

ผลของโคโคแซนต่อการดูดซึมของ แอลมอน แคลซิโทนิน ทางจมูกในหนูขาว

นางสาว ประภาศรี สีนสวัสดิ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชกรรม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-637-152-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECT OF CHITOSAN ON NASAL ABSORPTION
OF SALMON CALCITONIN IN RATS**



Miss Prapasri Sinswat

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

Department of Pharmacy

Graduate School

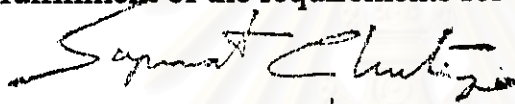
Chulalongkorn University

Academic Year 1997

ISBN 974-637-152-5

Thesis title Effect of Chitosan on Nasal Absorption
 of Salmon Calcitonin in Rats
By Miss Prapasri Sinswat
Department Pharmacy
Thesis Advisor Mr. Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.
Thesis Co-advisor -

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

..... *Prapapuck Silapachote* Chairman

(Associate Professor Prapapuck Silapachote, M.S.)

..... *Parkpoom Tengamnuay* Thesis Advisor

(Assistant Professor Parkpoom Tengamnuay, Ph.D.)

..... *P. Kulavanich* Member

(Associate Professor Poj Kulavanich, Ph.D.)

..... *Mayuree Tantisira* Member

(Assistant Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

พิมพ์ต้นฉบับบทความวิจัยวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว

ประกาศ สันต์สวัสดิ์ : ผลของไคโตแซนต่อการดูดซึมของแคลซิโทนินทางจมูกในหนูขาว
(EFFECT OF CHITOSAN ON NASAL ABSORPTION OF SALMON CALCITONIN IN RATS) อ.ที่ปรึกษา
ผศ.ดร. ภาคภูมิ เต็งอำนาจ, อ.ที่ปรึกษาร่วม :- , 266 หน้า ISBN 974-637-152-5

