

การเปรียบเทียบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของโคโตแซนกับสารอื่น  
ในการช่วยเพิ่มการดูดซึมทางจมูกของแอสมอนด์ซิลิโคน

นางสาวอริสรา เมืองคุ้ม



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม ภาควิชาเภสัชกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-594-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**COMPARATIVE SAFETY AND EFFICACY OF CHITOSAN AS NASAL  
ABSORPTION ENHANCER OF SALMON CALCITONIN**

**Miss Arisara Muangkum**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Pharmacy**

**Department of Pharmacy**

**Graduate School**

**Chulalongkorn University**

**Academic Year 1998**

**ISBN 974-639-594-7**

Thesis Title            Comparative Safety and Efficacy of Chitosan as Nasal Absorption  
                                 Enhancer of Salmon Calcitonin  
By                            Miss Arisara Muangkum  
Department            Pharmacy  
Thesis Advisor        Mr. Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.

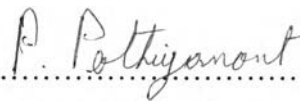
---

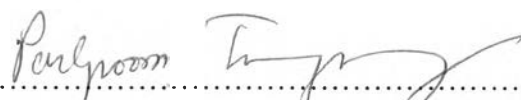
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in partial fulfillment  
of the Requirements for the Master's Degree.




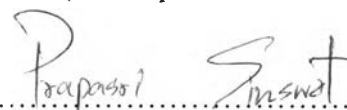
..... Dean of Graduate School  
( Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

Thesis Committee

  
..... Chairman  
( Associate Professor Pranom Pothiyant, M.S.)

  
..... Thesis Advisor  
( Associate Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

  
..... Member  
( Narueporn Sutanthavibul, Ph.D.)

  
..... Member  
( Prapasri Sinswat, M.S.)

อริสรา เมืองคัม : การเปรียบเทียบความปลอดภัยและประสิทธิภาพของไคโตแซนกับสารอื่นในการช่วยเพิ่มการดูดซึมทางจมูกของแซลมอนคัลซิโทนิน (COMPARATIVE SAFETY AND EFFICACY OF CHITOSAN AS NASAL ABSORPTION ENHANCER OF SALMON CALCITONIN) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ 187 หน้า ISBN 974-639-594-7

สารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาทางจมูก 5 ชนิดคือ ไคโตแซน J ไคโตแซน G ไคเมทิลเบต้าไซโคลเดกซตริน ไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเดกซตริน และ ลอโรอีลคาร์นิทีนคลอไรด์ ได้นำมาศึกษาประสิทธิภาพ ความปลอดภัย (ความสามารถในการทำลายเมมเบรน) และการกลับคืนสภาพเดิมของเมมเบรน ซึ่งเป็นผลจากกลไกช่วยเพิ่มการดูดซึมของสารช่วยเพิ่มการดูดซึมเหล่านี้

การศึกษานี้ศึกษาประสิทธิภาพของสารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาประเมินโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของสารไคเปปไทด์ [L-Tyr-D-Arg] ที่เหลือ ในสารละลายเพื่อผิวเซทซึ่งพบว่า 0.1% ลอโรอีลคาร์นิทีน คลอไรด์ 1.25% ไคเมทิลเบต้าไซโคลเดกซตริน 0.5% ไคโตแซน J และ 0.5% ไคโตแซน G มีประสิทธิภาพเหนือกว่าไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเดกซตรินและกลุ่มควบคุม และ 0.1% ลอโรอีลคาร์นิทีนคลอไรด์ มีประสิทธิภาพในการเพิ่มการดูดซึมไคเปปไทด์มากกว่า 0.5% ไคโตแซน G ที่ pH 6.0 ปริมาณความเสียหายของเมมเบรนประเมินโดยการวัดปริมาณเอนไซม์ภายในเซลล์ (แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (LDH)) ที่ปลดปล่อยลงสู่สารละลายเพื่อผิวเซทระหว่างการทดลอง ความสัมพันธ์ความเสียหายของเมมเบรนจากสารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาเหล่านี้พบว่าลดลงตามลำดับต่อไปนี้ 0.1% ลอโรอีลคาร์นิทีนคลอไรด์ > 1.25% ไคเมทิลเบต้าไซโคลเดกซตริน 0.5% ไคโตแซน G และ 0.5% ไคโตแซน J > 5.0% ไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเดกซตริน และกลุ่มควบคุม มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ระหว่างเปอร์เซ็นต์ของไคเปปไทด์ที่เหลืออยู่และปริมาณเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนสที่พบในสารละลายเพื่อผิวเซทที่เวลา 60 นาที ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาเหล่านี้ สามารถเพิ่มการดูดซึมไคเปปไทด์ทางจมูกโดยมีปฏิกิริยาโดยตรงต่อเมมเบรนภายในจมูก การกลับคืนสภาพเดิมของเมมเบรนจากการใช้สารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาประเมินโดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของสารไคเปปไทด์ และปริมาณ LDH ในสารละลายเพื่อผิวเซทก่อนและหลังจากขจัดสารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาออกพบว่า 0.1% ลอโรอีลคาร์นิทีนคลอไรด์ 1.25% ไคเมทิลเบต้าไซโคลเดกซตริน 0.5% ไคโตแซน J และ 0.5% ไคโตแซน G มีผลทำให้เมมเบรนกลับคืนสภาพเดิมได้ดีหลังจากถูกขจัดออกทั้งในรูปของความสมบูรณ์ของเซลล์และความสามารถในการซึมผ่านของไคเปปไทด์ ในทางตรงกันข้าม 5.0% ไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไซโคลเดกซตรินและกลุ่มควบคุมมีผลต่อเมมเบรนของจมูกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ดังนั้นจึงไม่เกิดการคืนสภาพเดิมของเนื้อเยื่อ อย่างไรก็ตามไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างประสิทธิภาพในการกลับคืนสภาพเดิมของเมมเบรน เมื่อประเมินจากการปลดปล่อยของ LDH และการดูดซึมของไคเปปไทด์ ( $p > 0.05$ )

