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ที่ผ่านการซัก 5 รอบ

สเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์อินฟราเรด (เทคนิคเอทีอาร์) ของผ้าฝ้าย ผ้าฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนักก่อนและหลังการผึ่งด้วยความร้อน และฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนักที่ผ่านการซัก 5 รอบ แสดงดังรูปที่ 12 จากรูปจะเห็นได้ว่า ผ้าฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนักก่อนและหลังการผึ่งด้วยความร้อน และฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนักที่ผ่านการซัก 5 รอบ แสดงพีคของหมู่เมทิลเอสเทอร์และหมู่เอไมด์ซึ่งจะไม่ปรากฏในสเปกตรัมฟลูออเรสเซนซ์อินฟราเรดของผ้าฝ้ายที่ไม่ผ่านการตกแต่ง แสดงให้เห็นว่าผ้าฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรมีความคงทนต่อการซัก ทั้งนี้เป็นผลมาจากการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่เอไมด์และหมู่ไฮดรอกซิลในเซลลูโลส



- รูปที่ 12 สเปกตรัมฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรด (เทคนิคเอทีอาร์) ของ (a) ผ้าฝ้าย
- (b) ผ้าฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก ก่อนการผึ่งด้วยความร้อน
- (c) ) ผ้าฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนัก หลังการผึ่งด้วยความร้อน และ
- (d) ผ้าฝ้ายที่ตกแต่งไคโตซานดัดแปรร้อยละ 4 โดยน้ำหนักที่ผ่านการซัก 5 รอบ

## 2.8. สรุปผลการทดลอง

การรวมแคตไอออนิกไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนเข้ากับสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานทำได้โดยอาศัยปฏิกิริยาระหว่างหมู่เมทิลเอสเทอร์ของไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนและหมู่แอมีนของไคโตซานซึ่งจะทำให้เกิดพันธะแอมไนด์ขึ้น โครงสร้างไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิคฟูเรียร์ทรานสฟอร์มอินฟราเรดสเปกโทรสโกปี และโปรตอนนิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์สเปกโทรสโกปี ส่วนผลการตรวจสอบด้วยเทคนิคเทอร์โมกราวิเมตริกและเอกซเรย์ดิฟแฟรกชันยืนยันว่าสายโซ่โมเลกุลของไคโตซานมีหมู่เกาะของแคตไอออนิกไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนรวมอยู่ด้วย

ไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไอออนิกไฮเพอร์บรานซ์พอลิแอมิโดแอมีนในปริมาณที่มากเกินไปจะสามารถละลายน้ำได้ในสภาวะที่เป็นกลาง และมีสมบัติการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ดีเยี่ยม นอกจากนี้

ผ้าที่ผ่านการตกแต่งสำเร็จด้วยไคโตซานที่ดัดแปรด้วยแคตไอออนิกไฮเพอร์branchพอลิเอมีโดเอมีนยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีอีกด้วย

## 2.9 เอกสารอ้างอิง

- Chen, C. Z., Beck-Tan, N. C., Dhurjati, P., Dyk, T. K., LaRossa, R. A., & Cooper, S. L. (2000). Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: Structure–activity studies. *Biomacromolecules*, 1, 473–480.
- Kean, T., Roth, S., & Thanou, M. (2005). Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 103, 643–653.
- Kim, T. H., Jiang, H. L., Jere, D., Park, I. K., Cho, M. H., Hah, J. W., et al. (2007). Chemical modification of chitosan as gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science*, 32, 726–753.
- Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water soluble chitosan derivative with a fiber reactive group. *Carbohydrate Research*, 339, 313–319.
- Majoros, I. J., Williams, C. R., & Baker, J. R. (2008). Current dendrimer applications in cancer diagnosis and therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 1165–1179.
- Marty, J. D., Martinez-Aripe, E., Mingotaud, A. F., & Mingotaud, C. (2008). Hyperbranched polyamidoamine as stabilizer for catalytically active nanoparticles in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326, 51–54.
- Punyacharoennon, P., & Srikulkit, K. (2008). Preparation of hyperbranched polyamidoamine polymer ultrafine silica hybrid composite. *Journal of Applied Polymer Science*, 109, 3230–3237.
- SayedSweet, Y., Hedstrand, D. M., Spider, R., & Tomalia, D. A. (1997). Hydrophobically modified poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: Their properties at the air–water

interface and use as nanoscopic container molecules. *Journal of Material Chemistry*, 7, 1199–1205.

Srisuk, S., & Srikulkit, K. (2008). Properties evaluation of sodium nitrite treated chitosan-cotton fabric. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 18, 41–45.

Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, D. R., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., et al. (1985). A new class of polymers: Starburst dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, 17, 117–132.

Tsubokawa, N., & Takayama, T. (2000). Surface modification of chitosan powder by grafting of 'dendrimer like' hyperbranched polymer onto the surface. *Reactive & Functional Polymers*, 43, 341–350.

Vogle, F., Gestermann, S., Hesse, R., Schwierz, H., & Windisch, B. (2000). Functional dendrimers. *Progress in Polymer Science*, 25, 987–1041.



# Chemical modification of chitosan with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine and its antimicrobial activity on cotton fabric

Benjamas Klaykrueyat<sup>a</sup>, Krisana Siralermukul<sup>b</sup>, Kawee Srikulkit<sup>a,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>b</sup> Metallurgy and Materials Science Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

<sup>c</sup> National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals and Advanced Materials, Bangkok 10330, Thailand

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 25 September 2009

Received in revised form 4 November 2009

Accepted 9 November 2009

Available online 13 November 2009

### Keywords:

Cationic hyperbranched polyamidoamine

Modification of chitosan

Antimicrobial activity

*S. aureus*

Cotton fabric

## ABSTRACT

The cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine (PAMAM) containing terminal methyl ester end groups was synthesized and then employed for modifying flake chitosan. The synthesis was achieved using repetitive reactions between Michael addition and amidation to obtain the methyl ester group terminated hyperbranched PAMAM, and then the methyl ester terminated hyperbranched dendritic PAMAM (PAMAM-ester) was methylated with dimethyl sulphate. The subsequent modification of chitosan with the cationic hyperbranched PAMAM-ester was carried out at room temperature for 5 days. As a result, cationic hyperbranched PAMAM modified chitosan was achieved. Characterizations by elemental analysis, FT-IR, NMR, TGA and XRD were employed to investigate the structural changes of chitosan to confirm its configuration. The cationic hyperbranched PAMAM-chitosan was applied onto cotton fabric at 1 wt.% add-on using a padding method and was found to have a good antimicrobial performance against *Staphylococcus aureus* compared to that obtained with unmodified chitosan.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Chitosan, a deacetylated derivative of chitin, is a natural, low-toxic, biodegradable polymer that is resistant to microbial growth. The antimicrobial activity of chitosan is well known and involves the polycationic nature of chitosan which is capable of binding with anionic sites in microbe's proteins. However, its cationic nature is governed by pH, only being the case at acidic conditions (<pH 6) and this limits the range or performance of chitosan application. In addition, the chitosan-mediated inhibition of bacterial and fungal growth depends on the molecular weight and functional groups of chitosan. When compared to high Mw chitosan, oligomeric chitosan can penetrate the cell membrane of a microorganism and prevent the growth of the cell by inhibiting RNA transcription. From an applicability point of view, as well as its antimicrobial capability, chitosan's limited solubility in water to within the acidic range only is important and limiting. To overcome this, chitosan derivatives that are soluble in water over a wide pH range have been prepared by introducing a quaternary ammonium group or a polymeric quaternary ammonium moiety into chitosan side chain. Chemical modifications of chitosan by these means have

been used to produce chitosan derivatives, such as *N*-[(2-hydroxy-3-trimethylammonium)propyl]chitosan chloride, which exhibits an enhanced antimicrobial activity (Lim & Hudson, 2004), or polyethyleneimine grafted chitosan (Kim et al., 2007) and trimethylated chitosan (Kean, Roth, & Thanou, 2005) which show an improved transfection efficiency. Recently, hyperbranched polyamidoamine (PAMAM), a dendrimer analogue that is a starburst polymer with a plurality of terminal functional groups, has attracted considerable interest due to its novel functionalities, such as nanoscopic containers (SayedSweet, Hedstrand, Spider, & Tomalia, 1997), gene therapy (Majoros, Williams, & Baker, 2008) and ultrafine colloid stabilizer (Marty, Martinez-Aripe, Mingotaud, & Mingotaud, 2008). Modification of terminal groups with different functionalities, such as acetamid, hydroxyl, carboxyl or quaternary ammonium, further leads to the versatile applicability of these materials (Vogtle, Gestermann, Hesse, Schwierz, & Windisch, 2000). For example, quaternized PAMAM dendrimers have a potent antimicrobial activity (Chen et al., 2000). In another aspect, 'dendrimer-like' hyperbranched polyamidoamine can be incorporated into silica (Punyacharoenon & Srikulkit, 2008) or chitosan powder surface (Tsubokawa & Takayama, 2000), resulting in hybrid materials with versatile functionalities.

In this work, the grafting of cationic hyperbranched dendritic PAMAM onto chitosan was investigated with the aim to prepare a modified chitosan with a good water solubility and high antimicrobial activity over a wide pH range. Firstly, hyperbranched

\* Corresponding author. Address: Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel.: +66 22185543; fax: +66 22185561.

E-mail addresses: [kawee@sc.chula.ac.th](mailto:kawee@sc.chula.ac.th), [kawee.s@chula.ac.th](mailto:kawee.s@chula.ac.th) (K. Srikulkit).

dendritic PAMAM was synthesized according to Tomalia's well-known method by repetitive reactions between Michael addition and amidation (Tomalia et al., 1985). In this study, synthesis of hyperbranched dendritic PAMAM up to generation 2.5 was targeted. Quaternization of the methyl ester terminated hyperbranched dendritic PAMAM was then carried out by methylation with dimethyl sulphate leading to the production of a cationic hyperbranched dendritic PAMAM-ester, which was employed for modifying flake chitosan. The putative structure of cationic hyperbranched PAMAM-chitosan was proposed as shown in Fig. 1. Characterizations, including elemental analysis, FT-IR,  $^1\text{H}$  NMR, XRD and TGA were employed to investigate the change in the chitosan structure and its properties. The cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan was applied onto cotton fabric and its antimicrobial efficiency was preliminarily evaluated against *Staphylococcus aureus* as films and on cotton fabric to compare with that for chitosan.

## 2. Experimental

### 2.1. Materials

Commercial-grade chitosan flake (approx. 85% degree of deacetylation) with a molecular weight of about  $10^6$  Da was purchased from Ebase Co., Ltd. ethylene diamine (EDA) and methyl acrylate (MA) were purchased from Fluka (Switzerland). Commercial-grade methanol was purchased from TSL Chemical (Thailand) Co., Ltd. and distilled prior to use. Dimethyl sulphate (commercial grade) was kindly provided by Modern Dyestuff & Pigment Co., Ltd., (Thailand). Glacial acetic acid was purchased from Merck Chemicals Ltd. Bleached plain woven cotton fabric ( $120\text{ g/m}^2$ ) was purchased from Bigger Text Co., Ltd, Thailand, and used as received.

### 2.2. Synthesis of hyperbranched dendritic PAMAM

The Michael addition step was carried out as follows: a solution of EDA (50 g, 0.833 mol) in methanol (200 ml) was added dropwise to a stirred solution of MA (350 g, 4.069 mol) in methanol (200 ml) at  $0^\circ\text{C}$  over a period of 2 h. The mixture temperature was then

allowed to rise to room temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) and the mixture was continuously stirred for 48 h. The solvent and excess MA were then removed using a rotary evaporator under reduced pressure at  $50^\circ\text{C}$  leaving the methyl ester terminated hyperbranched PAMAM (G0.5).

The amidation step was conducted as follows: a solution of first round Michael addition (G0.5) hyperbranched PAMAM (100 g) in methanol (100 ml) was carefully added to a vigorously stirred solution of EDA (60 g, 1 mol or four times higher than that of the methyl ester content) in methanol (300 ml) at  $0^\circ\text{C}$ . The rate of addition was carefully controlled to assure that the temperature did not rise over room temperature. After completion of EDA addition, the mixture was stirred for 72 h at room temperature. The solvent and unreacted EDA were removed under reduced pressure at a temperature of not higher than  $50^\circ\text{C}$ . The excess EDA was removed to completion (indicated by the absence of EDA vapour detected by pH test paper) at azeotropic temperature using a 9:1 (v/v) ratio of toluene to methanol to yield G1.0 hyperbranched PAMAM.

The second round synthesis was then repeated as above, except that a two times higher concentration of MA was used than that in the first round synthesis, to yield the G1.5 and G2.0 products, and then again to yield the G2.5 hyperbranched PAMAM product.

### 2.3. Methylation of methyl ester terminated hyperbranched dendritic polyamidoamine (PAMAM-ester)

To a solution of G2.5 hyperbranched PAMAM-ester (20 g, 0.007 mol) in methanol (200 ml) with pH value of 9.5–10, 13 g (0.1 mol) of dimethyl sulphate was slowly added. The methylation reaction proceeded immediately at room temperature. The otherwise gradual decrease in the pH was controlled by the addition of concentrated sodium hydroxide solution in order to drive the reaction forward. The pH value of the mixture was maintained at 7.0. The mixture temperature was controlled at room temperature ( $\sim 25^\circ\text{C}$ ) and continuously stirred. After completion of the dimethyl sulphate addition, the mixture was stirred for an additional 30 min to yield the resultant cationic hyperbranched PAMAM-es-

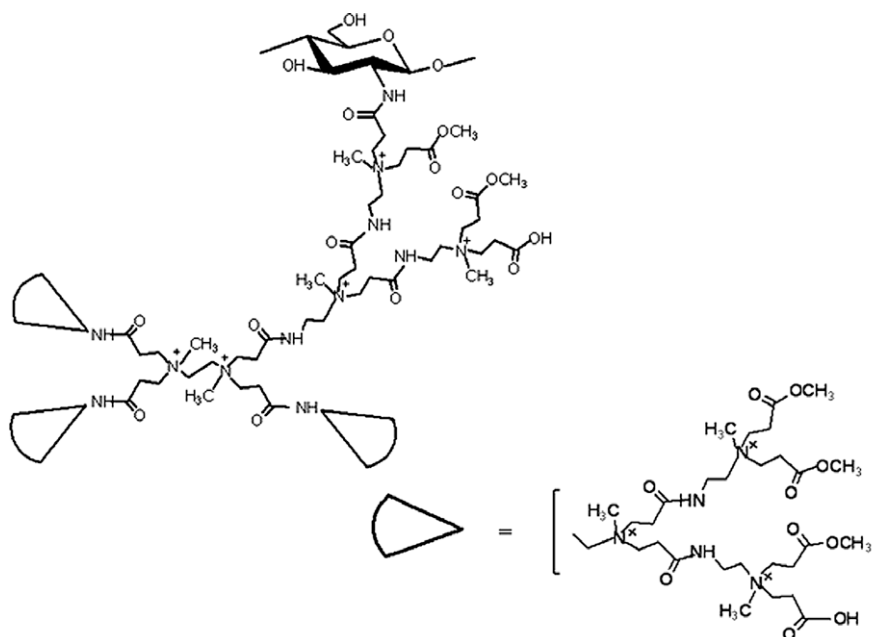


Fig. 1. The putative structure of the G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-chitosan.

ter, which was subsequently employed in the next step without purification.

#### 2.4. Modification of chitosan with cationic hyperbranched dendritic polyamidoamine-ester

The modification of chitosan with varying amounts of cationic hyperbranched PAMAM-ester was carried out as follows: a mixture of 5 g chitosan and one of three amounts of G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-ester (10%, 50% (w/w) based on chitosan and a five times higher amount of chitosan, the latter represented the excess amount (25 g of liquid cationic PAMAM) in which 5 g chitosan powder was directly dispersed) were dissolved in 50 ml of 1% (v/v) acetic acid solution and stirred by a magnetic stirrer at about 700 rpm until the dissolution was complete (in case of 10 wt.% and 50 wt.%). The solution's pH was then carefully adjusted to pH 7.5 using dilute NaOH solution. The resultant slurry mixture was continuously stirred at room temperature for 5 days to achieve the reaction between the free amine group of chitosan and the methyl ester group of the PAMAM-methyl ester. In the cases of the addition of 10% and 50% (w/w) PAMAM, the solid suspension obtained was filtered and the filtrate then washed thoroughly with distilled water. The obtained wet cake was kept in a desiccator prior to characterization. In the case of excess PAMAM, the obtained viscous liquid was first precipitated in methanol prior to filtration and then washing as above. These three PAMAM-chitosan conjugates are referred to simply as 10%, 50% and excess PAMAM-chitosan from hereon.

#### 2.5. Antimicrobial activity of chitosan and cationic hyperbranched pamam-chitosan applied onto cotton fabric or as films

Chitosan coating solutions (10 g/l) in 1% (w/v) aqueous acetic acid and G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-chitosan aqueous solutions (10 g/l and 40 g/l) were prepared. In this study, only the excessively modified (i.e. derived from synthesis with an excess PAMAM) cationic hyperbranched PAMAM-chitosan was selected. For film casting, the prepared solutions were poured into a petri dish and allowed to dry freely at room temperature. Cotton fabrics (8.5 g, size 25 × 28 cm) were padded with prepared chitosan solutions using a Labtec padding machine to provide 100% wet pick up (resulting in 1% wt.% add-on onto the fabric in case of 10 g/l concentration). The padded samples were dried at 100 °C for 10 min and then cured at 150 °C for 3 min in a Rapid laboratory stenter to fix the chitosan or cationic hyperbranched PAMAM-chitosan onto the cotton fibers. The chitosan-fabric was then further treated with 20 g/l aqueous sodium nitrite (NaNO<sub>2</sub>) at room temperature for 30 min in order to achieve a low Mw chitosan-fabric. This experiment was aimed at comparing antimicrobial activity between high Mw chitosan and low Mw chitosan. The treated fabrics were washed thoroughly in de-ionized water and dried prior to antimicrobial activity evaluation. In case of fabric treated 4 wt.% cationic hyperbranched PAMAM-chitosan, the treated fabric was evaluated for wash fastness property according to AATCC Test Method No. 61–2001. The test was performed using a laundering machine (Gyrowash) at 40 °C for 30 min. The fabric surface characteristics were analyzed using SEM and ATR/FT-IR techniques.

##### 2.5.1. Antimicrobial activity of cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan as films

The antimicrobial activity of chitosan and cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan film were evaluated by quantitative method. The test was carried out to against *S. aureus* (American Type Culture Collection No. 6538). The microbial reduction was calculated according to the following equation,

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{B - A}{B} * 100,$$

where *A* and *B* are the number of bacteria (CFU/ml) from the inoculated treated test samples and blank in the flask incubated for 24 h contact time.

##### 2.5.2. Antimicrobial activity of treated cotton fabrics

The antimicrobial activity of treated cotton fabrics were evaluated by quantitative method according to AATCC Test Method 100–1999 (Antibacterial Finishes on Textile Material). The test was carried out to against *S. aureus* (American Type Culture Collection No. 6538). The microbial reduction was calculated according to the following equation,

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{B - A}{B} * 100,$$

where *A* and *B* are the number of bacteria from the inoculated treated test samples in the flask incubated for 24 h contact time and 0 h contact time (immediately after inoculation). Visual detection was recorded at 0 and 24 h contact time using a digital camera.

#### 2.6. Characterizations

CHN analysis was performed on PerkinElmer 2400 series II CHNS/O Analyzer. The infrared (FT-IR) spectra were recorded at the frequency range of 4000–400 cm<sup>−1</sup> with 64 consecutive scans at a 4 cm<sup>−1</sup> resolution on a Nicolet 6700 FT-IR spectrometer. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) spectra were recorded on Bruker DPX-300 spectrometer. Test samples of hyperbranched PAMAM and cationic hyperbranched PAMAM-esters were dissolved in D<sub>2</sub>O, while cationic hyperbranched PAMAM-chitosan was first dissolved in CD<sub>3</sub>COOD prior to <sup>1</sup>H NMR measurement. X-ray diffraction (XRD) was performed using a PW 3710 Philips diffractometer with CuKα radiation (λ = 0.1542 nm) and operated at 40 kV and 30 mA. Thermal gravimetric analysis (TGA) was carried out using a Mettler Toledo Stare System DCS822e Module. The results were acquired with a heating rate of 10 °C/min from 30 to 900 °C under nitrogen gas at constant flow rate of 20 ml/min. The fabric surface characterizations were examined by a scanning electron microscope JEOL Model JSM-5410LV and ATR/FT-IR (Nicolet 6700 FT-IR spectrometer).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Elemental analysis

The results from elemental CHN analysis of the chitosan and 4 modified chitosans (Table 1) revealed that the relative amounts of C and N in the chitosan powder are 40.20 and 7.42 mass%, respectively. The %C and %N found in cationic hyperbranched PAMAM-chitosan are notably lower than chitosan powder whilst the %H of the modified chitosan is found slightly different to that of native chitosan. According to the general appearance, the cationic hyperbranched PAMAM-chitosan is moisture sensitive,

**Table 1**  
Relative composition (as % by weight) of hydrogen (H), carbon (C) and nitrogen (N) in chitosan (CTS) and the three PAMAM-chitosan derivatives.

Sample	%C	%H	%N
Chitosan (CTS)	40.20	7.25	7.42
10 wt.% PAMAM-CTS	37.55	7.06	7.03
50 wt.% PAMAM-CTS	19.77	8.04	3.21
Excessive PAMAM-CTS	33.07	7.12	6.10



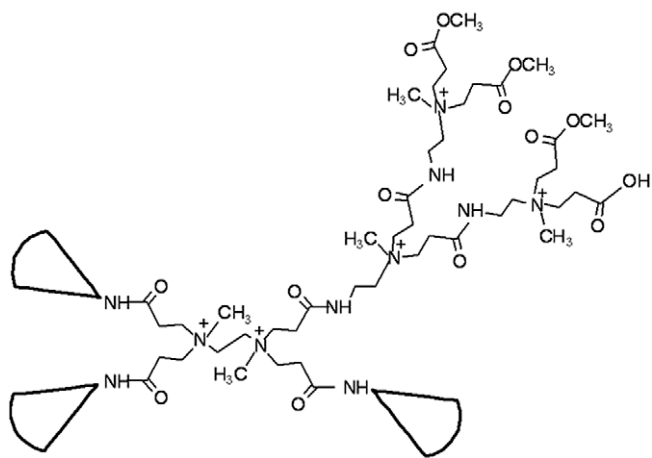


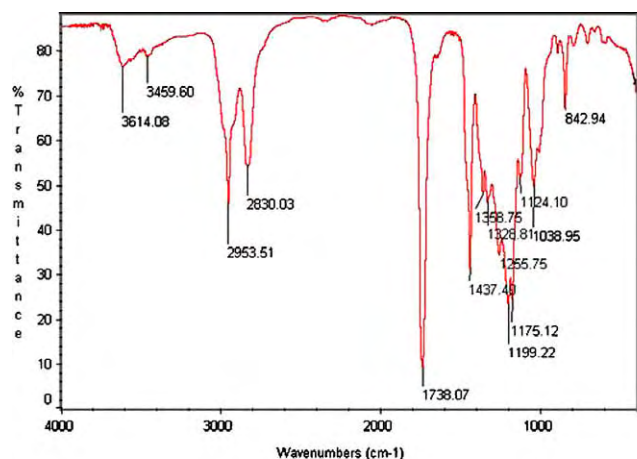
Fig. 2. The putative structure of G2.5 cationic hyperbranched PAMAM.

resulting in existing in wet cake form. This phenomenon is arising from the presence of bound water due to its moisture sensitivity. In case of chitosan modified with an excess amount of cationic hyperbranched PAMAM, the obtained cationic hyperbranched PAMAM-chitosan is water soluble at neutral pH due to the loosely packed

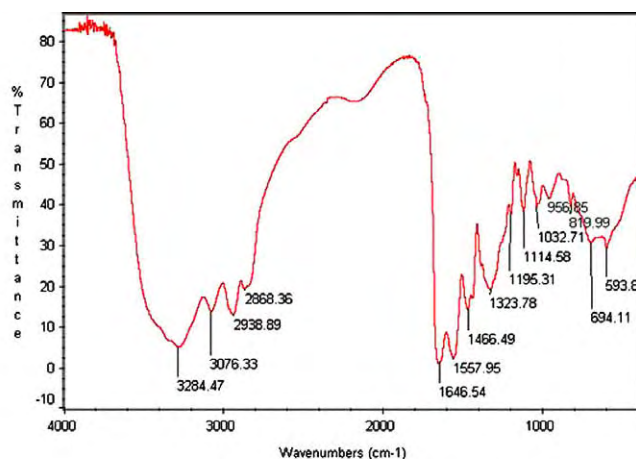
structure and the absence of crosslink. As a matter of fact, the presence of H and O from moisture is associated to the decrease in %C and %N. It was also likely that during the course of methylation reaction the methyl ester terminal groups of the cationic hyperbranched PAMAM could be partially hydrolyzed and converted into the carboxylic acid end groups ( $-\text{COOH}$ ) as proposed in Fig. 2. As a consequence, the decrease in %C and %N were partly associated with the additional OH group content.

### 3.2. FT-IR analysis

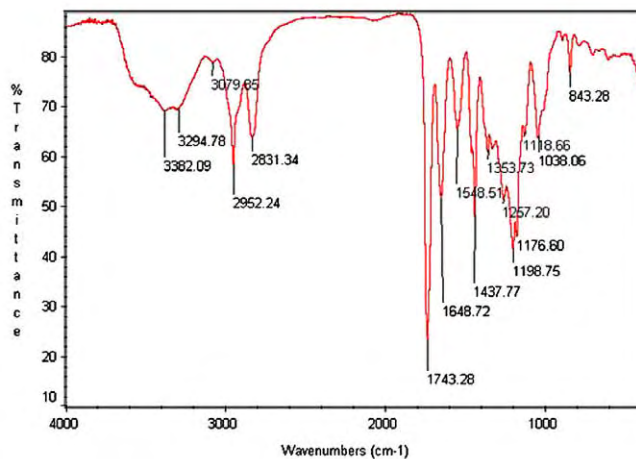
The hyperbranched PAMAM polymers obtained from repeating the (i) Michael addition (G0.5, G1.5 and G2.5 products) and (ii) amidation (G1.0 and G2.0) reactions were characterized using FT-IR analysis. FT-IR results of G0.5, G1.5 products and G1.0 product are shown in Fig. 3. In Michael addition steps, a strong absorption band around  $1740\text{ cm}^{-1}$  is observed, attributed to the methyl ester group. This peak completely disappears in the spectrum of G1.0 as a result of the amidation reaction and the acquired terminal amine group corresponds to the appearance of the strong absorption intensity of the N–H band in the region of  $3000\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$ . Indeed, its absorption intensity increases strongly with increasing PAMAM generations, reflecting the fact that the number of terminal amine groups also significantly increases with increasing syn-



(a) G0.5



(b) G1.0



(c) G1.5

### FTIR spectra of hyperbranched PAMAM

Fig. 3. FT-IR spectra of the three different hyperbranched PAMAM from the sequential generations of Michael addition (G0.5) – amidation (G1.0) – Michael addition (G1.5).



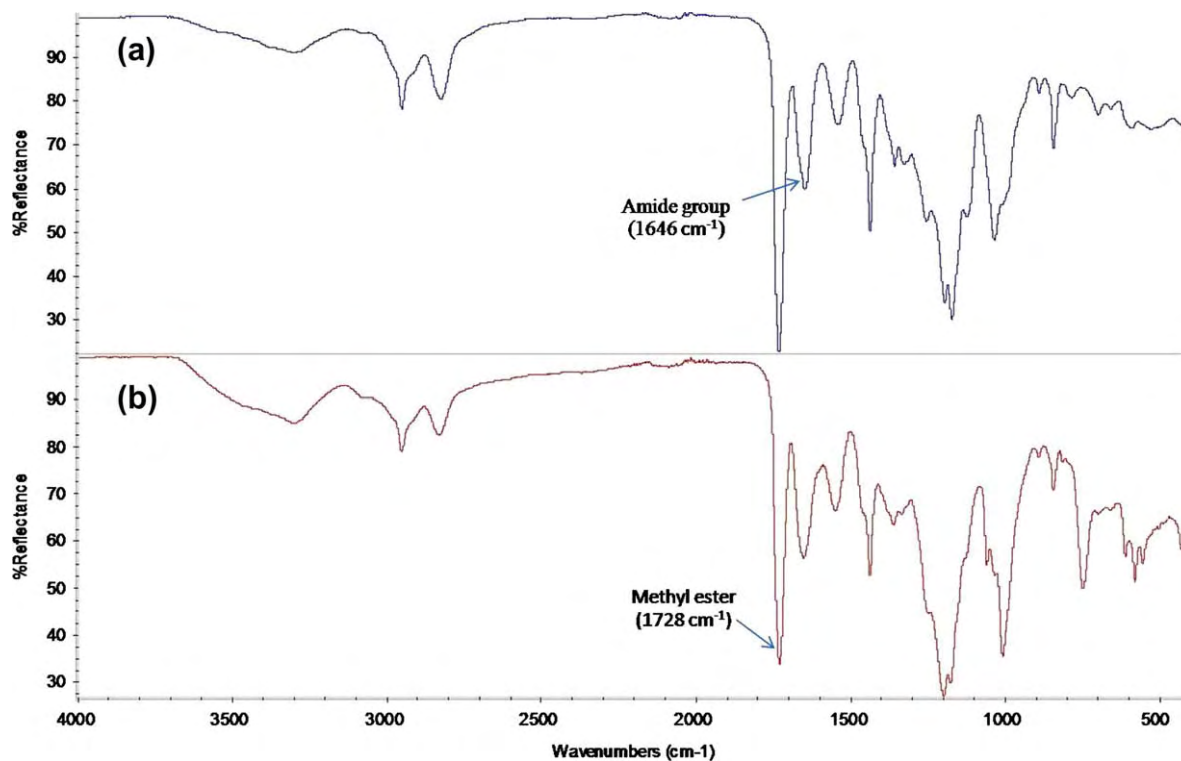


Fig. 4. FT-IR spectra of (a) the G2.5 hyperbranched PAMAM and (b) the G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-ester.

thesis rounds. It should be noted that the intensity of amine groups in the spectrum of the G1.5 hyperbranched PAMAM significantly decreases as a result of the Michael addition which converted the amine group of G1.0 PAMAM to a terminal methyl ester group. The FT-IR spectrum for G2.0 is not presented which was found in

similar manner to that shown in the previous report (Punyacharoennon & Srikulkit, 2008).

The FT-IR spectrum of the G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-ester is similar to that of the G2.5 hyperbranched PAMAM-ester (Fig. 4). The intensity of the C=O ester vibration

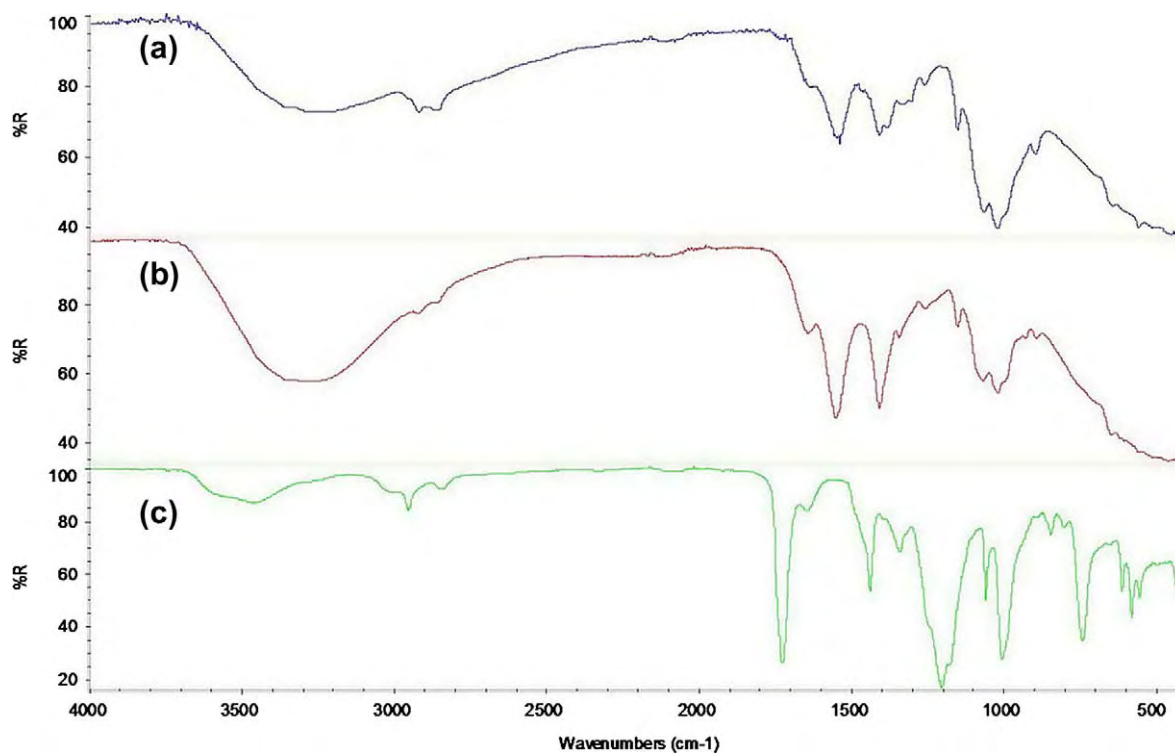


Fig. 5. FT-IR spectra of (a) chitosan; (b) 50 wt.% hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan and (c) excessive cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan.

(1728  $\text{cm}^{-1}$ ) peak of the cationic hyperbranched PAMAM is slightly less than that of the hyperbranched PAMAM-ester, indicating that a partial loss of some of the  $\text{C}=\text{O}$  ester groups occurs in the methylation step. It is likely that some of the  $\text{C}=\text{O}$  ester groups were hydrolyzed and converted into  $\text{COOH}$  groups. Indeed, the FT-IR results provide supportive evidence along with the EA analysis to underline that during the quaternization step and the modification of chitosan, the methyl ester group of the cationic hyperbranched PAMAM underwent competitive hydrolysis.

The FT-IR spectrum of the 50% (w/w) cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan exhibits an absorption fingerprint that is largely similar to that of native chitosan (Fig. 5), as expected due to their similarity in chemical structure. Despite the spectral similarity, the differences in the intensity between the weaker chitosan amide band and the much stronger PAMAM-chitosan amide band at 1646  $\text{cm}^{-1}$  is noticeable, indicating that the PAMAM-chitosan has a higher content of amide groups than unmodified chitosan. The spectrum derived from the excess PAMAM-chitosan also shows broadly similar trends as the above, but with a strong peak at  $\sim 1720 \text{ cm}^{-1}$  representing methyl ester pendant group. This increase in the amide band intensity arose from the reaction between the chitosan amine group and the PAMAM-methyl ester group, yielding an amide linkage. The presence of methyl ester pendant group in the excess PAMAM-chitosan thanks to the usage of excessive amount of cationic hyperbranched PAMAM could act as a reactive group in the application point of view. Based on these evidences, the putative structure of the G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-chitosan, formed with an excess amount of cationic hyperbranched PAMAM, is proposed as shown in Fig. 1.

### 3.3. $^1\text{H}$ NMR analysis

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the G0.5 ester terminated PAMAM indicates the presence of the terminal methyl ester group ( $\text{CH}_3\text{—O—}$ ) at  $\sim 3.8$  ppm (Fig. 6), corresponding to the methyl proton of the methyl ester group. In this spectrum, the amide proton signal is absent, indicating that the reaction of EDA with the methyl ester end group could be prevented due to the presence of the excessive amount of methanol, a suppressor of amidation reactions. The methyl ester signal completely disappears from the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of G1.0 due to the amidation reaction which resulted in the replacement of the methyl ester group by ethylene diamine. As a result, the amide bond was formed, as confirmed by the appearance of the signal of amide proton at around 7.8 ppm. Thus the synthesis of methyl ester terminated G2.5 hyperbranched PAMAM was achieved, and so was next employed for the preparation of cationic hyperbranched PAMAM-ester.

The  $^1\text{H}$  NMR spectrum of the G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-ester reveals the strong presence of the signal associated with the terminal methyl ester group ( $\text{CH}_3\text{—O—C=O}$ ) at  $\sim 3.8$  ppm (Fig. 7), indicating that it was intact during the methylation step. Following the methylation reaction, the methyl group ( $\text{CH}_3\text{—}$ ) was anticipated to be incorporated into the tertiary amine, resulting in a quaternary ammonium moiety being introduced into the hyperbranched PAMAM-ester, as diagrammatically shown in Fig. 2. The signal for the methyl proton should appear at around 3 ppm in vicinity of methylene proton, and, as seen in Fig. 7, it is likely that the strong signal appearing at 3.1 ppm arises from signal overlapping between the methyl and methylene protons.

The  $^1\text{H}$  NMR spectra of chitosan and cationic hyperbranched PAMAM-chitosan reveal the characteristic chemical shifts of chitosan protons at 3.4, 3.2 and 2.6 ppm (Fig. 8), which are assigned to H3–H6 and H2, respectively. For the cationic hyperbranched PAMAM-chitosan, two peak regions were observed between 2.2 and 3.6 ppm, featuring the combination of signals of chitosan protons and hyperbranched PAMAM protons. The

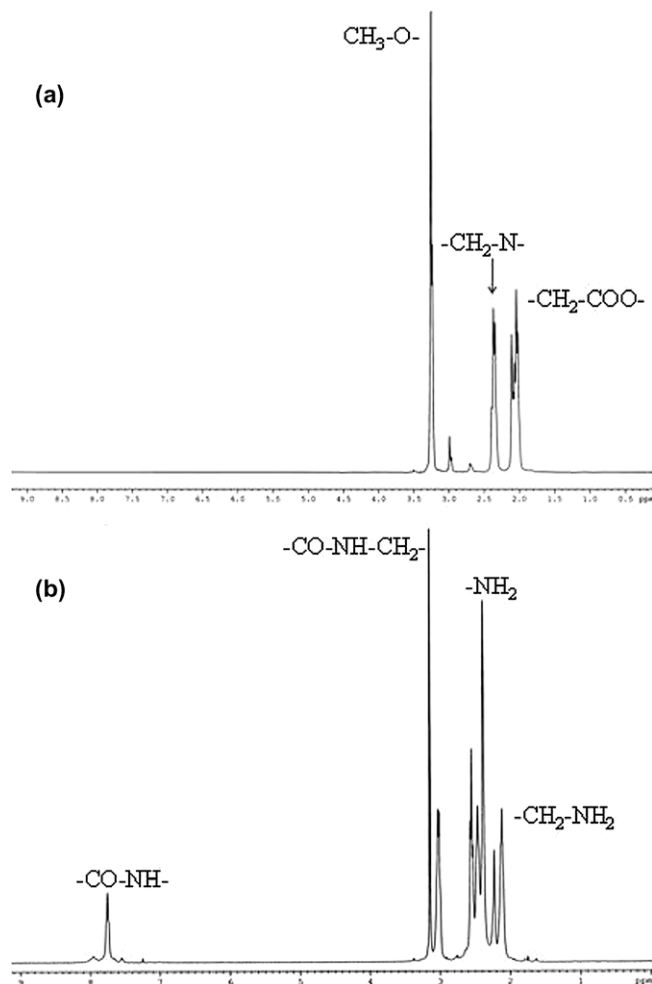


Fig. 6.  $^1\text{H}$  NMR spectra of G0.5 hyperbranched PAMAM (top) and G1.0 hyperbranched PAMAM-ester (bottom).

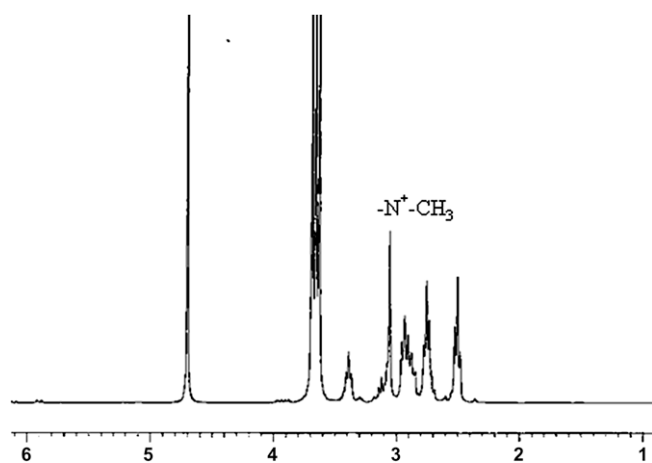


Fig. 7.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-ester.

signal at 3.1 ppm shows up strongly, presumably due to being the combination of chitosan and PAMAM protons. The signal of the methyl ester proton at 3.8 ppm totally disappears from the spectra of cationic hyperbranched PAMAM-chitosan, indicating that this group easily underwent reactions including, in this system, amidation with chitosan free amine group and hydrolysis (a side reaction).

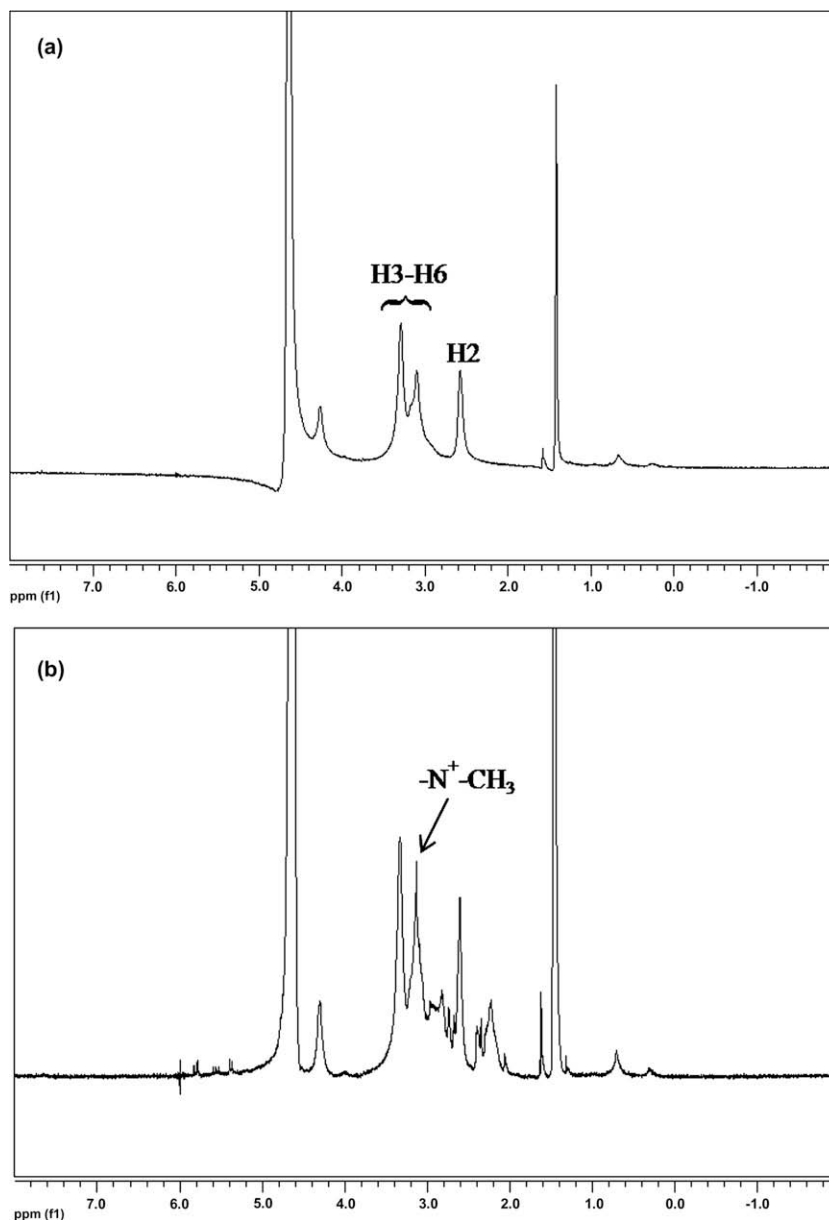


Fig. 8.  $^1\text{H}$  NMR spectra of chitosan and 2.5 cationic hyperbranched PAMAM-chitosan.

#### 3.4. TGA analysis of cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan

The TGA thermograms of chitosan, cationic hyperbranched PAMAM and cationic hyperbranched PAMAM-chitosans show that chitosan starts to decompose at temperatures above  $200^\circ\text{C}$  with a decomposition peak temperature ( $T_d$ ) of  $307^\circ\text{C}$  (Fig. 9). In contrast, the cationic hyperbranched PAMAM decomposes more easily at  $120^\circ\text{C}$  with  $T_d$  values of  $189$  and  $298^\circ\text{C}$ . For the cationic hyperbranched PAMAM-chitosan, the mass loss occurs in multiple steps within the temperature range of  $100$ – $300^\circ\text{C}$ . Upon initial heating, the gradual loss of mass proceeded with a  $T_d$  of  $126^\circ\text{C}$ , which is probably due to the loss of bound water followed by the degradation of the bonded cationic hyperbranched PAMAM moiety. Further heating resulted in the loss of the chitosan backbone with a decomposition peak temperature of  $287^\circ\text{C}$ . Thus, the  $T_d$  of cationic hyperbranched PAMAM-chitosan is lower when compared to pristine chitosan, indicating the lower thermal stability of the modified chitosan. Since the presence of the bulky cationic hyperbranched

PAMAM group interferes with the close packing between chitosan molecules, it leads to an increase in the polymer chain mobility and chain scission.

#### 3.5. X-ray diffraction (XRD)

The XRD diffractograms of film samples including free chitosan and the three different cationic hyperbranched PAMAM-chitosan films are shown in Fig. 10. The broad peak found in the region of  $2\theta = 15^\circ$  to  $30^\circ$  represents the semicrystalline characteristic of a typical chitosan film and indicates that the prepared film exhibits a low crystallinity. Chitosans modified with  $10$  wt.%,  $50$  wt.%, and excessive cationic hyperbranched PAMAM was also cast into film for XRD analysis. From Fig. 10, the modified films containing  $10$  wt.% and  $50$  wt.% cationic hyperbranched PAMAM exhibit a similar XRD pattern to those of free chitosan, but as the amount of cationic hyperbranched PAMAM was increased so the intensity of the  $2\theta = 15^\circ$  to  $30^\circ$  peak was reduced until, at excessive cationic hyperbranched PAMAM levels, the resultant modified film was

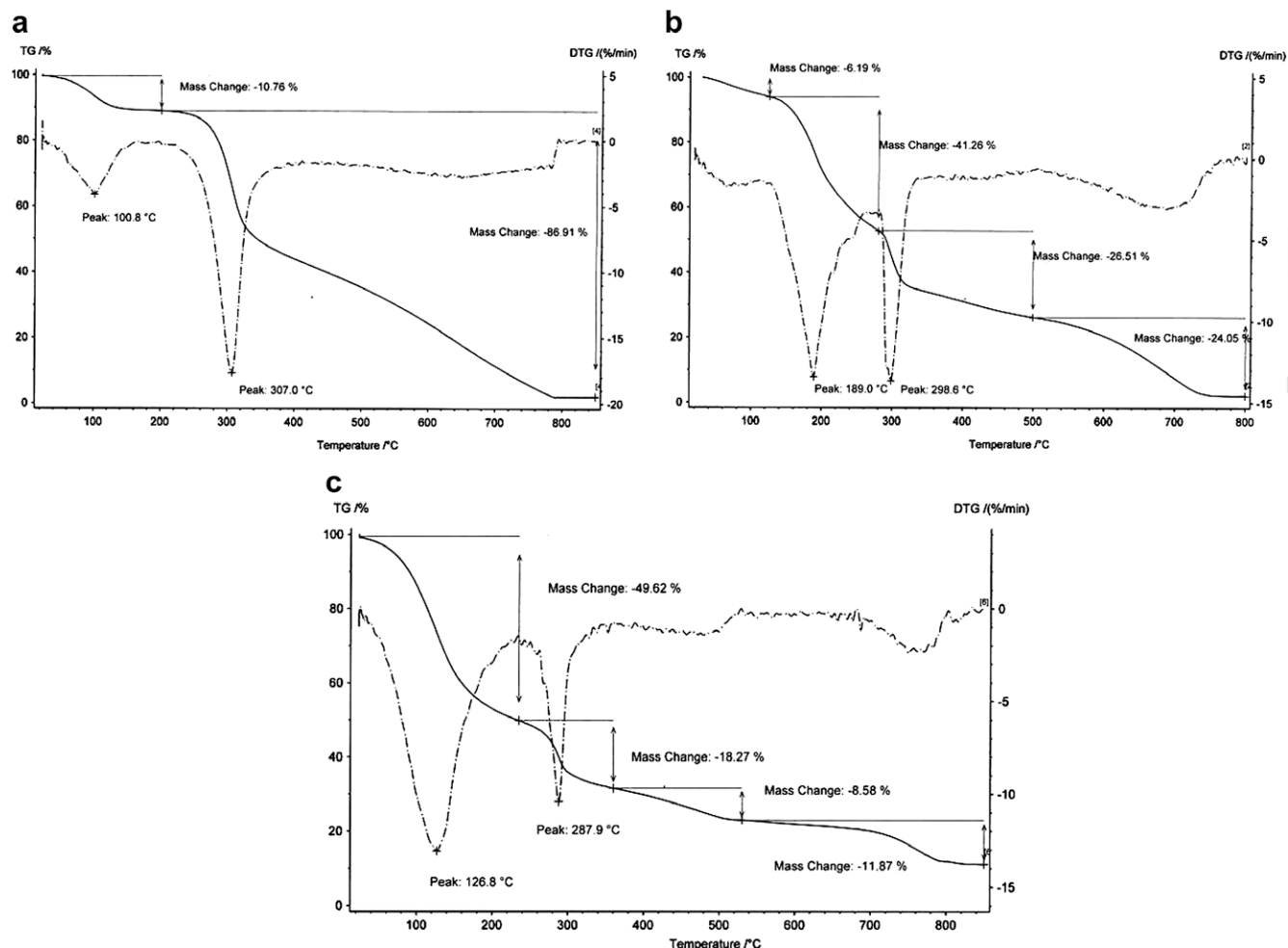


Fig. 9. TGA thermograms of (a) chitosan, (b) 2.5 cationic hyperbranched PAMAM and (c) 2.5 cationic hyperbranched PAMAM-chitosan.

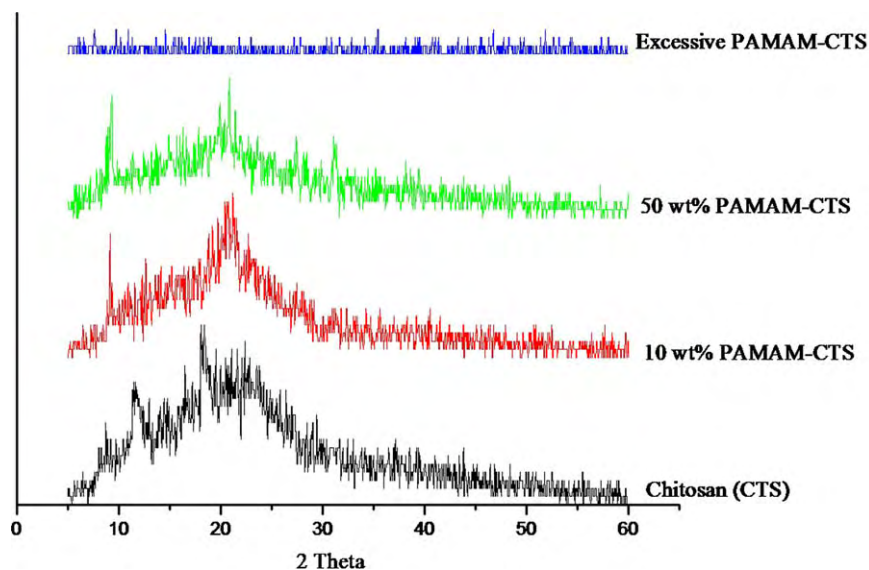


Fig. 10. XRD diffractograms of chitosan and the three different PAMAM-chitosan derivative film samples.

completely amorphous to X-ray diffraction. This phenomenon can be attributed to the fact that the increase in the bulk cationic hyperbranched PAMAM group in the chitosan leads to an increase

in the steric hindrance which directly interferes with the crystallization process of chitosan. As a consequence, the chitosan film containing excessive cationic hyperbranched PAMAM is amor-

phous, as evidenced by the total disappearance of the semicrystalline peak.

### 3.6. Antimicrobial evaluation

The antimicrobial activity of chitosan, and that of cationic hyperbranched PAMAM-chitosan (synthesized with an excess of PAMAM to chitosan), was preliminarily evaluated against *S. aureus* in terms of visual detection and percent microbial reduction using a single application dose (Table 2). A high percentage reduction of bacterial colony indicates a good antimicrobial activity of a sample.


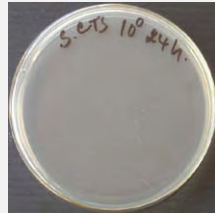
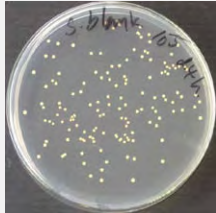

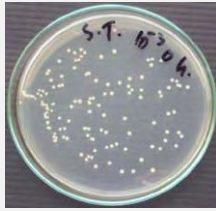





The cotton fabric was coated with flake chitosan (1 wt.% add-on) and then treated with 20 g/l  $\text{NaNO}_2$  for 30 min in order to obtain low Mw chitosan-coated fabric (Srisuk & Srikulkit, 2008). The chitosan-impregnated fabric and resultant low Mw chitosan-impregnated fabric both showed no antimicrobial activity. These indicate that chitosan itself was not sufficient to inhibit the growth of *S. aureus*. However, in a separate experiment, native chitosan film was prepared by film casting and subject to microbial activity test. The result shows that native chitosan film exhibited excellent

antimicrobial activity, which is in contrast to the observed results from chitosan-coated fabrics (Table 2). In this preliminary study any dose effects were not evaluated. It should also be pointed out that the chitosan film used in the antimicrobial test was not neutralized whereas that of the impregnated cotton was. Thus, the native chitosan film was likely to mainly be positively charged amine  $\text{NH}_3^+$  groups, resulting in their excellent antimicrobial activity against *S. aureus*. In contrast, the amino groups of the chitosan on the chitosan-fabric would mainly be present in an uncharged format as a result of the treatment process and, as a consequence, the chitosan-coated fabric exhibited a poor antimicrobial activity. It is true to say that chitosan by nature possesses a mild antimicrobial characteristic which is resistant to microbial growth but not powerful enough to play an antimicrobial role in cotton cellulose which contains plentiful nutrients for microbial growth.

The cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan film also exhibited a strong antimicrobial activity against *S. aureus*, which was comparable to that of the native chitosan film. Whether this is also due to its cationic character remains to be evaluated

**Table 2**

Antimicrobial evaluation of chitosan (CTS) and G2.5 cationic hyperbranched PAMAM-chitosan, either as films or after impregnation into cotton fabric, against *S. aureus*.

Sample	wt.% add-on (on fabric)	Visual detection (experimental Section 2.5)		%Reduction
		A	B	
CTS film without neutralization (0.33 g)	–			100
Cat. PAMAM-CTS film (0.25 g)	–			99.99
CTS-fabric	1			0
$\text{NaNO}_2$ depolymerized CTS-fabric	1			0
Cat. PAMAM-CTS-fabric	1			98.75



but, importantly, in contrast to chitosan, cotton fabric treated with cationic hyperbranched dendritic PAMAM-chitosan (1% (w/w)) exhibited excellent antimicrobial activity against *S. aureus*, albeit at a relatively lower level than pure chitosan and cationic PAMAM-chitosan. Thus cationic hyperbranched dendritic PAMAM could potentially enhance the antimicrobial performance of chitosan, and this may be attributable to its cationic character although both these interesting preliminary findings require further characterization and verification. That is, in this preliminary study the potential antimicrobial activity in treated cotton fabrics was only evaluated on one microbial species (*S. aureus*) and one fabric dose (1 wt.% add-on) without subsequent multiple washes. It thus remains essential to evaluate the dose dependence of this effect within the fabric, including its relative resistance to multiple wash cycles of the fabric, as well as the range of applicable microbes that are susceptible under these conditions before firm conclusions can be drawn.

### 3.7. Evaluations of fabric surface characteristics

The fastness property of the cationic chitosan on cotton fabric was evaluated using washing standard test. Fabric samples were subjected to repeated washings up to five cycles. The fiber surface morphology, when analyzed by SEM, was similar to native cellulose surface for 1 wt.% cationic chitosan-fabric and rough for 4 wt.% cationic chitosan-fabrics both before and after five washes (Fig. 11). In case of 1 wt.% cationic chitosan, the presence of chitosan is not observed by SEM analysis due to the low amount of chitosan. Taking the rough surface morphology to represent the presence of cationic chitosan on the fiber surface, the remaining rough surface after five wash cycles suggests the fastness property of cationic chitosan on the cotton surface. However, to confirm the actual existence of cationic chitosan, the same samples were also analyzed by ATR/FT-IR spectroscopy, with representative spectra shown in Fig. 12. It should be noted that the IR spectrum of 1 wt.% cationic chitosan-fabric exhibited a similar fingerprint to that of native fabric, again, due to an insufficient amount of cationic chitosan on fabric surface. The methyl ester band found at  $1728\text{ cm}^{-1}$  taken before thermal fixation in case of the 4 wt.% cationic chitosan treated fabric is indicative of the presence of the cationic chitosan on the fiber surface. This absorption band remained with a notable intensity after the fabric had been thermofixed at  $150^\circ\text{C}$ . In addition, the amide peak shows up clearly at  $1639\text{ cm}^{-1}$ . However, the ester band completely disappears after the fabric had been repeatedly washed for five cycles, indicating

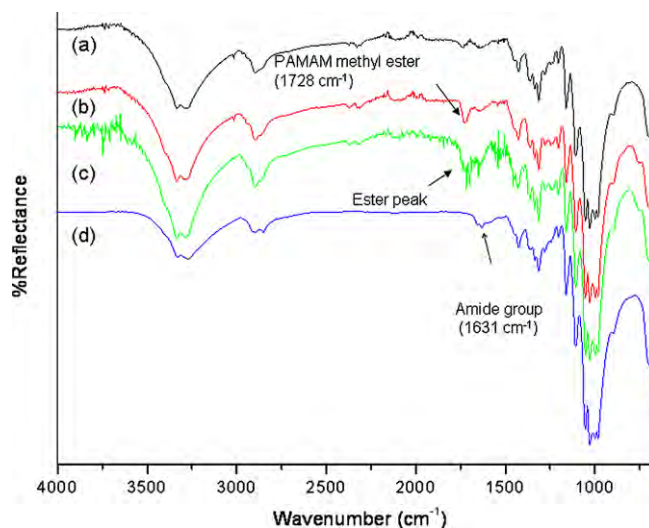


Fig. 12. ATR/FT-IR spectra of (a) cotton fabric, (b) 4 wt.% cationic chitosan cotton fabric before thermofixation, (c) 4 wt.% cationic chitosan cotton fabric after thermofixation, (d) 4 wt.% cationic chitosan cotton fabric after five wash cycles.

the weak hydrolytic stability of an ester bond. On the other hand, the amide bond still exists, indicating the durability of cationic chitosan. It is thought that the adhesion of cationic chitosan on the fabric surface is dependent on the cationic group of chitosan and hydrogen bonding between amide group and cellulose hydroxyl group.

### 4. Conclusions

The incorporation of cationic hyperbranched PAMAM into the chitosan backbone was carried out through a straightforward reaction of the PAMAM-methyl ester end group and the chitosan amine group. The amide linkage was formed, as evidenced by FT-IR analysis. Proton NMR results showed that cationic hyperbranched PAMAM-chitosan exhibited two signal regions that correspond to chitosan and hyperbranched PAMAM protons. Interestingly, chitosan modified with an excess amount of cationic hyperbranched PAMAM-ester remained both water soluble and with potential antimicrobial activity at a neutral pH, in contrast to native chitosan. TGA analysis supported that the cationic hyperbranched PAMAM-chitosan contained water bound and a bulky side group

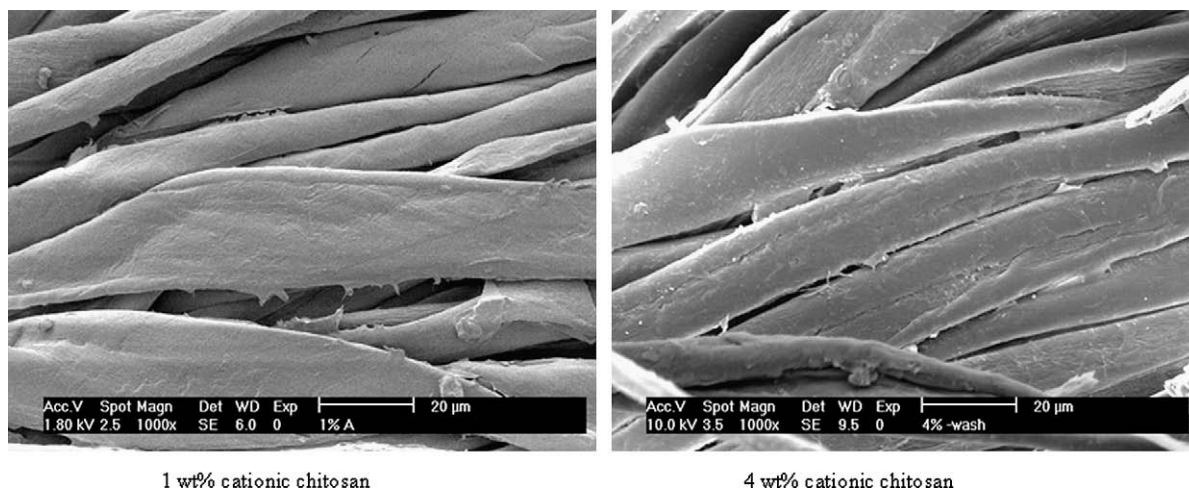


Fig. 11. SEM micrographs of 1 wt.% cationic chitosan cotton fabric and 4 wt.% cationic chitosan cotton fabric taken after five wash cycles.

that interfered with the packing of chitosan molecules. In addition, XRD analysis supported that cationic hyperbranched PAMAM-chitosan exhibited a completely amorphous film, again presumably due to the effects of the steric side group. Based on these results, it is concluded that the presence of the bulky side group enhanced the chain mobility and water solubility of the modified chitosan.

Chitosan modified with cationic hyperbranched PAMAM exhibited an excellent antimicrobial activity against *S. aureus* even at a near neutral pH and when impregnated into cotton fabrics and so potentially could enhance the antimicrobial activity of cotton fabric. It seems, therefore, to be of merit to characterize both the range of sensitive microbes and the dose effects in fabrics, including after multiple wash cycles, to evaluate any real benefit that this preliminary studies implies may exist.

### Acknowledgements

The authors thank Thailand Research Fund and the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) for financial support. In addition, Dr. Robert Butcher (PCU, Faculty of Science, Chulalongkorn University) for English corrections and suggestions.

### References

- Chen, C. Z., Beck-Tan, N. C., Dhurjati, P., Dyk, T. K., LaRossa, R. A., & Cooper, S. L. (2000). Quaternary ammonium functionalized poly(propylene imine) dendrimers as effective antimicrobials: Structure–activity studies. *Biomacromolecules*, 1, 473–480.
- Kean, T., Roth, S., & Thanou, M. (2005). Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: Cytotoxicity and transfection efficiency. *Journal of Controlled Release*, 103, 643–653.
- Kim, T. H., Jiang, H. L., Jere, D., Park, I. K., Cho, M. H., Hah, J. W., et al. (2007). Chemical modification of chitosan as gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science*, 32, 726–753.
- Lim, S. H., & Hudson, S. M. (2004). Synthesis and antimicrobial activity of a water soluble chitosan derivative with a fiber reactive group. *Carbohydrate Research*, 339, 313–319.
- Majoros, I. J., Williams, C. R., & Baker, J. R. (2008). Current dendrimer applications in cancer diagnosis and therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 8, 1165–1179.
- Marty, J. D., Martinez-Aripe, E., Mingotaud, A. F., & Mingotaud, C. (2008). Hyperbranched polyamidoamine as stabilizer for catalytically active nanoparticles in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 326, 51–54.
- Punyacharoenon, P., & Srikulkit, K. (2008). Preparation of hyperbranched polyamidoamine polymer ultrafine silica hybrid composite. *Journal of Applied Polymer Science*, 109, 3230–3237.
- SayedSweet, Y., Hedstrand, D. M., Spider, R., & Tomalia, D. A. (1997). Hydrophobically modified poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: Their properties at the air–water interface and use as nanoscopic container molecules. *Journal of Material Chemistry*, 7, 1199–1205.
- Srisuk, S., & Srikulkit, K. (2008). Properties evaluation of sodium nitrite treated chitosan-cotton fabric. *Journal of Metals, Materials and Minerals*, 18, 41–45.
- Tomalia, D. A., Baker, H., Dewald, D. R., Hall, M., Kallos, G., Martin, S., et al. (1985). A new class of polymers: Starburst dendritic macromolecules. *Polymer Journal*, 17, 117–132.
- Tsubokawa, N., & Takayama, T. (2000). Surface modification of chitosan powder by grafting of 'dendrimer like' hyperbranched polymer onto the surface. *Reactive & Functional Polymers*, 43, 341–350.
- Vogtle, F., Gestermann, S., Hesse, R., Schwierz, H., & Windisch, B. (2000). Functional dendrimers. *Progress in Polymer Science*, 25, 987–1041.

# Grafting and Phosphonic Acid Functionalization of Hyperbranched Polyamidoamine Polymer onto Ultrafine Silica

Phairat Punyacharoennon, Sireerat Charuchinda, Kawee Srikulkit

*Department of Materials Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Received 6 March 2008; accepted 9 June 2008

DOI 10.1002/app.28917

Published online 10 September 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

**ABSTRACT:** In this study, grafting of hyperbranched polyamidoamine (PAMAM) polymer onto ultrafine silica followed by functionalization via the introduction of phosphonic acid groups into the branch ends was performed. First, an initiating site was incorporated into the silica surface by reacting the silica silanol group with 3-aminopropyltriethoxysilane, producing amino-functionalized silica. The free amine group content was altered by varying the ratio of methanol to water in the hydrolysis step of the silanization reaction. Grafting of PAMAM was attained by three rounds of sequential Michael addition of silica amino groups to methyl acrylate and amidation of the resulting terminal methyl ester groups with ethylenediamine. Completion of the grafting reaction in each step was clearly confirmed using FTIR analysis. Excessive ethylenediamine and unattached hyperbranched PAMAM present in the

reaction product were removed by dialysis with a molecular weight cutoff of 6000–7000 Daltons. However, the amino group content determined in each step was found to be significantly lower than theoretically expected, perhaps indicative of side reactions and, in later stages, steric hindrance. The resultant hyperbranched PAMAM-grafted onto silica was functionalized by phosphorylation of the terminal amino groups by a Mannich type reaction, producing the phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica. Then its application on cotton fabric to produce fire-retardant cellulose was tentatively investigated. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *J Appl Polym Sci* 110: 3336–3347, 2008

**Key words:** hyperbranched PAMAM-grafted silica; phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica; phosphonated cellulose; flame retardancy

## INTRODUCTION

Polyamidoamine (PAMAM) dendrimers, the starburst polymers with a plurality of terminal functional groups, have recently attracted considerable interest because of their novel functionalities such as nanoscopic containers, delivery devices, ultrafine colloid stabilizers, and nanocomposite materials.<sup>1–8</sup> Surface modifications of terminal groups with different functionalities, such as acetamide, hydroxyl, carboxyl, or quaternized PAMAM dendrimers, have further increased the versatile applicability of these materials.<sup>9–13</sup> In the cases of carbon black and silica nanoparticles, which are promising fillers used in rubber and plastics, a good uniform dispersion of these extremely fine particles within the polymer matrix is important. However, these nanoparticles tend to form micron-sized aggregates with a resulting inferior performance when compared with those of the nanometer-sized form. This problem of a

strong tendency for nanoparticles to agglomerate is solved by surface modification, especially incorporation of repulsive-like charges.<sup>14–17</sup> The grafting of PAMAM polymer onto the inorganic particle's surface is one such possibility to effectively prevent agglomerate formation and results in the stability of ultrafine nanoparticles in the colloidal state or a high dispersibility within the polymer matrix.<sup>18–20</sup> Nanometer-sized particle fillers are expected to exhibit attractive interactions with the polymer matrix at very low filler content, resulting in an improved performance of nanocomposite materials. For example, nanomaterials can alter gas permeability, increase solvent resistance, and reduce flammability. Another interesting effect is that PAMAM attachment onto inorganic particles leads to hybrid materials with special characteristics such as high-performance chelating agents<sup>21</sup> and nanoreactors in which the metal nanoparticles are stabilized.<sup>22</sup> In this study, phosphorylated PAMAM-based silica nanoparticles were synthesized in an attempt to impart a significant flame-retardant performance on cotton cellulose. When considering flame retardants for cellulose and cellulose derivatives, phosphorus-based flame compounds have been of major interest because of their relatively environmentally friendly product status, their low toxicity, and their low evolution of smoke

Correspondence to: K. Srikulkit (kawee@sc.chula.ac.th).

Contract grant sponsor: National Research Council of Thailand, Thailand Research Fund.



in fire. Indeed, these compounds promote dehydration and char formation.<sup>23</sup> However, flame retardants for cellulose textiles such as phosphoric acid are water-soluble, causing a durability problem associated with washing.<sup>24</sup> The immobilization of these molecules in microcapsules could help to improve the washing resistance.<sup>25,26</sup> In this light, the attachment of phosphodendrimers to insoluble nanoparticles could be an interesting alternative method to decrease the solubility of water-soluble phosphorus-based flame retardants, and this was the focus of this study.

In this work, the synthesis and phosphorylation of hyperbranched PAMAM polymer-grafted silica nanoparticles was attempted to immobilize the water-soluble phosphorus-based flame retardant. First, amino groups were introduced onto the silica surface by reacting the silica silanol group with the amino-functional group of the organosilane 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES). Next, a grafting reaction and propagation of hyperbranched PAMAM from the silica surface was achieved by reiterative two-step reaction sequences: (a) an exhaustive alkylation of primary amine (Michael addition) with methyl acrylate (MA) and (b) amidation of the amplified ester groups in the presence of a large excess of ethylenediamine (EDA) to produce primary amine terminal groups.<sup>27</sup> Finally, further functionalization of the terminal amino groups of hyperbranched PAMAM-grafted silica to incorporate phosphonic acid groups was carried out with conversion of the terminal amine groups into phosphonic acid groups via a Mannich type reaction. Fixation of the obtained phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica onto cotton fabric was then performed for evaluation of any resultant flame-retardant effect using a 45° flame spread rate test and thermogravimetric analysis.

## EXPERIMENTAL

### Materials and reagents

Fumed silica (AEROSIL 200) with a surface area of 200 m<sup>2</sup>/g and an average particle size of 14 nm was purchased from JJ Degussa (Thailand). Methyl acrylate (MA, which was used without further purification), ethylenediamine (EDA), 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) were purchased from Fluka (Switzerland). Phosphorus acid and 40% (w/v) formaldehyde were purchased from Aldrich (Germany). Toluene and methanol purchased from local supplier were distilled before use. Dialysis membrane with the molecular weight cutoff of 6000–7000 Daltons was purchased from Membrane Filtration Products (Texas). Dicyandiamide and urea as a catalyst for the phosphonic acid-functionalized silica and

cellulose reaction was bought from Fluka (Switzerland). Knitted dyed industrial cotton fabric was obtained from a local textile dyeing factory.

### Incorporation of amino groups onto ultrafine silica particles

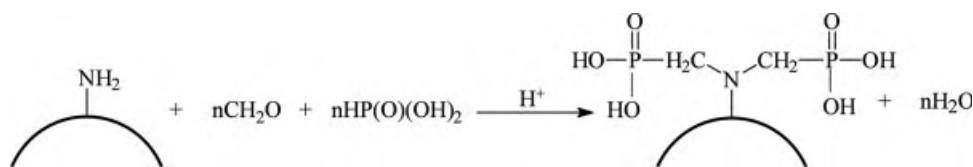
The attachment of amino groups onto the silica surface was achieved by a silanization reaction between the surface silanol groups and APTES in a 600-mL flask containing 15.0 g of fumed silica into which 500 mL of 10% (v/v) toluene solution of APTES was added. The mixture was homogenously dispersed by a magnetic stirrer for 30 min. Then 50 mL of methanol : water (4 : 1 or 2 : 1) was added to the mixture and stirred for 72 h. After that, the modified silica particles were filtered and extracted with toluene for 24 h using a Soxhlet extractor to remove the unreacted APTES. The APTES-treated silica was dried in an oven at 60°C for 24 h and stored in auto-dehumidity desiccators [yield: 44.07% (2 : 1) and 33.44% (4 : 1)].

### Grafting of hyperbranched polyamidoamine polymer on the silica surface

The Michael addition was carried out as follows: 600 mL of methanol having MA at a 10 times higher concentration than the amino content found in the treated silica was added drop by drop to 20.0 g APTES-treated silica in a 1000-mL flask, and the mixture was stirred at room temperature for 48 h. The methanol and unreacted MA were evaporated by reduced pressure evaporator, leaving PAMAM-grafted silica (product G0.5).

The amidation of the terminal ester groups from the Michael addition step was carried out as follows: The ester terminated silica (34 g) from the aforementioned Michael addition step was suspended in 500 mL of methanol in a 1000-mL round bottomed flask, and then 145 mL of 31% (v/v) EDA in methanol was added. The mixture was vigorously stirred at room temperature for 72 h. Then solvent plus some unreacted EDA was removed by a rotary evaporator at a temperature no higher than 40°C. The remaining unreacted EDA, which was hardly removed under such a mild condition, and unattached polymer products (such as hyperbranched PAMAM) were removed by dialysis. Complete removal of unwanted by-products was followed up by monitoring the pH value of the dialysate solution, leaving hyperbranched PAMAM-grafted silica (product G1.0).

These procedures were then repeated for a second (products G1.5 and G2.0, respectively) and third (products G2.5 and G3.0, respectively) round as earlier, except that a two times higher MA and EDA



**Scheme 1** The mechanism of the Mannich type reaction involving PAMAM-grafted silica, formaldehyde, and phosphorus acid.

concentration (in 100 mL of methanol) was used than that in the first round synthesis.

### Phosphorylation of PAMAM-grafted silica

Hyperbranched PAMAM-grafted silica (0.2 mol amine groups), crystalline phosphorous acid (0.4 mol), and concentrated hydrochloric acid (0.6 mol) were dissolved in a total volume of 200 mL with water, and the mixture was heated to reflux in a three-necked flask fitted with thermometer, condenser, and dropping funnel. Over the course of about 1 h, 60 mL of a 40% (w/v) aqueous formaldehyde solution was added drop by drop, and the reaction was kept at the reflux temperature for an additional hour. The water was evaporated using a rotary evaporator, and the concentrate was neutralized with concentrated ammonia solution. Finally, the concentrated solution was precipitated in methanol to get a yellowish solid gel-like product. The general mechanism of this reaction (Mannich type reaction) is given in Scheme 1.

### Fixation of phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica on cotton fabric

Dyed knitted cotton fabrics were treated with a solution containing 50 g/L phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica, 50 g/L urea, and 20 g/L dicyandiamide as a catalyst.<sup>28</sup> The application was performed using a pad mangle set to a pressure of 80% wet pick up. The padded fabric was dried at 60°C for 5 min and cured at 150°C for 3 min to allow the covalent formation of phosphonated cellulose. The treated fabric was rinsed to remove unfixed agents. To study the durability of flame retardancy, the treated cotton fabric was washed, according to TIS-121 (3-1975), in distilled water containing nonionic detergent 1 g/L at 50°C for 30 min and then rinsed the fabric with distilled water for 10 min. The fabric was dried at 60°C for 5 min and placed in a desiccator more than 24 h before conducting flammability test.

### Fire retardation and thermal properties

Fire retardation of control and the treated cotton was assessed by a standard 45° flame spread test

using Atlas 45° Automatic Flammability Tester according to ASTM D 1230 (in this study, the ignition time was 5 s) at 30°C and 62% ± 3% RH. The burning behavior was recorded by digital video camera. The thermal property of the treated fabric was analyzed using thermal gravimetric analysis (TGA) on a Mettler Toledo STARE System DCS822e Module.

### Determination of amino group content on hyperbranched PAMAM-grafted silica

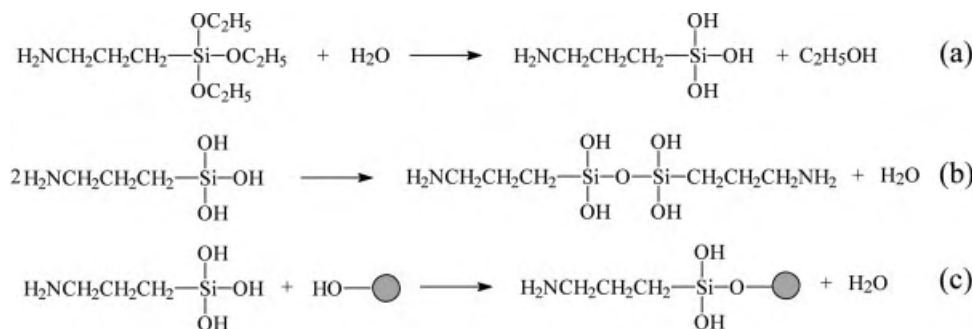
The amino group content (mmol/g of silica) of hyperbranched PAMAM-grafted silica was determined by titration. 0.1000 g of grafted silica and 25 mL of 0.01M hydrochloric acid aqueous solution were mixed and stirred at room temperature for 2 h, filtered and titrated with a standardized aqueous solution of 0.01N sodium hydroxide using phenolphthalein as an indicator.

### Determination of percent grafting

The weight of hyperbranched PAMAM grafted onto the silica surface was measured by weight loss determination using TGA. The sample of hyperbranched PAMAM-grafted silica was heated to 800°C to decompose the organic content, and the percentage of grafting was calculated as relative to that of the initial silica weight as reported.<sup>18</sup>

### Characterizations

The morphology of hyperbranched PAMAM-grafted silica was observed by scanning electron microscopy. The samples were mounted on stub with double-sided adhesive tape and coated with a thin layer of gold. Images were taken using a JEOL scanning electron microscope, JSM-5410LV, using an accelerating voltage of 15 kV, and a magnification 35,000 times of origin specimen size. The particle size distribution was analyzed using laser light scattering (Mastersizer 2000, Malvern Instruments), with a range of 0.02–2000 μm. Water/methanol mixture was employed as a dispersant. FTIR spectroscopy, taken on KBr pellet samples, was recorded on a Nicolet Fourier transform spectrophotometer (Nicolet Impact 400D). Liquid sample was cast onto KBr



**Scheme 2** Chemical equation of (a) hydrolysis reaction from alkoxy silanes, (b) self-condensation reaction, and (c) condensation reaction between APTES and silica.

plate and then solvent (methanol) was allowed to evaporate. The infrared spectrum of coated KBr plate was recorded in a range of 4000–400  $\text{cm}^{-1}$ . The proton NMR spectra of the samples were recorded on Bruker DPX-300 spectrometer. The NMR sample tube containing a mixture of sample and solvent was placed in NMR spectrometer (DPX-300).  $^1\text{H}$  NMR spectra were measured at the radio frequency of  $\sim 300$  MHz.

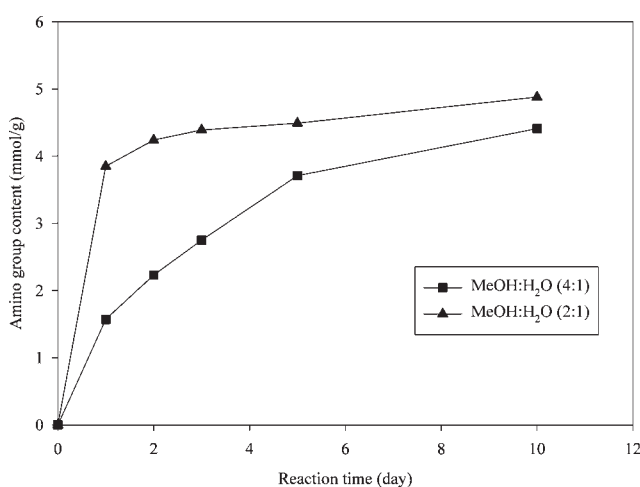
## RESULTS AND DISCUSSION

### Introduction of amino groups onto the silica surface

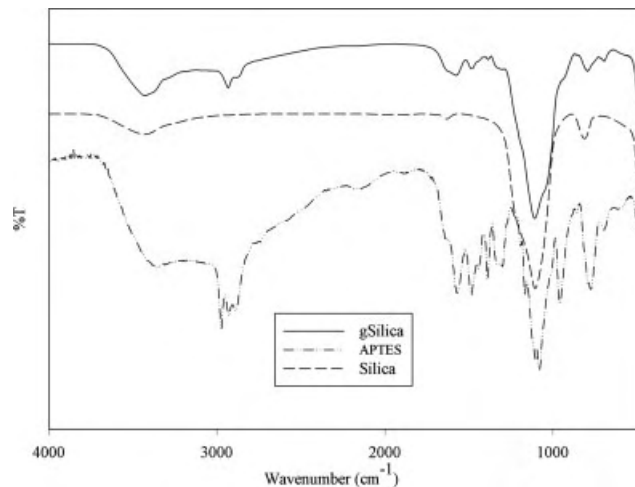
The surface functionalization of silica particles was carried out by the condensation reaction of silica silanol group with APTES, resulting in silica particles containing amino groups on the surface which acted as the initiator sites for PAMAM grafting. The condensation reaction is base-catalyzed, and APTES amine groups are a self-catalyzed component. The mechanism involved the hydrolysis of APTES triethoxy groups by water, yielding silanol groups. The subsequent condensation reaction between APTES

silanol groups and silica silanol groups takes place on the silica surface as shown in Scheme 2. However, potential self-condensation of APTES can also occur and results in undesirable products. The amount of water present in the system significantly influences the hydrolysis reaction of triethoxy groups and the condensation reaction on silica surface.<sup>29</sup>

The rate of hydrolysis and condensation reaction was manipulated by using a methanol to water ratio of either 4 : 1 or 2 : 1. The measured amino contents (mmol/g of APTES silica) of the silica attained with different reaction times are summarized in Figure 1. The conjugated amino group content increased with an increase in both the amount of water and reaction time. Water is consumed in the conversion of APTES triethoxy groups to silanol groups (hydrolysis reaction), and hence determines the rate of hydrolysis. Consequently, the more silanol groups produced, the higher is the rate of the subsequent silanol condensation reaction. Therefore, from this data all further amino-functionalized silica for PAMAM grafting were prepared using a 2 : 1 ratio of methanol to water for 3 days.



**Figure 1** Amino group content of APTES-treated silica at different reaction times and methanol : water ratios.

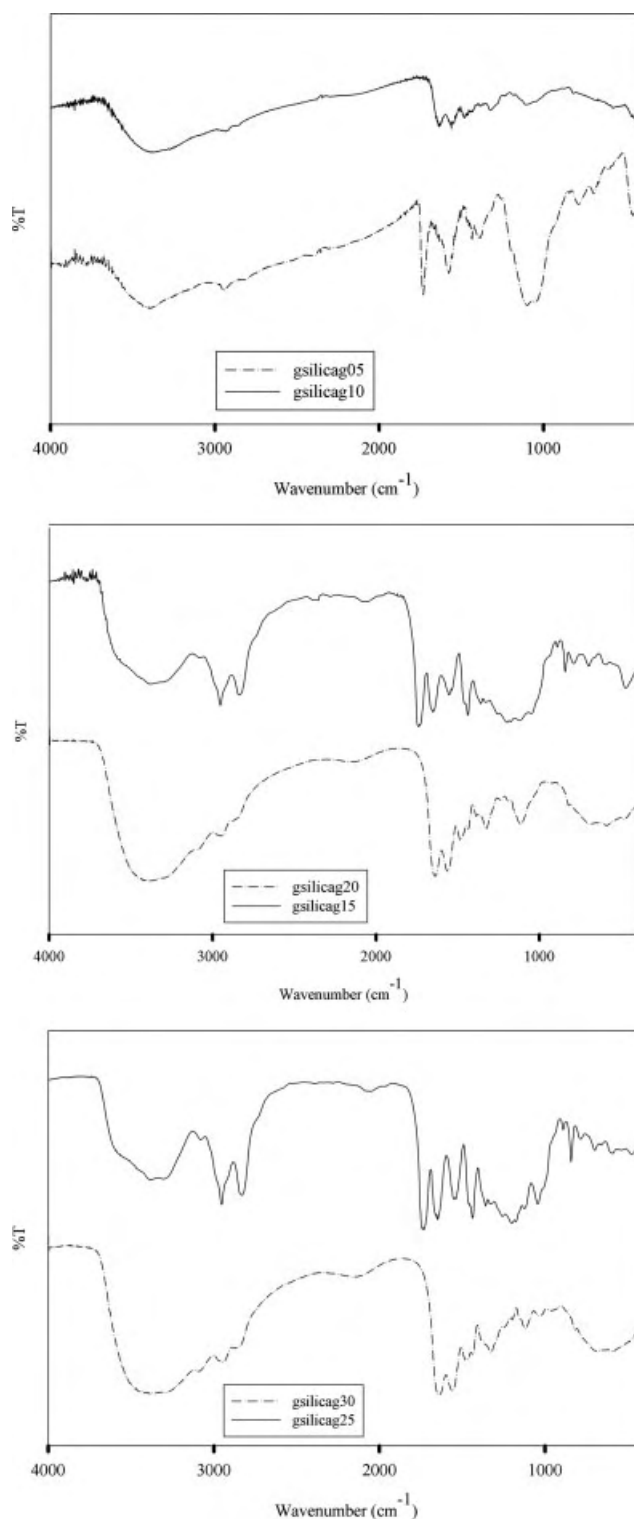


**Figure 2** FTIR spectra of silica, APTES, and APTES-grafted silica (gSilica).

To confirm that APTES-functionalized silica was produced as a result of the condensation reaction, FTIR analysis was performed. Representative FTIR spectra for APTES-grafted silica, virgin silica, and APTES are shown in Figure 2. Silica, an inorganic substance, exhibited a strong absorption band of siloxane (Si—O—Si) bonding at  $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$  and the silanol OH band in the range of  $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ . In contrast, the putative organo-functionalized APTES-conjugated silica exhibited new absorption frequencies at  $2932$  and  $1640\text{ cm}^{-1}$ , likely to be C—H stretching and primary amine (N—H) bending or (C—N) absorptions, respectively, which are absent in silica but, as expected, correspond with the absorption characteristics of the APTES spectrum which lacks the Si—O—Si and silanol OH bands. These results are consistent with APTES incorporation into the silica particles. The silica surface modification is further supported by the observed changes in spectrum pattern in the region of silanol OH band ( $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ ), because of new interhydrogen bonding interaction among APTES silica particles.

#### Grafting of hyperbranched PAMAM from silica surface

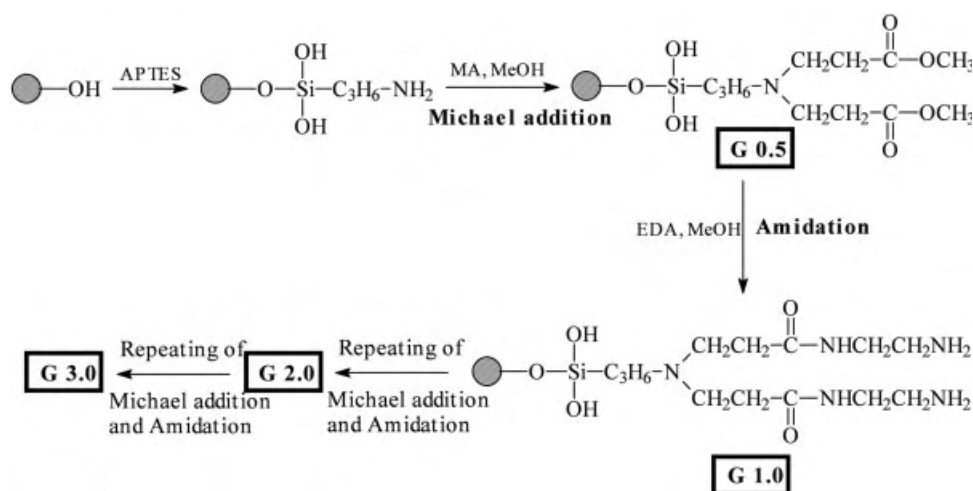
After the successful introduction of primary amine-functional groups to yield amino initiating sites, grafting of hyperbranched PAMAM onto the surface of amino-functionalized silica was carried out by sequentially repeating two processes, Michael addition and amidation, used in the same manner as in the synthesis of PAMAM dendrimers, for a total of three rounds of synthesis. Removal of excessive MA and EDA in each reaction step was necessary. After each Michael's addition step, excess MA was easily removed from the reaction product by reduced pressure evaporation due to its low boiling temperature. On the other hand, excess EDA from each amidation step was poorly removed by a rotary evaporation at less than  $40^\circ\text{C}$  and was, therefore, removed by dialysis. The purified products were subjected to FTIR analysis to monitor progress of the Michael addition and amidation reactions. Representative FTIR scans are shown in Figure 3. In the Michael addition step, the terminal methyl ester group of the products from all three successive rounds of synthesis (G0.5, G1.5, and G2.5) shows a strong and distinguishable band at  $1740\text{ cm}^{-1}$ . This peak completely disappears from the spectra after amidation (G1.0 and G2.0) with production of the terminal amine group, corresponding to the appearance of the strong absorption intensity of the N—H band in the region of  $3000\text{--}3350\text{ cm}^{-1}$ . Its absorption intensity significantly increases with an increase in successive synthesis rounds (and assumed PAMAM generation), reflecting that the terminal amine groups are correspond-



**Figure 3** FTIR spectra of the products from the first, second, and third cycle synthesis (G0.5–G3.0) of hyperbranched PAMAM-grafted silicas.

ingly significantly increased. Focusing upon the final product after three rounds of synthesis (G3.0; putative hyperbranched PAMAM-grafted silica), the absorption peaks at  $1649$  and  $1568\text{ cm}^{-1}$  are characteristic



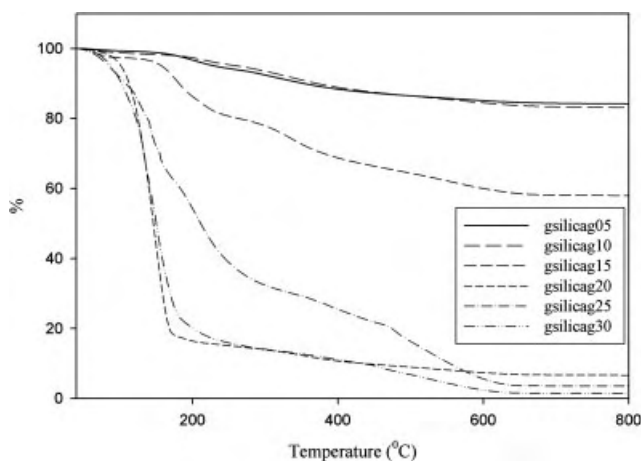


**Scheme 3** The synthesis of PAMAM-grafted silica in three repeated cycles comprised sequential Michael addition and amidation reactions.

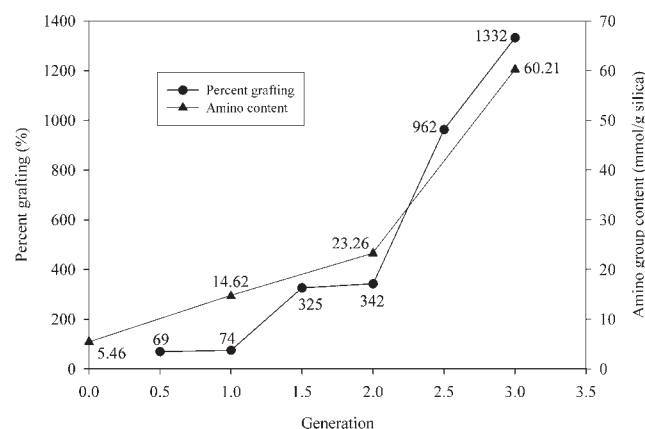
of C=O stretching and N—H bending, while those at 3281 and 3086  $\text{cm}^{-1}$  correspond to N—H antisymmetric and symmetric stretching of primary amine, respectively. In accordance, the C—H band at 2900  $\text{cm}^{-1}$ , which shows up strongly in the spectra of G0.5 and G1.5, becomes less dominant because of the suppressing influence of the surrounding N—H band. The expected principal reaction scheme is shown in Scheme 3.

Typical TGA thermograms of hyperbranched PAMAM-grafted silicas from the Michael and amidation reaction stages of all three reaction cycles (G0.5–G3.0) are shown in Figure 4, and reveal a clear increase in the relative thermolabile (organic) composition with increasing rounds of synthesis. To clearly quantify this, the percent graftings were calculated from these thermogram curves, and the results are summarized in Figure 5. As seen, the per-

cent grafting with PAMAM relative to the initial silica mass increased exponentially, as was expected due to the characteristics of PAMAM dendrimer synthesis. The amino group contents, as measured after each amidation reaction, were expected to increase in line with the percent grafting. However, although a near exponential increase was observed (Fig. 5), the measured amounts are much lower than the theoretical predicted value based upon the deduced number of PAMAM moieties (Table I). Based on the reaction chemistry, there are two potential reasons why the theoretical value was not attained. First, in later stages when dense solid PAMAM branches with reduced mobility are formed, steric hindrance arising from congestion of end groups (G3 and perhaps G2) may reduce the available exposed number of sites and block the propagation of PAMAM branches. However, steric



**Figure 4** TGA thermograms of G0 products from the first, second and third cycle synthesis (G0.5–G3.0) of hyperbranched PAMAM-grafted silicas.



**Figure 5** Percent weight grafting of PAMAM on the silica surface relative to the initial silica weight and the amino group content.

**TABLE I**  
**Amino Group Content on Silica Particle**

Generation	Amino group content (mmol/g of silica)	
	Found	Theoretical
0.0	5.46	—
1.0	14.62	30.55
2.0	23.26	53.35
3.0	60.21	416.00

hindrance would not be expected to play any significant role in the earlier synthesis rounds (G1 and to some extent G2) prior to dendrimer formation. Second, the potential side reactions of one EDA with two molecules of ester groups to form intra- and inter-group cross-linked products (Scheme 4), decrease the amount of ester groups available for the next step reaction.<sup>17</sup>

#### SEM analysis and particle size analysis

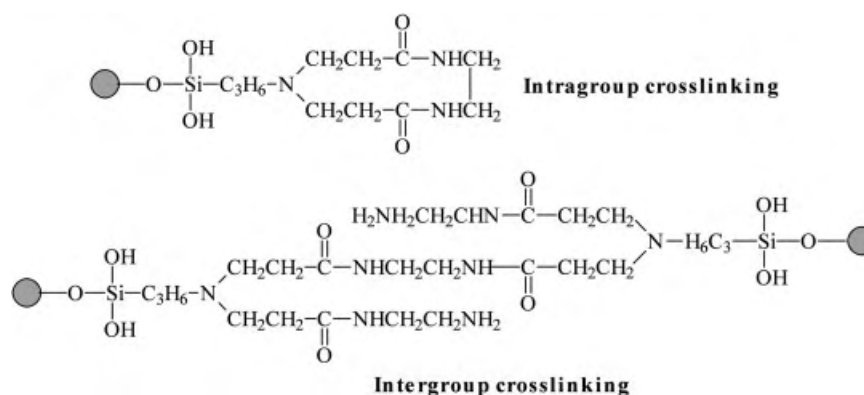
Fumed silica nanoparticle powder in nature aggregated and formed micron-sized nanoclusters in suspension. Typically, physical interaction among nanoparticles is too strong to separate them back into individual particles by mechanical agitation because of their large surface area characteristics including van der Waals forces and hydrogen bonding. In this study, the effect of hyperbranched PAMAM grafting onto the silica surface was examined on particle disaggregation and its stability using SEM and particle size analysis. Typical SEM images are shown in Figure 6. As expected, the fumed silica particles as received are tightly packed and adhered together in agglomerate form. After grafting, changes in particle distribution behavior as well as the agglomerate size were observed (Fig. 6). The results indicate that hyperbranched PAMAM

grafting onto silica successfully dispersed particles and reduced agglomeration, presumably because of masking of silica surface hydrogen bonding and replacement with charge repulsion (Zeta potential). In addition, as observed in the SEM images, the grafted hyperbranched PAMAM resulted in reducing the agglomerate size.

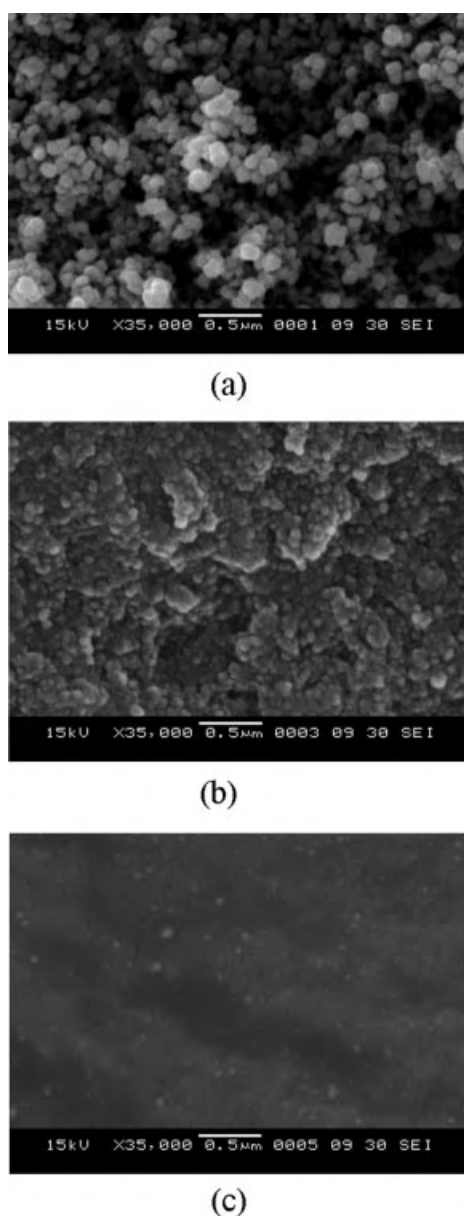
The particle size of sample was further measured with laser light scattering, and the data for fumed silica, G0.5, G1.5, and G2.5 hyperbranched PAMAM-grafted silicas are summarized in (Fig. 7). These methyl ester-terminated PAMAM-grafted particles exhibited instability in water medium. Hence, mixture of water and methanol was used as a dispersant medium. It should be noted that G1.0, G2.0, and G3.0 amine terminated hyperbranched PAMAM-grafted silicas because of their high pH value (pH ~ 10) were excluded from this experiment to avoid the effect of pH on the particle size measurement. The silica particle sizes before treatment revealed a median size of ~ 90  $\mu\text{m}$ , while the principal population seen in the G0.5 PAMAM silica particles showed a decreased median of ~ 6  $\mu\text{m}$ ; however, a minor population of smaller particles of 60–450 nm (median of 190 nm) was also observed. A second round of hyperbranching PAMAM synthesis (G1.5) resulted in two distinct particle size populations, with slightly more smaller ones with a reduced particle size of 40–1000 nm (median 190 nm) than larger ones with particle sizes of 1–10  $\mu\text{m}$  (median 3.5  $\mu\text{m}$ ). Finally, the third reaction round (G2.5) resulted in a slight change in the relative proportions of small and large particles with smaller particles of a reduced sized to 50–500 nm (median 150 nm).

#### Phosphorylation of hyperbranched PAMAM-grafted silica

The functionalization of terminal amine groups by phosphorylation into phosphonic acid groups was



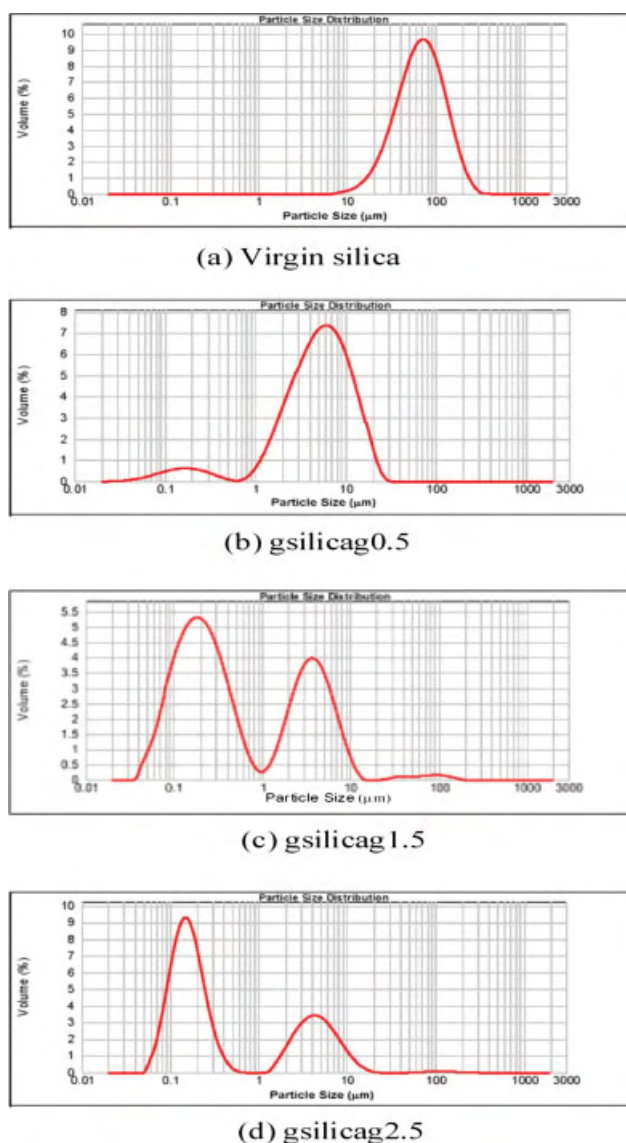
**Scheme 4** Potential intra- and inter-group side reactions of the terminal amine and ester groups of hyperbranched PAMAM-grafted silica.



**Figure 6** SEM images of (a) silica and PAMAM-grafted silica from (b) G0.5 and (c) G1.0.

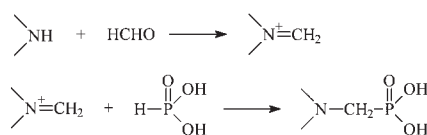
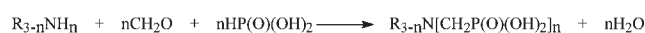
carried out to attempt to introduce the specific special properties of efficient chelation and flame retardancy into the hyperbranched PAMAM-grafted silica. The incorporation of phosphonic acid groups into PAMAM branch ends was easily achieved using a straightforward Mannich type reaction of phosphorous acid with formaldehyde and primary amine compounds at low pH in the presence of  $\sim 2$ – $3$  mol of concentrated hydrochloric acid per mole of an amine (Scheme 5 and Fig. 8).

The reaction products were characterized using FTIR (Fig. 9). Considering the spectrum of phosphonic acid-functionalized silica, new peaks are observed, indicating a change in the structure of hyperbranched PAMAM-grafted silica. The presence

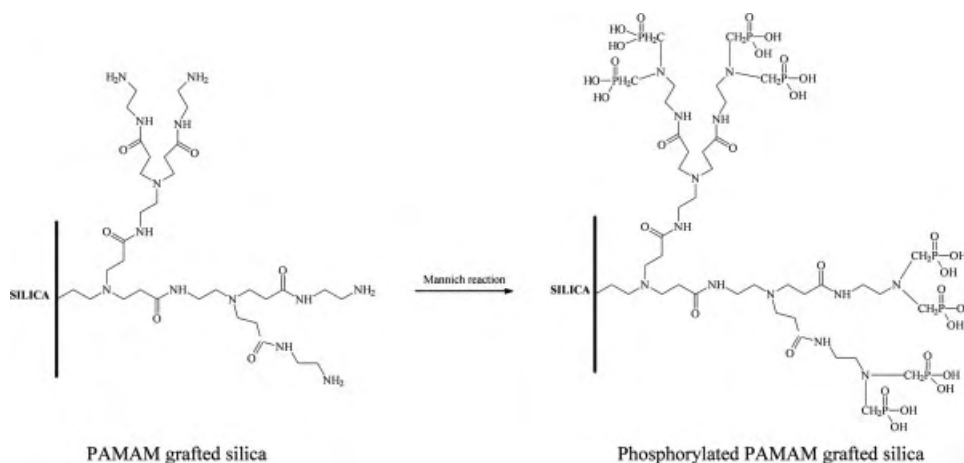


**Figure 7** The particle size distribution of (a) virgin silica and PAMAM-grafted silica from (b) G0.5, (c) G1.5, and (d) G2.5. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

of the phosphonic acid moiety corresponds to the absorption bands at 1182, 1078, and 923  $\text{cm}^{-1}$  for (P=O), (P–OH), and (P–O) groups, respectively.<sup>30–33</sup> The very broad band extending from 3600  $\text{cm}^{-1}$  to as low as 2500  $\text{cm}^{-1}$  is likely to be due to the absorption characteristic of the phosphonic acid hydroxyl group (OH). The N–H stretching band at 3500  $\text{cm}^{-1}$  in



**Scheme 5** The Mannich reaction involving an amine, formaldehyde, and phosphorous acid.



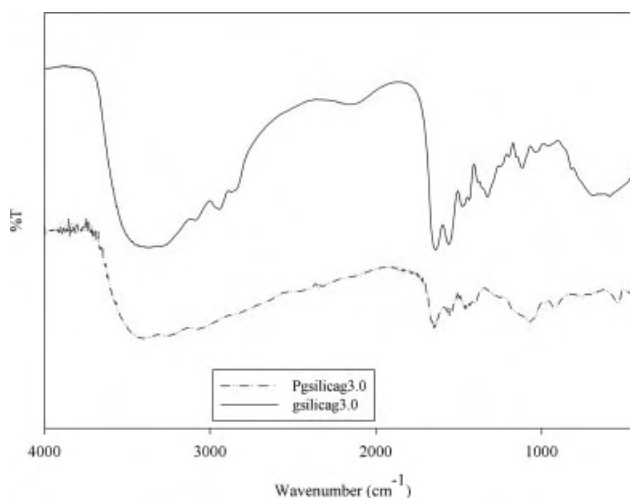
**Figure 8** The putative structure of phosphonic acid-functionalized PAMAM-grafted silicas.

hyperbranched PAMAM-grafted silica markedly decreased, reflecting its conversion by the Mannich reaction. In agreement, the  $^1\text{H}$  NMR spectrum of phosphonic acid-functionalized PAMAM-grafted silica (Fig. 10) indicated the presence of C(1)-H<sub>2</sub> and C(2)-H<sub>2</sub> groups (3.6 ppm) and a methylene group adjacent to phosphorous nucleus (3.7 ppm). Thus, FTIR and  $^1\text{H}$  NMR results both provide strongly supporting evidence that phosphonic acid groups successfully replaced hyperbranched PAMAM-grafted silica amine groups, leading to hyperbranched polymer-grafted silica.

### Flame retardancy effect testing

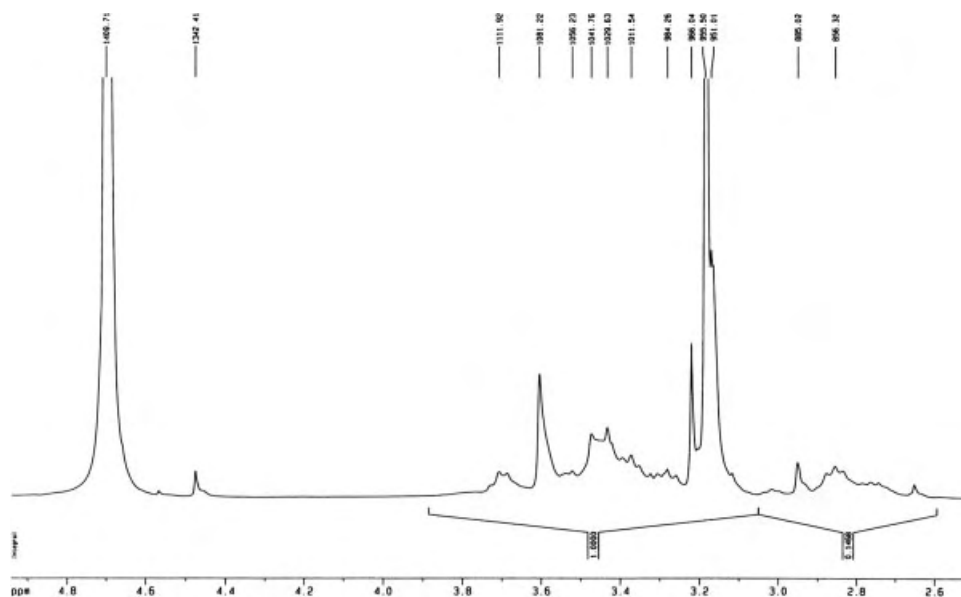
Phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica potentially offers both strong chelating powers and flame retardancy properties. The latter was tentatively investigated in this study. Preliminary evaluation of flame retardancy effect on cotton fabric was undertaken. Cotton substrate was chosen because of its relatively high flammability characteristic as well as common usage. In a standard 45° burning test, phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica-treated cotton exhibits a marked fire retardancy property as shown in Figure 11. The burning test shows no ignition after flaming for the unwashed treated fabric. In case of the untreated control, fabric is ignited easily and burned severely. The flame spreads very quickly and burns the entire fabric. After washing, the treated fabric is still able to exhibit satisfactory flame retardancy performance, indicating the durable property of phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica. A large amount of char and molten viscous layer are formed on the fabric's surface, acting as an insulation layer, and then protecting fabric from flame and oxygen to further decompose the fabric.

In addition, analysis of treated and untreated cotton fabric was performed by TGA analysis, with representative thermograms shown in Figure 12. The untreated fabric starts to decompose at about 300°C and rapidly increases from 330°C reaching 100% weight loss at 350°C, as reported earlier.<sup>34</sup> Degradation of the treated fabric begins at the relatively lower temperature of 260°C and progresses rapidly from 300°C, leaving about 35% residual weight (at 320°C). Thereafter, a slow decomposition to about 2–3% residual weight by ~ 600°C due to the retardant effect of phosphonate silica was observed. The pyrolysis of the flame-retardant-treated cotton fabric typically starts at a relatively lower decomposition temperature because of the catalytic dehydration of cellulose by the flame retardant, leading to char formation on the fabric surface, a well-established flame retardancy mechanism of phosphorus-containing compounds. In this scenario, the decline of



**Figure 9** FTIR spectra of G3.0 hyperbranched PAMAM-grafted silica (gsilica 3.0) and its phosphorylated derivative (Pgsilica 3.0).

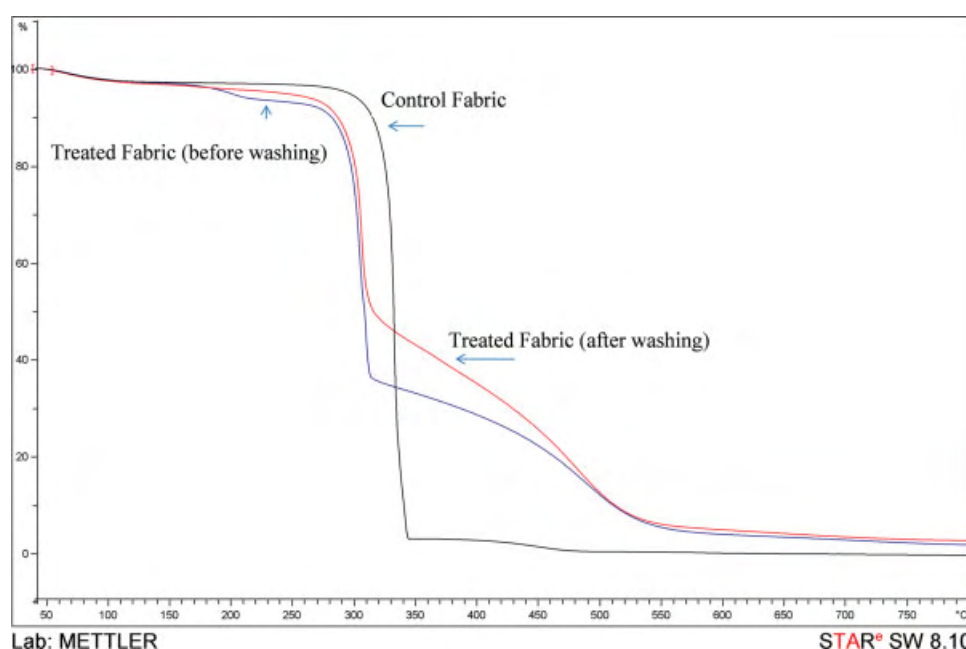




**Figure 10**  $^1\text{H}$  NMR spectrum of phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica.

degradation temperature is due to the reaction of the phosphonic acid with the C<sub>6</sub> hydroxyl of the cellulose anhydroglucose unit, blocking the formation of levoglucosan (source of fuel) and so promoting char rather than flame formation. As a result, the percentage weight loss for treated fabric measured at 350°C (the temperature of 100% weight loss of untreated fabric) is reduced to 70%, supporting the flame-retardant effect of phosphorylated hyperbranched PAMAM-grafted silica. Moreover, PAMAM contains nitrogen atoms that act synergisti-

cally with phosphorus<sup>35</sup> enhancing the electrophilicity of phosphorous and, through making a stronger Lewis acid, promoting the phosphorylation reaction with C-6 hydroxyl group of anhydroglucose unit. TGA thermogram of treated fabric after washing presented in Figure 12 shows the decomposition temperature at 280°C, which is higher than those of unwashed fabric but lower than that of control fabric. This result indicates that the phosphoester linkages between the phosphorylated PAMAM-silica and C-6 hydroxyl groups exhibit wash-off resistance.



**Figure 11** TGA thermograms of untreated cotton fabric and treated cotton fabrics (before and after washing). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]



**Figure 12** Flame spread test of untreated cotton fabric and treated cotton fabrics (before and after washing). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

From this finding, it is reasonable to say that an immobilization of the water-soluble compound (phosphodendrimers to insoluble nanoparticles) could help improve its durability to washing.

### CONCLUSIONS

The grafting of hyperbranched PAMAM polymer onto amino group-functionalized silica was successfully achieved by performing three rounds of paired reactions comprised a Michael addition of the silica amino group to methyl acrylate and the amidation of the resulting terminal methyl ester group with

ethylenediamine. The percent grafting, relative to the initial silica weight and calculated from TGA results, were 74, 342, and 1332% for the three reaction cycles, respectively, with corresponding amino group contents of 14.6, 23.3, and 60.2 mmol/g silica, respectively. However, the attained amino group contents were much lower than the expected values relative to the amount of grafting, perhaps due to the effect of steric hindrance in later cycles as hyperbranched PAMAM are formed, and the intra- and inter group crosslinking. Regardless, grafted hyperbranched PAMAM enhanced particle dispersion and reduced particle agglomeration. Thus, the

agglomerate particle size before grafting averaged  $\sim 70\ \mu\text{m}$  and after grafting the particle size significantly decreased to a range of 50–500 nm (average  $\sim 150\ \text{nm}$ ) with major composition of the two discrete populations.

The phosphorylation of the hyperbranched PAMAM polymer terminal amino groups was also successfully achieved by the Mannich type reaction. The phosphorylated products containing the phosphonic acids exhibited flame retardancy when applied onto flammable cotton fabric. After washing test, the hyperbranched PAMAM polymer showed good retention of fire retardancy, indicating its wash-off resistancy performance.

## References

- Tomalia, D. A. *Prog Polym Sci* 2005, 30, 294.
- Lee, C. C.; Mackay, J. A.; Frechet, J. M. J.; Szoka, F. C. *Nat Biotechnol* 2005, 23, 1517.
- Tomalia, D. A.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S. *Polym J (Tokyo)* 1985, 17, 117.
- Aulenta, F.; Hayes, W.; Rannard, S. *Eur Polym J* 2003, 39, 1741.
- Smith, D. K.; Hirst, A. R.; Love, C. S.; Hardy, J. G.; Brignell, S. V.; Huang, B. Q. *Prog Polym Sci* 2005, 30, 220.
- Pan, B.; Gao, F.; Ao, L.; Tian, H.; He, R. D.; Cui, D. *Colloid Surf A* 2005, 259, 89.
- Gong, A. J.; Chen, Y. M.; Zhang, X.; Liu, H. W.; Chen, C. F.; Xi, F. *J Appl Polym Sci* 2000, 78, 2186.
- Demadis, K. D.; Neofotiston, E. *Chem Mater* 2000, 19, 581.
- Shi, X.; Lesniak, W.; Islam, M. T.; Muñiz, M. C.; Balogh, L. P.; Baker, J. R. *Colloid Surf A* 2006, 272, 139.
- Ahmed, S. M.; Budd, D. M.; McKeown, N. B.; Evans, K. P.; Beaumont, G. L.; Donaldson, C.; Brennan, C. M. *Polymer* 2001, 42, 889.
- Majoros, I. J.; Keszler, B.; Woehler, S.; Bull, T.; Baker, J. R. *Macromolecules* 2003, 36, 5526.
- Heldt, J. M.; Durand, N. F.; Salmain, M.; Vessière, A.; Jaouen, G. *J Organomet Chem* 2004, 689, 4775.
- Yoshimaru, T.; Abe, S.; Esumi, K. *Colloid Surf A* 2004, 251, 141.
- Li, H. Y.; Chen, H. Z.; Xu, W. J.; Yuan, F.; Wang, J. R.; Wang, M. *Colloid Surf A* 2005, 254, 173.
- Bergemann, K.; Fanghänel, E.; Knackfuß, B.; Lühge, T.; Schukat, G. *Carbon* 2004, 42, 2338.
- Park, S. J.; Seo, M. K.; Nah, C. *J Colloid Interface Sci* 2005, 291, 229.
- Qu, R.; Niu, Y.; Sun, C.; Ji, C.; Wang, C.; Cheng, G. *Microporous Mesoporous Mater* 2006, 97, 58.
- Tsubokawa, N.; Ichioka, H.; Satoh, T.; Hayashi, S.; Fujiki, K. *React Funct Polym* 2008, 37, 75.
- Wu, X. Z.; Liu, P.; Pu, Q. S.; Sun, Q. Y.; Su, Z. X. *Talanta* 2004, 62, 918.
- Taniguchi, Y.; Shirai, K.; Saitoh, H.; Yamauchi, T.; Tsubokawa, N. *Polymer* 2005, 46, 2541.
- Jiang, Y.; Gao, Q.; Yu, H.; Chen, Y.; Deng, F. *Microporous Mesoporous Mater* 2007, 103, 316.
- Perignon, N.; Marty, J. D.; Mingotaud, A. F.; Dumont, M.; Rico-Lattes, I.; Mingotaud, C. *Macromolecules* 2007, 40, 3034.
- Horrocks, A. R. *Polym Degrad Stab* 1996, 54, 143.
- Charuchinda, S.; Srikulkit, K.; Mowattana, T. *J Sci Res Chula Univ* 2005, 30, 98.
- Giraud, S.; Bourbigot, S.; Rochery, M.; Vroman, I.; Tighzert, L.; Delobel, R. *Polym Degrad Stab* 2002, 77, 285.
- Giraud, S.; Bourbigot, S.; Rochery, M.; Vroman, I.; Tighzert, L.; Delobel, R.; Pouth, F. *Polym Degrad Stab* 2005, 88, 106.
- Esfand, R.; Tomalia, D. A. In *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*; Fréchet, J. M. J.; Tomalia, D. A., Eds.; Wiley: Chichester, 2001; p 587.
- Gillingham, E. L.; Lewis, D. M.; Srikulkit, K. *Color Technol* 2001, 107, 318.
- Simon, A.; Cohen-Bouhacina, T.; Porté, M. C.; Aimé, J. P.; Baquey, C. *J Colloid Interface Sci* 2002, 251, 278.
- Demadis, K. D.; Katarachia, S. D. *Phosphorus, Sulfur Silicon Relat Elem* 2004, 179, 627.
- Heras, A.; Rodriguez, N. M.; Ramos, V. M.; Agulló, E. *Carbohydr Polym* 2001, 44, 1.
- Chaplais, G.; Bideau, J. L.; Leclercq, D.; Vioux, A. *Chem Mater* 2003, 15, 1950.
- Danilich, M. J.; Burton, D. J.; Marchant, R. E. *Vib Spectrosc* 1995, 9, 229.
- Zhu, P.; Sui, S.; Wang, B.; Sun, K.; Sun, G. *J Anal Appl Pyrolysis* 2004, 71, 645.
- Gaan, S.; Sun, G. *J Anal Appl Pyrolysis* 2007, 78, 371.