ได้ทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของไคโตแซน ในการเป็นสารเพิ่มการดูดซึมทางจมูกของแคลซิโทนิน ในหนูขาวเปรียบเทียบกับ ไฮดรอกซีโพรพิลและโคมเทิลเบต้าไฮโคลเด็กซ์ทริน โดยใช้ไคโตแซน 2 ชนิด ทั้งในรูป เบลอริจ (ไคโตแซน J) และรูปเกลือ กลูตามेट (ไคโตแซน G) สารละลายที่ให้ทางจมูก ประกอบด้วย แคลซิโทนิน ในขนาดยา 10 IU/Kg ร่วมกับ ไคโตแซน ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-1.25% w/v) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มี pH ในช่วง 3.0-6.0 ผลการทดลอง พบว่า ไคโตแซน J และ G ที่ 1% w/v สามารถ เพิ่มการดูดซึมของ แคลซิโทนินได้ อย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) โดยพิจารณาจาก ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของแคลเซียมในเลือด ซึ่งฤทธิ์ในการเพิ่มการดูดซึมของไคโตแซน J จะเพิ่มขึ้นเมื่อ pH ของสารละลายลดลง ในทางตรงกันข้าม ฤทธิ์เพิ่มการดูดซึมของไคโตแซน G จะเพิ่มขึ้นตาม pH ของสารละลายที่สูงขึ้นในช่วง pH 3.0-6.0 โดยค่า pH ที่เหมาะสมของไคโตแซน J และ G คือ 4.0 และ 6.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มการดูดซึมของไคโตแซนทั้ง 2 ชนิด จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นในช่วง 0.25% -1.0 % w/v โดยเริ่มคงที่หลังจากความเข้มข้น 1.0% w/v นอกจากนี้ ที่ความเข้มข้นต่ำสุด (0.25% w/v) ยังพบว่า ไคโตแซนทั้งสองชนิดสามารถเพิ่มการดูดซึม ของ แคลซิโทนิน ได้อย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่มีสารเพิ่มการดูดซึมทางจมูก) ค่าเปอร์เซ็นต์การลดลงของ แคลเซียมในเลือด สามารถเรียงลำดับจากมากไปน้อย ดังนี้ 1% w/v ไคโตแซน J (pH 4.0) > 5% w/v โคมเทิลเบต้าไฮโคลเด็กซ์ทริน (pH 7.4) > 1% w/v ไคโตแซน G (pH 6.0) > 5% w/v ไฮดรอกซีโพรพิลเบต้าไฮโคลเด็กซ์ทริน (pH 7.4) สำหรับการวัดระดับแคลซิโทนินในเลือดโดยใช้ RIA พบว่า ค่าการเอื้อประโยชน์สัมบูรณ์ของ 1% w/v ไคโตแซน J, 5% w/v โคมเทิลเบต้าไฮโคลเด็กซ์ทริน และ กลุ่มควบคุม (ไม่มีสารเพิ่มการดูดซึมทางจมูก) เมื่อเปรียบเทียบกับ การให้ยาหลอกหลอดเลือดดำ คือ 2.45% , 1.91% และ 1.22% ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ไคโตแซน J สามารถเพิ่มการดูดซึมของแคลซิโทนินได้มากที่สุด นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาถึงผลของไคโตแซนต่อการทำงานของเอ็นไซม์ที่สลายโปรตีน ได้แก่ ทริปซิน และลิวซีน อะมิโนเปปติเดสในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่าไคโตแซนทั้งสองชนิดนี้ไม่มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ทั้งสองนี้ ซึ่งอาจทำให้สรุปได้ว่าผลการเพิ่มการดูดซึมยาของไคโตแซน ไม่ได้มีผลจากกลไกการยับยั้งการสลายตัวของ ยาโปรตีนและเปปไทด์จากเอ็นไซม์ที่อยู่ในโพรงจมูก แต่เกิดจากผลโดยตรงของไคโตแซนต่อคุณสมบัติของเนื้อเยื่อในการยอมให้สารซึมผ่านได้มากขึ้น จากการทดลองสรุปได้ว่า ไคโตแซน ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ที่มีประจุบวก สามารถเพิ่มการดูดซึม ของแคลซิโทนิน ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ไคโตแซน J

ภาควิชา เกษัตริกรรม

สาขาวิชา เกษัตริกรรม

ปีการศึกษา 2540

ลายมือชื่อนิติ ประกาศ สันต์สวัสดิ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

C875122 : MAJOR PHARMACY

KEY WORD: SALMON CALCITONIN / CHITOSAN/ ENHANCER

PRAPASRI SINSWAT EFFECT OF CHITOSAN ON NASAL ABSORPTION OF SALMON CALCITONIN IN RATS. THESIS ADVISOR PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D., pp. 266 ISBN 974-637-152-5