สำหรับการศึกษาภายในร่างกายได้เลือก 0.5% ไคโตแซน G เพื่อเป็นตัวแทนของไคโตแซนในการประเมินการดูดซึมทางจมูกของแซลมอนคัลซิโทนินในมนุษย์เพศชาย หลังจากให้ยาทางจมูกร่วมกับ ไคโตแซน G พบว่าระดับแคลเซียมในพลาสมาค่อยๆลดลงจนถึงระดับต่ำสุดที่ 89.5% ของระดับแคลเซียมก่อนได้รับยา ที่เวลา 6 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาระดับแคลเซียมจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม 1.33% ไคเมทิลเบต้าไซโคลเดกซตริน ตลอดเวลา 9 ชั่วโมงหลังจากได้รับยา ( $p < 0.05$ )

ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่ากลุ่มของไคโตแซน โดยเฉพาะไคโตแซน G มีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้ เนื่องจากมีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารช่วยเพิ่มการดูดซึมยาในตำรับยาเตรียมทางจมูกซึ่งต้องการการทดสอบทางคลินิกต่อไป

ภาควิชา .....เภสัชกรรม.....  
สาขาวิชา .....เภสัชกรรม.....  
ปีการศึกษา .....2541.....

ลายมือชื่อนิสิต .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 3972427933 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: CHITOSAN / SAFETY / EFFICACY / REVERSIBILITY / NASAL ABSORPTION / ENHANCER / SALMON CALCITONIN

ARISARA MUANGKUM : COMPARATIVE SAFETY AND EFFICACY OF CHITOSAN AS NASAL ABSORPTION ENHANCER OF SALMON CALCITONIN.

THESIS ADVISOR : PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D. 187 pp. ISBN 974-639-594-7

Five nasal enhancers, chitosan Japan (CS J), chitosan glutamate (CS G), dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin (DM- $\beta$ -CD), hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) and lauroylcarnitine chloride (LCC), were investigated for the efficacy, safety (membrane-damaging effect) and reversibility of their absorption enhancing activities.

Using the *in situ* nasal perfusion, the efficacy of their absorption enhancing activities was evaluated by comparison of percentage dipeptide [D-Arg<sup>2</sup>]-Kyotorphin remaining in the perfusate. It was revealed that 0.1% LCC, 1.25% DM- $\beta$ -CD, 0.5% CS J and 0.5% CS G were significantly more effective than 5.0% HP- $\beta$ -CD and control saline, with 0.1% LCC gave the dipeptide absorption better than 0.5% CS G at pH 6.0. The magnitude of the nasal membrane-damaging effect was evaluated by measuring the extent of intracellular enzyme (lactate dehydrogenase (LDH)) release into the nasal perfusate during perfusion. The result was similar to that of the absorption enhancing activity. The relative membrane-damaging effect of these enhancers was found to be in the descending order of 0.1% LCC > 1.25% DM- $\beta$ -CD, 0.5% CS G and 0.5% CS J > 5.0% HP- $\beta$ -CD and control group. The significant correlation ( $p < 0.05$ ) was observed between the percent dipeptide remaining and the LDH content found in the nasal perfusate at T<sub>60</sub>. This indicates that the enhancers under study were able to enhance the nasal absorption of the model dipeptide by direct interaction with the nasal membrane. The enhancer's reversibility was evaluated by comparing the percent dipeptide and LDH content in the perfusate before and after removal of the enhancer. It was revealed that 0.1% LCC, 1.25% DM- $\beta$ -CD, 0.5% CS J and 0.5% CS G exhibited good mucosal recovery in terms of both membrane integrity and permeability to dipeptide absorption. On the other hand, 5.0 % HP- $\beta$ -CD and control saline exhibited very weak effects on the nasal mucosa and, therefore, did not show any reversibility. However, the ranking was not correlated between the efficacy of recovery based on the LDH release and the dipeptide absorption ( $p > 0.05$ ).