The efficacy of chitosan as nasal absorption enhancer of salmon calcitonin (sCT) was investigated in rats and the results were compared with that of hydroxypropyl- and dimethyl- β -cyclodextrins (HP- β -CD and DM- β -CD). Two types of chitosans, namely the free base (CS J) and the glutamate salt form (CS G), were evaluated for their absorption enhancing effect using an in vivo absorption technique. The solutions containing sCT and chitosans (0 to 1.25% w/v) in isotonic phosphate buffers (pH 3.0 to 6.0) were nasally administered at the dose of 10 IU/Kg (n = 5 rats/group). The plasma calcium lowering effect in each sCT-treated rat was indicated by the total percent decrease in plasma calcium (%D). At 1% w/v CS J showed an increase in %D as the pH was decreased in accordance with the increased ionization and hydration of free amine chitosan at more acidic pH. However, results from 1% w/v CS G showed an increase in %D with increasing pH, with maximum calcium lowering effect observed at pH 6.0 in contrast to CS J which gave optimal activities at pH 3.0-4.0. At their optimal pH_i (4.0 for CS J and 6.0 for CS G), both chitosans exhibited the enhancing effect which was concentration dependent from 0.25 to 1.0 % w/v and leveled off at 1.25 % w/v. At 0.25 % w/v, the enhancing effect of CS J and CS G was already significant when compared to their control groups receiving only sCT (p<0.05). The ranking of %D in a decreasing order was 1% w/v CS J pH 4.0 (9.85 \pm 1.89) > 5% w/v DM- β -CD pH 7.4 (9.68 \pm 0.31) > 1% w/v CS G pH 6.0 (8.43 \pm 0.67) > 5% w/v HP- β -CD pH 7.4 (8.05 \pm 0.46). Using specific RIA, the absolute bioavailability of sCT after comparison with intravenous administration was determined to be 2.45, 1.91 and 1.22 % for 1% CS J, 5% DM- β -CD and control group (intranasal sCT alone), respectively. Although the absolute nasal bioavailability seemed to be low, the inclusion of 1% CS J resulted in two-fold increase in the AUC₀₋₁₈₀ of plasma sCT relative to that of the control group. This was equivalent to 201.8% relative bioavailability when compared to the control group at the same nasal dose. Addition of 5% DM- β -CD also led to the relative nasal bioavailability of 156.8% or 1.56 fold increase in absorption over the control group. All the enhancers showed significant absorption enhancement (p<0.05) with the highest effect observed with CS J. In order to estimate further the inhibitory effect of chitosans on proteolytic enzymes, the activities of trypsin and leucine aminopeptidase, two major proteolytic enzymes found in the the nasal mucosa, were investigated in vitro. The results show that both CS J and CS G did not have any inhibitory effects on these enzymes as opposed to aprotinin and bestatin, their respective specific inhibitors. As a result, the nasal absorption enhancement of chitosans may not involve protection of the peptide drug against proteolytic degradation by enzymes in the nasal cavity, but it may involve the direct effect of chitosans on the mucosal permeability. In conclusion, cationic polymer chitosans, particularly CS J, may have promising potential as an effective nasal absorption enhancer of sCT.

ภาสกร ภาสกรมหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....เภสัชกรรม.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ประภาพร.....วิเศษศิริ.....

สาขาวิชา.....เภสัชกรรม.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....*[Signature]*.....

ปีการศึกษา.....2540.....

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.

I would like to express my deep , sincere gratitude and appreciation to Assistant Professor Dr. Parkpoom Tengamnuay, my advisor, for his helpful and invaluable suggesstion, guidance and continuous encouragement through-out my study.

I am also indepted to Associate Professor Dr. Chuthamane Suthisang for allowing me an access to give her license to order RIA Kit of salmon calcitonin for my research.

I am so much in debt to the Chulalongkorn University and the University Developing Commissions (UDC) of Ministry of University Affairs for giving me the opportunity to study in the Master degree program and also providing the research facilities.

Also, I 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

I would like to express my infinite thanks and deepest gratitude to my family, especially my parents, for giving me the educational opportunity, love, care, and encouragement.. Very deep appreciation to Miss Aranya Waicharoen and Miss Nongluck Techarat for their friendship, sincerity and unique help in my the thesis work.

Finally, I would like to express my thanks to all of those whose name have not been mentioned and those who in one way or another have helped to make this thesis a reality.

CONTENTS

ABSTRACT (Thai).....	IV
ABSTRACT (English).....	V
ACKNOWLEDGEMENTS.....	VI
CONTENTS.....	VII
LIST OF TABLES.....	VIII
LIST OF FIGURES.....	XI
LIST OF ABBREVIATIONS.....	XV
CHAPTER	
I. INTRODUCTION.....	1
II. LITERATURE REVIEW.....	5
III. EXPERIMENTAL.....	32
Materials.....	32
Equipment.....	34
Methods.....	36
IV. RESULTS AND DISCUSSION.....	64
V. CONCLUSIONS.....	155
REFERENCES.....	159
APPENDICES.....	174
VITA.....	266

LIST OF TABLES

Tables	Page
1. Intranasal bioavailabilities of peptide and protein drugs.....	6
2. Strategies for improved nasal delivery of peptide and protein drugs.....	16
3. Absorption enhancers used for nasal of peptides and proteins.....	18
4. Sample solution prepared for experiment of Part I (1.1).....	41
5. Sample solution prepared for experiment of Part II (2.1) : inhibition of trypsin activity by chitosans and aprotinin.....	56
6. Calibration solution prepared for experiment of part II (2.2).....	61
7. Sample solution prepared for experiment of Part II (2.2) : inhibition of LAP activity by chitosans and bestatin.....	63
8. Percent of plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of 0.15 M isotonic phosphate buffer at various pH	72
9. Percent of plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of sCT alone (10 IU/Kg) at various pH.....	73
10. Percent of plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of sCT (10 IU/Kg) with 1% CS J at various pH.....	74
11. Percent of plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of sCT (10 IU/Kg) with 1% CS G at various pH.....	75

12. Comparison of percent total decrease in plasma calcium following intranasal administration of baseline group and control group at various pH (3.0-7.4).....	76
13. Comparison of percent total decrease in plasma calcium following intranasal administration of sCT with 1% chitosans at various pH (4.0-6.0).....	77
14. Percent plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of sCT (10 IU/Kg) with 1% CS J at various concentrations.....	103
15. Percent plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of sCT (10 IU/Kg) with 1% CS G at various concentrations.....	104
16. Comparison of percent total decrease in plasma calcium following intranasal administration of sCT with chitosans at various concentrations	105
17. Percent plasma calcium level (of initial value) of rats following nasal administration of sCT (10 IU/Kg) with 5% DM- β -CD and HP- β -CD(pH 7.4).....	111
18. Plasma sCT concentration (pg/ml) in rats following intravenous and intranasal administration of sCT with or without enhancers.....	118
19. Pharmacokinetic parameters of sCT with or without enhancers after intranasal administration compared with intravenous in rats.....	121
20. Comparison of relative pharmacological availability and bioavailability of plasma sCT with or without enhancers.....	123
21. Comparison of inhibitory effect of CS J at various concentration (pH 6.0) on trypsin activity.....	136

22. Comparison of inhibitory effect of CS G at various concentration (pH 6.0) on trypsin activity.....	137
23. Comparison of inhibitory effect of CS J at various concentration (pH 6.0) on leucine aminopeptidase activity.....	150
24. Comparison of inhibitory effect of CS G at various concentration (pH 6.0) on leucine aminopeptidase activity.....	151



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF FIGURES

Figure	Page
1. Schematic view of various cell type in the nasal respiratory epithelium.....	8
2. Amino acid sequences of salmon calcitonin.....	24
3. Chemical structures of chitin and chitosan.....	28
4. Diagrams of the surgical produre of the in vivo nasal absorption experiment.....	38
5. Absorption spectra of the orthocresolphthalein complexone (OCPC) solution in the presence of 2.5×10^{-5} M calcium at pH 10.0	65
6. Representative calibration curve of orthocresolphthalein complexone (OCPC) color reagent containing with calcium.....	67
7. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with or without 1% w/v chitosans compared with baseline group at pH 4.0.....	78
8. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with or without 1% w/v chitosans compared with baseline group at pH 5.0.....	79
9. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with or without 1% w/v chitosans compared with baseline group at pH 6.0.....	80

10. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with or without 1% w/v chitosans compared with baseline group at pH 3.0.....	81
11. Comparison of present plasma calcium following nasal administration of baseline groups at different pH (4.0-7.4).....	87
12. Histogram of the comparison of area under the curve from 0-240 min after nasal administration of baseline groups compared with control group at various pH (4.0-7.4).....	89
13. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT without enhancers at various pH (4.0-7.4)	91
14. Histogram of the comparison of percent total decrease in plasma calcium after nasal administration of sCT with or without 1% w/v chitosans (CS J and CS G) at various pH (4.0-6.0).....	93
15. Comparison of percent of plasma calcium of sCT with 1% w/v (CS J) at various pH (4.0-6.0).....	95
16. Comparison of percent of plasma calcium of sCT with 1% w/v (CS G) at various pH (4.0-6.0).....	98
17. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with or without CS J (pH 4.0) at various concentrations in (0.25-1.25 % w/v)	106
18. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with CS G (pH 6.0) at various concentration in (0.25-1.25 %).....	107

Figure	Page
19. Percent of plasma calcium versus time after nasal administration of sCT with or without 5% DM- β -CD and HP- β -CD (pH 7.4) compared with the baseline group.....	107
20. Histogram of the comparison of the average percent total decrease in plasma calcium after nasal administration of sCT with or without chitosans at various concentration and compared with 5% cyclodextrin group.....	112
21. Representative standard binding curve of plasma sCT concentration (pg/ml)	116
22. Plasma sCT concentration time profiles following nasal administration of sCT with or without enhancers.....	118
23. Absorption spectra of BAPA (2×10^{-5} M) and p-nitroaniline (6×10^{-5} M) in phosphate buffer at pH 6.0.....	128
24. Plot of p-nitroaniline concentration released as a function of time at various pH's.....	131
25. The pH -activity curves for the tryptic hydrolysis of BAPA : Plot of the final concentration of p-nitroaniline versus pH. values ...	131
26. Formation of p-nitroaniline as a function of substrate concentration following substrate incubation with trypsin during 240 min.....	133
27. Representative calibration curve of p-nitroaniline in 0.15 M phosphate buffer (pH 6.0).....	134
28. Formation of p-nitroaniline following incubation of BAPA with trypsin with or without CS J at various concentrations.....	137
29. Formation of p-nitroaniline following incubation of BAPA with trypsin with or without CS G at various concentrations.....	138

Figure**Page**

30. Absorption spectra of β -naphthylamine at concentration of 5×10^{-4} mg/ml at pH 6.0.....143
31. Plot of of β -naphthylamine concentration released as a function of time.....144
32. The pH -activity curves for the leucine aminopeptidase : Plot of the concentration of β -naphthylamine versus pH..... 145
33. Formation of β -naphthylamine as a function of substrate concentration following substrate incubation with LAP during 240 min..... 147
34. Representative calibration curve of β -naphthylamine in 0.15 M phosphate buffer (pH 6.0)..... 149
35. Formation of β -naphthylamine following incubation of Leu- β -NA with or without CS J at various concentrations..... 152
36. Formation of β -naphthylamine following incubation of Leu- β -NA with or without CS G at various concentrations..... 153

LIST OF ABBREVIATION

CT	=	Calcitonin
sCT	=	Salmon calcitonin
CS J	=	Chitosan, from Kyowa Technos Co., Ltd., Japan.
CS G	=	Chitosan Glutamate Salt, from Pronova Biopolymer, Drammen, Norway.
DM- β -CD	=	Dimethyl- β -cyclodextrin
HP- β -CD	=	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
IPB	=	Isotonic phosphate buffer
Ca	=	Calcium
OCPC	=	Orthocresolphthalein complexone
IU	=	International unit
IN	=	Intranasal
RIA	=	Radioimmunoassay
mosmole	=	Milliosmole
AUC	=	Area under the curve
%D	=	Total percent decrease in plasma calcium
%PA _{rel}	=	Percent of the relative pharmacological availability

$\%F_{abs}$	=	Percent of the absolute bioavailability
$\%F_{rel}$	=	Percent of the relative bioavailability
ANOVA	=	Analysis of variance
$^{\circ}C$	=	Degree celsius
ml	=	Milliliter
cm	=	Centimeter
M	=	Molar
μg	=	Microgram
μl	=	Microliter
r^2	=	Regression coefficient
SD	=	Standard deviation
UV	=	Ultraviolet
LAP	=	Leucine aminopeptidase
L-leu- β -NA	=	L-leucyl- β -naphthylamine
enz.	=	enzyme
BAPA	=	N- α -Benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide
BAEE	=	N- α -Benzoyl-L-arginine-ethylester