For the *in vivo* study, 0.5% CS G was selected as a representative of chitosans to evaluate salmon calcitonin nasal absorption (sCT) in healthy male volunteers. It was found that after nasal administration with CS G, the plasma calcium decreased gradually, and reaching minimum of 89.5% of initial value at 6 hours post dose. The calcium level was significantly lower than the control saline and 1.33% DM- $\beta$ -CD even at 9 hr after administration ( $p < 0.05$ ).

The results indicate that chitosans especially CS G, appear to have a promising potential for use as a safe and effective nasal absorption enhancer in nasal peptide formulations provided that more clinical testing be conducted.

ภาควิชา..... เกษัชกรวม.....

สาขาวิชา..... เกษัชกรวม.....

ปีการศึกษา..... 2541.....

ลายมือชื่อนิสิต..... Arisara Muangkum.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... P. Tengamnuay.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... -.....

## Acknowledgements



This thesis would have never been succeeded without the assistance of several people. For their suggestion, helps and supports, I will always be grateful.

Dr. Parkpoom Tengamnuay, my advisor, has given his time and attention to assist me throughout this study. His advice, continuing guidance, encouragement and understanding are also appreciated.

Special thank is given to Mrs. Jintana Chamnunmanuthum, Head of the Instrument Science Section, The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, for her valuable advice in the Atomic Absorption Spectrophotometer techniques.

Sincere thanks are given to the Pharmacy Department, Faculty of Pharmaceutical Science for providing research facilities and to the Graduate School, Chulalongkorn University for providing partial financial support to this project.

Also, I would like to thank all the faculty members in the Department of Pharmacy and all my friends for their assistance and encouragement. Their friendship was a continued source of strength and moral support to me.

Finally, I would like to express my infinite thanks to my family, especially, my parents for giving me the educational opportunity, love, care, and encouragement.

## CONTENTS

ABSTRACT (Thai).....	iv
ABSTRACT (English).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xii
CHAPTER	
I.INTRODUCTION.....	1
II.LITERATURE REVIEW.....	6
III.EXPERIMENTAL.....	30
Materials.....	30
Equipment.....	31
Methods.....	33
IV.RESULTS AND DISCUSSION.....	50
.V.CONCLUSIONS.....	114
REFERENCES.....	118
APPENDICES.....	128
VITA.....	187

## LIST OF TABLES

Table	Page
1	Proteolytic enzymes and their location in mammals.....10
2	Treatment sequence for each subject in the randomized block design.....46
3	Atomic Absorption Spectrophotometer conditions.....47
4	The percent [ D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining in the nasal perfusate during the first hour of nasal perfusion.....60
5	Concentration (U/ml) of lactate dehydrogenase (LDH) that released from the rat nasal mucosa during the first hour of in situ perfusion in the presence of various enhancers.....70
6	Comparison of the LDH release profiles between the first perfusion period (with enhancer) and the second perfusion period (without enhancer).....76
7	%[D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining in the nasal perfusates versus time in the presence of different enhancers (first hour) and after their removal from the rat nasal cavity (second).....91
8	Comparison the release profiles of LDH and the percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining in the perfusates of 0.1% , 0.5% CS J and CS G.....102
9	The percent plasma calcium level relative to the initial point and its AUC values during the 9-hr period following nasal administration of sCT in the presence of various enhancers.....107
10	The randomized block ANOVA result of the AUC <sub>0-9 hr</sub> of the plasma calcium levels.....106



## LIST OF FIGURES

Figure	Page
1	Transmission electron microscopic diagram of the four cell types in the nasal epithelium.....8
2	Chemical structures of chitin and chitosan.....19
3	Amino acid sequence of salmon calcitonin .....29
4	Diagram of the surgical procedure used in the in situ and in vivo nasal absorption studies.....34
5	Schematic diagram of the <i>in situ</i> perfusion of the rat nasal cavity.....35
6	Representative calibration curve of calcium content.....48
7	High pressure liquid chromatogram of (A): L-Phenylalanine (7.0 min) and (B): [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin (9.2min).....51
8	High pressure liquid chromatogram of (A): CS J (B): CS G (C): HP-β-CD (D): DM-β-CD and (E): LCC in isotonic saline.....52
9	High pressure liquid chromatogram of the calibration curve of [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin (9.2min) at the concentration of 0.1(A), 0.2 (B), 0.3 (C), 0.4(D) and 0.5 mM (E) with 5 mM L-Phenylalanine (7.0 min) as internal standard, in isotonic saline pH 6.0.....54
10	Representative calibration curve of [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin in isotonic saline pH 6.0.....55
11	High pressure liquid chromatogram nasal perfusate containing only saline after recirculating through the rat nasal cavity for 60 min.....56

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
12	High pressure liquid chromatogram of [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin (9.2 min) and L-Phenylalanine (7.0 min) in isotonic saline pH 6.0 at 0 (A) and 60 min (B) of the perfusion.....58
13	Semilogarithmic plots of percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining in the perfusate versus time during the first period.....62
14	The release profiles of LDH concentration in rat nasal perfusates versus time during the first period.....71
15	The average percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining and the average contents of LDH (U/ml) release into nasal perfusate at the end of the first perfusion period.....73
16	The release profiles of LDH in both perfusion periods for 5.0% HP-β-CD and control group.....77
17	The release profiles of LDH in both perfusion periods for 0.5% CS J and control group.....78
18	The release profiles of LDH in both perfusion periods for 0.5% CS G and control group.....79
19	The release profiles of LDH in both perfusion periods for 1.25% DM-β-CD and control group.....80
20	The release profiles of LDH in both perfusion periods for 0.1% LCC and control group.....81
21	Histogram comparing the LDH content release into the nasal perfusates at the end of both perfusion periods.....84
22	Semilogarithmic plots of percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining versus time in presence of 5.0%HP-β-CD (first hour) and after their removal from the rat nasal cavity (second time) and control group.....92

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
23	Semilogarithmic plots of percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining versus time in presence of 0.5 % CS J (first hour) and after their removal from the rat nasal cavity (second time) and control group.....93
24	Semilogarithmic plots of percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining versus time in presence of 0.5 % CS G (first hour) and after their removal from the rat nasal cavity (second time) and control group.....94
25	Semilogarithmic plots of percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining versus time in presence 1.25 % DM-β-CD (first hour) and after their removal from the rat nasal cavity (second time) and control group.....95
26	Semilogarithmic plots of percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining versus time in presence of 0.1% LCC (first hour) and after their removal from the rat nasal cavity (second time) and control group.....96
27	Histogram comparing the percent [D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining in the nasal perfusate at the end of the first and the second perfusion.....98
28	The correlation between %ΔC (LDH release) and %ΔC([D-Arg <sup>2</sup> ]-Kyotorphin remaining).....100
29	Percent plasma calcium level relative to the initial value after nasal administration of CST with and without enhancers.....108
30	Histogram comparing the AUC of the percent plasma calcium relative to the initial level (AUC <sub>0-9 hr</sub> ) between the control 0.53% CS G and 1.33% DM-β-CD.....110

**LIST OF ABBREVIATIONS**

ANOVA	=	Analysis of variance
AUC	=	Area under curve
cm	=	Centimeter
Conc	=	Concentration
CS G	=	Chitosan Glutamate Salt, from Pronova Biopolymer, Drammen, Norway
CS J	=	Chitosan, from Kyowa Techos Co., Ltd., Japan.
°C	=	Degree Celsius
DM- $\beta$ -CD	=	Dimethyl- $\beta$ -cyclodextrin
df	=	Degree of freedom
Fig	=	Figure
gm	=	Gram
HPLC	=	High performance liquid chromatography
HP- $\beta$ -CD	=	Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin
hr	=	Hour
IU	=	International unit
KDa	=	Kilodalton
kg	=	Kilogram
$k_{obs}$	=	Apparent first order rate constant
LCC	=	Lauroylcarnitine chloride
LDH	=	Lactate dehydrogenase enzyme
mg	=	Milligram
min	=	Minute
ml	=	Milliliter

mM	=	Millimolar
mosmole	=	Milliosmole
MS	=	Mean square
PHR	=	Peak height ratio
p	=	Probability
r	=	Correlation coefficient
sCT	=	Salmon calcitonin
SD	=	Standard deviation
SEM	=	Standard error mean
sec	=	Second
SS	=	Sum of square
TCF	=	Temperature correction factor
UV	=	Ultraviolet
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter