



ไคโตซานและไตรเมทิลไคโตซานกับการใช้ประโยชน์ทางเภสัชกรรม (Chitosan and trimethyl chitosan and their applications in pharmaceutics)

จำนวนหน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่อง 2.5 หน่วยกิต

ดร. ภาณุ สุภาวดี บุญทา

คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

หน่วยกิตการศึกษาต่อเนื่องแก่
ผู้ประกอบการวิชาชีพเภสัชกรรม

วัตถุประสงค์ (Objectives)

1. เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติของไคโตซานและไตรเมทิลไคโตซาน
2. เพื่อให้ทราบถึงการประยุกต์ใช้ของไคโตซานและไตรเมทิลไคโตซานในทางเภสัชกรรม

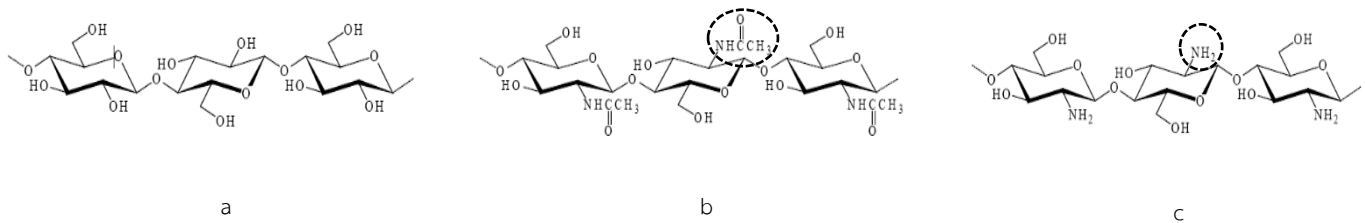
บทคัดย่อ

ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่นิยมนำมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาและสารช่วยทางเภสัชกรรมอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน แต่ด้วยข้อจำกัดเรื่องการละลายในสารละลายที่เป็นกรดเท่านั้น ส่งผลให้มีการสังเคราะห์ไตรเมทิลไคโตซานซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไคโตซานที่สามารถละลายได้ในน้ำและสภาวะกรดต่างในร่างกาย (physiological pH) มาเพื่อพัฒนาเป็นระบบนำส่งยาและสารช่วยทางเภสัชกรรมแทนเพื่อหลีกเลี่ยงข้อจำกัดของการใช้ไคโตซานดั้งเดิม ดังนั้นการเข้าใจถึงคุณสมบัติของไคโตซานและไตรเมทิลไคโตซานจะทำให้สามารถเลือกประยุกต์ใช้ในระบบนำส่งยาและเภสัชภัณฑ์ต่างๆ อย่างมีประสิทธิภาพ

คำสำคัญ: ไคโตซาน ไตรเมทิลไคโตซาน

บทนำ

ไคโตซาน (Chitosan) หรือ 2-Amino-2-deoxy-(1,4)- β -D-glucopyranan มีลักษณะเป็นแผ่นสีขาวหรือสีครีม ไม่มีกลิ่น บางครั้งอาจอยู่ในรูปผงหรือเส้นใย เป็นพอลิเมอร์ที่เตรียมได้จากปฏิกิริยาขจัดหมู่อะเซทิล (de-acetylation) ออกจากไคติน โดยการใช้ด่างเข้มข้นหรือเอนไซม์ โดยไคตินเป็นองค์ประกอบของเปลือกของสัตว์จำพวกกุ้ง ปู และแครงหมึก เป็นต้น ดังนั้นการผลิตไคโตซานถือเป็นการเพิ่มมูลค่าวัสดุเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็ง เนื่องจากไคตินนั้นเป็นพอลิเมอร์ที่มีมากเป็นอันดับสองในธรรมชาติรองจากเซลลูโลส ดังนั้นไคโตซานจึงจัดเป็นพอลิเมอร์ชีวภาพสำคัญที่มีมากในธรรมชาติอีกชนิดหนึ่งด้วย ความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส ไคติน และไคโตซาน แสดงดังรูปที่ 1 โดยแกนหลักของโมเลกุลของไคตินและไคโตซานมีโครงสร้างของสายโซ่โครงสร้างหลักที่เหมือนกัน แต่แตกต่างกันที่หมู่แทนที่คาร์บอนตำแหน่งที่สองในวงแหวนไพราโนส คือ หน่วยของไคตินมีหมู่แทนที่ คือ หมู่อะเซทาไมด์ (acetamide group, -NHC(O)CH_3) ขณะที่หน่วยของไคโตซานมีหมู่แทนที่ คือ หมู่อะมิโน (amino group, -NH_2)^(1, 2, 3, 4)

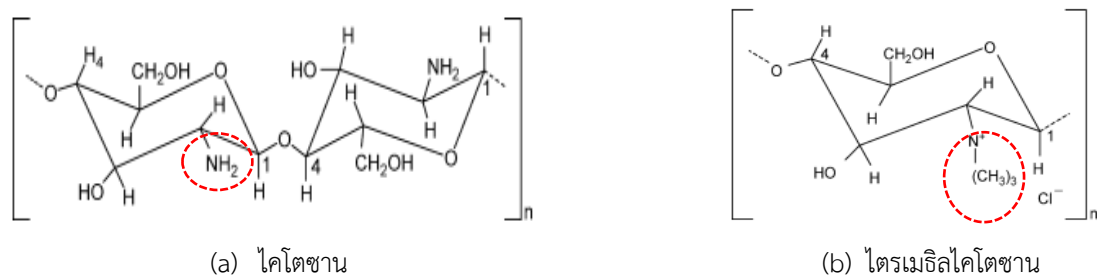


รูปที่ 1 โครงสร้างของเซลลูโลส (a) ไคติน (b) และไคโตซาน (c) ⁽³⁾

ไคโตซานสามารถละลายได้ในสารละลายกรดอินทรีย์อ่อน ได้แก่ กรดอะซิติก และกรดแล็กติก เป็นต้น เนื่องจากโครงสร้างของไคโตซานมีหมู่เอมีโน ($-NH_2$) และไฮดรอกซิล ($-OH$) เมื่อละลายในสารละลายกรดแล้วหมู่เอมีโนได้รับโปรตอนเกิดเป็นประจุบวก ($-NH_3^+$) สามารถเกิดแรงดึงดูดทางไฟฟ้าสถิตกับส่วนที่เป็นประจุลบของมิวซินทำให้ไคโตซานสามารถยึดติดเยื่อเมือกได้ หากอยู่ในสภาวะที่ไม่แตกตัวการยึดติดเยื่อเมือกจะเกิดจากพันธะไฮโดรเจนระหว่างหมู่เอมีโนและไฮดรอกซิลของไคโตซานกับมิวซินและแรงไฮโดรโฟบิก (hydrophobic interaction) นอกจากนี้ยังพบว่าการยึดติดเยื่อเมือกของไคโตซานขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight, MW) ประจุ (charge) และปริมาณการกำจัดหมู่อะเซทิล (degree of acetylation, DA) ของไคโตซานอีกด้วย

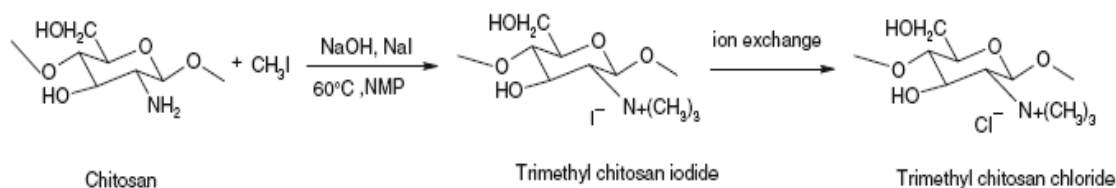
ไคโตซานเป็นพอลิเมอร์ที่สามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ มีความเป็นพิษต่ำ มีความเข้ากันได้ทางชีวภาพ และมีประจุบวกมาก นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการเกาะติดเยื่อเมือก (mucoadhesive) ทำให้ระบบนำส่งที่เตรียมด้วยไคโตซานสามารถเกาะติดอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้นานขึ้น ดังนั้นในทางเภสัชกรรมจึงมีการนำไคโตซานมาใช้ในการควบคุมการปลดปล่อยยาในเภสัชภัณฑ์รูปแบบต่างๆ เช่น เจล ยาเม็ดเคลือบฟิล์ม ไมโครพาร์ทิเคิล และไลโปโซม เป็นต้น อีกทั้งยังมีการนำไคโตซานมาใช้ในการนำส่งยาสู่ลำไส้ใหญ่ นำส่งยีน (gene) นอกจากนี้ในทางการแพทย์ยังมีการใช้ในวัสดุทดแทนกระดูก ใช้เป็น filling ในกระดูกและฟัน ใช้เป็นวัสดุปิดบาดแผลเพื่อกระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ และป้องกันการติดเชื้อจึงช่วยทำให้บาดแผลหายเร็วขึ้นและเป็นสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อนของเลือด (blood anticoagulant) และสารห้ามเลือด

ไตรเมทิลไคโตซาน (Trimethyl chitosan, TMC) เป็นอนุพันธ์ของไคโตซานที่เตรียมได้จากปฏิกิริยาการเติมหมู่เมทิล (methylation, quaternization) ที่ตำแหน่งหมู่เอมีโนของไคโตซาน โดยไตรเมทิลไคโตซานมีข้อดีเหนือกว่าไคโตซาน คือ สามารถละลายได้ดีในสภาวะกรด-ด่างในร่างกาย (physiological pH) และให้สารที่มีประจุบวก นอกจากนี้ไตรเมทิลไคโตซานยังมีประสิทธิภาพในการจับกับส่วนประกอบในรอยต่อที่หนาแน่นระหว่างเซลล์ (tight junction) ได้ดี ทำให้เปิด tight junction ได้ดีกว่าไคโตซาน ส่งผลให้ช่วยเพิ่มการซึมผ่านเมมเบรนของสารได้ดี ความแตกต่างของโครงสร้างทางเคมีของไคโตซานและไตรเมทิลไคโตซาน แสดงดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 โครงสร้างของไคโตซาน (a) และไตรเมทิลไคโตซาน (b) ⁽⁴⁾

กระบวนการสังเคราะห์ไตรเมทิลไคโตซานสามารถทำได้โดยการเติมเมทิลไอโอไดด์ภายใต้สภาวะที่เป็นต่างและอุณหภูมิสูง ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3



รูปที่ 3 การสังเคราะห์ไตรเมทิลไคโตซานจากไคโตซานภายใต้สภาวะที่เป็นต่างและอุณหภูมิสูง ⁽⁴⁾

โดยระดับการเติมหมู่เมทิลในโครงสร้างจะขึ้นอยู่กับจำนวนขั้นตอนในการเกิดปฏิกิริยา เมื่อระดับของหมู่แทนที่ (degree of quaternization, DQ) เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการเติมหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 3, 6 ของหมู่ไฮดรอกซี (O-methylation) ของไคโตซาน ทำให้การละลายน้ำของไตรเมทิลไคโตซานลดลง ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการสังเคราะห์ไตรเมทิลไคโตซานที่มีค่า DQ สูง แต่มี O-methylation ต่ำ โดยทั่วไปแล้วกระบวนการและขั้นตอนการสังเคราะห์ไตรเมทิลไคโตซานแบ่งเป็น 2 ปฏิกิริยา คือ reaction step และ addition step และในกระบวนการสังเคราะห์สามารถเปลี่ยนแปลงจำนวนขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาและชนิดเบสที่ใช้ และระยะเวลาที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาได้ เพื่อให้ได้ไตรเมทิลไคโตซานที่มีค่า DQ ตามต้องการ แต่มี O-methylation ต่ำ โดยสามารถประเมินค่า DQ ได้ดังรายละเอียดต่อไปนี้ ⁽⁵⁾

การประเมินค่า DQ ของไตรเมทิลไคโตซาน

นำไตรเมทิลไคโตซานคลอไรด์มาวิเคราะห์โดยใช้เครื่องเอ็นเอ็มอาร์ สเปกโตรมิเตอร์ (NMR Spectrometer) โดยจะวิเคราะห์จาก ¹H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectra โดยนำพอลิเมอร์ที่ได้ละลายในดิวทีเรียมออกไซด์ (deuterium oxide, D₂O) อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสแล้วทำการวิเคราะห์กราฟที่ได้ตามสมการดังต่อไปนี้

$$\% \text{ DQ} = \frac{[(\text{CH}_3)_3] / [\text{H}] \times 1/9}{1} \times 100 \quad (1)$$

DQ = degree of quaternization (percentage)

$[(\text{CH}_3)_3]$ = the integral of the chemical shift of trimethyl amino group at 3.3 ppm

$[\text{H}]$ = the integral of ¹H peak between 4.7 และ 5.7 ppm

นอกจากนี้ระดับการแทนที่ของหมู่เมทิลที่ตำแหน่ง 3- และ 6 hydroxyl สามารถคำนวณจากสเปกตรัมเคมีเคมี shifts ของ 3- และ 6- hydroxyl คือ 3.5 และ 3.4 ppm ตามลำดับ

ระดับของ O-methylation ของพอลิเมอร์ คำนวณจาก

DOM = degree of O-methylation (percentage)

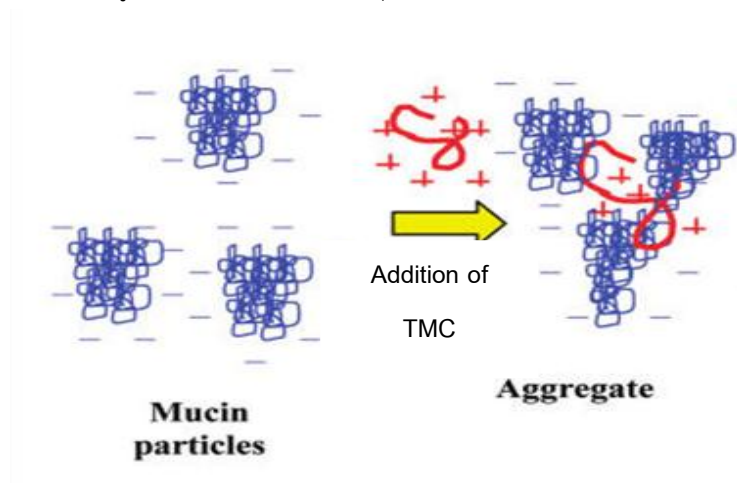
$[(CH_3)]$ = the integral of the chemical shift of methyl substitution for 3- or 6- hydroxyl group at 3.5 ppm or 3.4 ppm

$[H]$ = the integral of the 1H peak between 4.7 and 5.7 ppm

สมบัติของไทรเมธิลไคโตซาน

1. การเกาะติดกับเยื่อเมือก (Mucoadhesive)

Dewald Snyman และคณะ (ปี ค.ศ. 2003) ⁽⁶⁾ ได้ทำการศึกษาผลของค่า DQ ของไทรเมธิลไคโตซานในสภาวะที่เป็นกลางและเบสในหลอดทดลอง โดยใช้ออนุภาคมิวซินซึ่งเป็นโปรตีนหรือเยื่อเมือกในทางเดินอาหารมีประจุลบ ส่วนโครงสร้างของไทรเมธิลไคโตซานจะมีประจุบวกถาวร ผู้ทำการศึกษาจะเติมไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ 22.1 และ 48.8 เปอร์เซ็นต์ ที่มีมวลโมเลกุล 100,000 กรัมต่อโมล โดยเชื่อว่าประจุบวกของไทรเมธิลไคโตซานจะจับกับประจุลบของมิวซิน เกิดการเกาะกลุ่มกันเกิดขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4 คาดว่าในร่างกายมนุษย์ก็จะเกิดการยึดติดกับเนื้อเยื่อโดยกลไกนี้เช่นเดียวกัน



รูปที่ 4 กลไกการเกาะติดกับเนื้อเยื่อในหลอดทดลอง ⁽⁷⁾

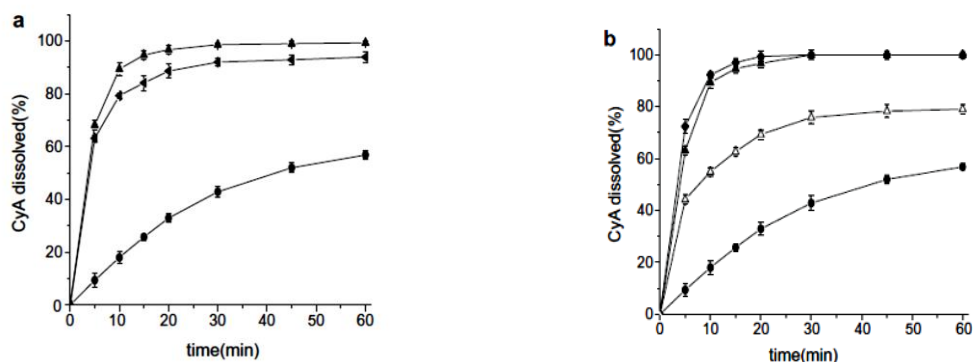
โดยพบว่าไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ 22.1 เปอร์เซ็นต์ มีคุณสมบัติในการเกาะติดเนื้อเยื่อได้ดีกว่าไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ 48.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ เพิ่มขึ้นจะทำให้คุณสมบัติในการเกาะติดเนื้อเยื่อลดลง เนื่องจากโมเลกุลของไทรเมธิลไคโตซานมีหมู่ quaternary amino ที่เป็นประจุบวกถาวรจะจับกับประจุลบของกรดไซอะลิก (sialic acid) บริเวณเนื้อเยื่อ ซึ่งการเกาะติดเนื้อเยื่อที่ลดลงเมื่อค่า DQ เพิ่มขึ้น อาจอธิบายได้ว่าประจุบวกถาวรที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ทำให้เกิดแรงผลักระหว่างสายพอลิเมอร์ทำให้พอลิเมอร์มีโครงสร้างที่เปลี่ยนไป หรือความยืดหยุ่นที่สายโซ่ของพอลิเมอร์ลดลงส่งผลให้การเกาะติดขึ้นเนื้อเยื่อลดลง หรืออาจเป็นไปได้ว่าหมู่เมธิลของไทรเมธิลไคโตซานมี steric effect บดบังประจุบวกของหมู่เอมิโนทำให้ไม่สามารถจับกับประจุลบของเนื้อเยื่อที่ผิวเซลล์ได้ด้วยปัจจัยต่าง ๆ ข้างต้นทำให้ไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ สูงมีคุณสมบัติในการเกาะติดกับเนื้อเยื่อที่ลดลง

2. การช่วยเพิ่มการละลาย (Enhance solubility)

Zhou และคณะ (ปี ค.ศ.2009) ⁽⁸⁾ ศึกษาการนำไทรเมธิลไคโตซานมาใช้เป็นสารช่วยในการละลายสำหรับยาที่ละลายน้ำได้น้อย โดยใช้ไทรเมธิลไคโตซานที่มีมวลโมเลกุล 200 และ 600 กิโลดาลตัน มีค่า DQ 60 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการศึกษานี้ใช้ยาไซโคลสปอริน เอ (Cyclosporine A) เป็นยาต้นแบบ และทำการศึกษาเปรียบเทียบการเตรียมยา 3 วิธี ได้แก่ วิธีที่ 1 solid dispersion ซึ่งทำโดยนำไทรเมธิลไคโตซานละลายในน้ำกลั่น ส่วนตัวยาก็ไม่ละลายน้ำละลายด้วยเอทานอล

เล็กน้อย จากนั้นเติมไตรเมธิลโคโตซานลงในสารละลายที่ได้ แล้วนำสารละลายที่ได้ไปลดความดันและเพิ่มอุณหภูมิเพื่อกำจัดตัวทำละลาย ส่วนตัวยาและไตรเมธิลโคโตซานที่เหลืออยู่ให้นำมาบดและผ่านแรงเพื่อเตรียมทำยาเม็ด วิธีที่ 2 co-grinding ทำโดยนำยาและไตรเมธิลโคโตซานมาบดผสมกันในโกรงกระเบื้อง จากนั้นนำไปผ่านแรงเพื่อเตรียมทำเป็นยาเม็ด และวิธีที่ 3 physical mixture ทำโดยนำยาและไตรเมธิลโคโตซานไปผ่านแรงจากนั้นนำมาผสมกันโดยใช้ spatula ซึ่งในขณะที่เตรียมยาผู้ที่ทำการศึกษาคือ ไตรเมธิลโคโตซานและยาในอัตราส่วน 1:1 1:3 และ 1:6

จากผลดังกล่าวสามารถอธิบายได้ว่าไตรเมธิลโคโตซานที่มีมวลโมเลกุลน้อยช่วยเพิ่มการละลายได้มากกว่า ไตรเมธิลโคโตซานที่มีมวลโมเลกุลมาก (ดังแสดงในรูปที่ 5a) เนื่องจากไตรเมธิลโคโตซานที่มีมวลโมเลกุลมากจะมีความหนืดมากส่งผลต่อการละลายทำให้ตัวยาละลายได้น้อยลง โดยกลไกช่วยเพิ่มการละลายคือ ไตรเมธิลโคโตซานช่วยทำหน้าที่เป็นตัวพาและหมู่ N-H ของยาจะจับกับ functional group ของไตรเมธิลโคโตซานช่วยให้ผงยาเปียกและกระจายตัวได้ดีขึ้น ส่งผลให้ละลายน้ำได้ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาเตรียมยาโดยวิธี solid dispersion และ co-grinding mixture มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน (ดังแสดงในรูปที่ 5b) นอกจากนี้ยังพบว่าขณะที่เตรียมด้วยวิธี solid dispersion และ co-grinding mixture จะทำให้ตัวยาเปลี่ยนแปลงจากรูปผลึกมาอยู่ในรูปอสัณฐานซึ่งจะช่วยเพิ่มการละลายของยาได้ดีขึ้น



รูปที่ 5 การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เทียบกับตำรับที่เตรียมโดยวิธี co-grinding mixture โดยอัตราส่วนของยาต่อไตรเมธิลโคโตซานเท่ากับ 1:3 (● = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อทดสอบการละลายโดยใช้ Apparatus ที่ 2 , ▲ = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อผสมไตรเมธิลโคโตซานที่มีมวลโมเลกุล 200 kDa และ ◀ = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อผสมไตรเมธิลโคโตซานที่มีมวลโมเลกุล 600 kDa) (a) และการเปรียบเทียบการละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อเตรียมโดยวิธีต่าง ๆ (b) (● = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อทดสอบการละลายโดยใช้ Apparatus ที่ 2 , ▲ = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อเตรียมโดยวิธี physical mixture, △ = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อเตรียมโดยวิธี co-grinding mixture และ ◆ = การละลายของยาไซโคลสปอริน เอ เมื่อเตรียมโดยวิธี solid dispersion)⁽⁸⁾

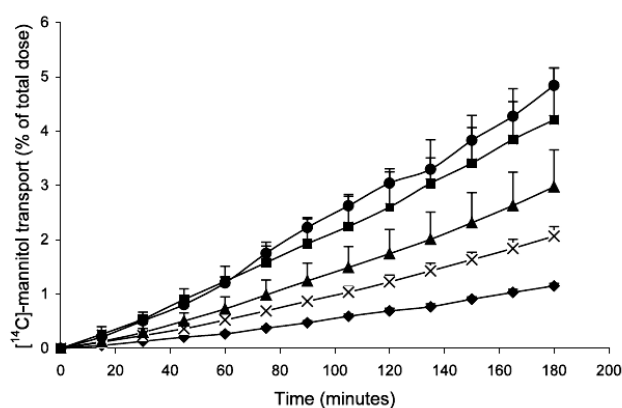
3. การช่วยเพิ่มการดูดซึม (Absorption enhancer)

Jonker และคณะ (ปี ค.ศ. 2002)⁽⁹⁾ ได้ทำการศึกษาการแพร่ผ่าน tight junction ของ [¹⁴C] mannitol เมื่อใช้ไตรเมธิลโคโตซานที่มีค่าเปอร์เซ็นต์ DQ เท่ากับ 22.1 (TMC-22), 38.1 (TMC-38), 42.8 (TMC-43) และ 48.8 (TMC-49) ตามลำดับ ที่ช่วงความเข้มข้น 0.0625 - 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยประเมินจากค่าสัมประสิทธิ์อัตราการแพร่ผ่านของสาร (apparent permeability coefficients (P_{app})) และอัตราส่วนของการเหนี่ยวนำการแพร่ผ่านของสาร (permeation enhancement ratios (R)) โดยทำการศึกษทั้งใน everted intestinal sacs และ single pass intestinal perfusion ที่ pH 7.4 โดย everted intestinal sacs นำหนูเพศผู้สุขภาพดี ศึกษาใน *in vitro* มาผ่าตัดนำลำไส้

ของหนูกออกมาอย่างรวดเร็วก่อนหนูจะตาย แล้วดูการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol โดยการเรืองแสงของ Beckman LS 3081 liquid scintillator แล้วนำมาคำนวณหาค่า P_{app} และ R ดังสมการต่อไปนี้⁽⁹⁾

$$P_{app} = \left(\frac{dc}{dt} \right) \left(\frac{1}{A \cdot 60 \cdot C_0} \right) \quad R = \frac{P_{app} \text{ test}}{P_{app} \text{ control}}$$

ส่วน single pass intestinal perfusion เป็นการศึกษาใน in situ โดยศึกษาในหนูเพศผู้สุขภาพดี หนูจะอยู่ในอ่างน้ำอุ่นตลอดเวลาระหว่างการทดลอง โดยทำการศึกษาเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กโดยดูการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol จาก การเรืองแสงของ Beckman LS 3081 liquid scintillator เช่นกัน แล้วนำมาคำนวณหาค่า P_{app} และค่า R เช่นกัน พบว่า การแพร่ผ่านของสารขึ้นกับค่า DQ และความเข้มข้นของไตรเมธิลโคโคซาน โดยไตรเมธิลโคโคซานที่มีค่า DQ 48.8% ที่ ความเข้มข้น 0.5% w/v ให้ผลดีที่สุดในการเพิ่มการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol (ดังแสดงในรูปที่ 6) ในการศึกษา everted intestinal sacs พบว่าการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol จะเพิ่มขึ้น ขึ้นกับค่า DQ ของไตรเมธิลโคโคซาน โดยพบว่าที่ pH 7.4 ไตรเมธิลโคโคซานที่มีค่า DQ 48.8 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านมากที่สุด ส่วน ไตรเมธิลโคโคซานที่มีค่า DQ 42.8 และ 48.8 เปอร์เซ็นต์ จะมีประสิทธิภาพที่ความเข้มข้นต่ำ ในที่นี้คือ 0.125 เปอร์เซ็นต์ โดย น้ำหนักต่อปริมาตร แต่เมื่อใช้ไตรเมธิลโคโคซานที่มีค่า DQ 22.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบว่ามีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่ม การแพร่ผ่านที่ pH 7.4 คือ สามารถแพร่ผ่านได้เพียงเล็กน้อยที่ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรเท่านั้น และไม่พบไตรเมธิลโคโคซานที่มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol ที่ความเข้มข้น 0.625 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จึงสามารถสรุปได้ว่าการใช้ไตรเมธิลโคโคซานที่มีค่า DQ 38.1, 42.8 และ 48.8 (ที่ ความเข้มข้น 0.125, 0.25 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) มีประสิทธิภาพในการช่วยเพิ่มการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการใช้ไตรเมธิลโคโคซานที่ความเข้มข้น 0.625 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อ ปริมาตร ไม่มีนัยสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแพร่ผ่านของ [¹⁴C] mannitol เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 6 ผลของค่าเปอร์เซ็นต์ DQ ของไตรเมธิลโคโคซานต่อการแพร่ผ่านของ [¹⁴C]mannitol (ไตรเมธิลโคโคซาน 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) โดยศึกษาใน single pass intestinal perfusion ที่ pH 7.4 (โดยกำหนด (◆) แทนกลุ่ม ควบคุม, (X) แทน TMC-22, (▲) แทน TMC-38, (■) แทน TMC-43 และ (●) แทน TMC -49)⁽⁹⁾

การนำไตรเมธิลโคโคซานมาประยุกต์ใช้ทางเทคโนโลยีเภสัชกรรม

Van der Merwe และคณะ (ปี ค.ศ. 2004)⁽²⁾ ได้ศึกษาสมบัติช่วยเพิ่มการดูดซึมของไตรเมธิลโคโคซาน ในรูปแบบ ตำรับยาเม็ดเล็กและแกรนูลที่บรรจุในแคปซูล โดยยาที่ใช้ในการศึกษาเป็นยาโปรตีนต้นแบบ คือ ยาเดสโมเฟรสซิน

(Desmopressin-8-D-arginine vasopressin monoacetate, DDAVP) เนื่องจากยามีค่าชีวประสิทธิผลต่ำเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ จึงถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้น้อย โดยผู้ทำการศึกษาศึกษาได้ศึกษาการปลดปล่อยของยา DDAVP และการปลดปล่อยของไตรเมธิลโคโตซานจากรูปแบบยาที่ศึกษา ซึ่งได้แก่ ยาเม็ดเล็กและแกรนูล ซึ่งในแต่ละรูปแบบยาก็มีตัวยาสำคัญ คือ DDAVP ใช้ Avicel PH-101 เป็นสารช่วยเพิ่มปริมาณและสารช่วยแตกกระจายตัว Ac-Di-Sol ทำหน้าที่เป็น superdisintegrant เติมไตรเมธิลโคโตซานเพื่อช่วยเพิ่มการดูดซึมของตัวยาสำคัญ ส่วน Tetraglycerol pentastearate (TGPS) จะเติมเฉพาะตำรับที่เตรียมในรูปแบบยาออกฤทธิ์เน้นเพื่อชะลอการปลดปล่อยตัวยาสำคัญ

โดยสรุปจากการศึกษาพบว่ากลไกที่มีส่วนช่วยในการดูดซึมยาสำหรับการศึกษานี้คือ กลไกการเกาะติดกับเนื้อเยื่อและกลไกการช่วยเพิ่มการละลาย ซึ่งไตรเมธิลโคโตซานมีความสามารถในการเกาะติดกับเนื้อเยื่อได้ดีและสามารถช่วยเพิ่มการละลายได้ โดยหากเตรียมยาในรูปแบบปลดปล่อยทันทีตัวยาก็จะละลายออกมาจนหมดในเวลา 5 นาที แต่หากเตรียมยาในรูปแบบออกฤทธิ์เน้นการละลายจะขึ้นอยู่กับปริมาณของไตรเมธิลโคโตซาน โดยถ้าปริมาณของไตรเมธิลโคโตซานมาก ยาจะละลายได้มากและถ้าปริมาณของไตรเมธิลโคโตซานน้อย ยาจะละลายได้น้อยเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามตัวยาก็จะละลายออกมาได้สูงสุดที่เวลา 60 นาที นอกจากนี้ตำรับที่เตรียมในรูปแบบของแกรนูล ตัวยาก็จะละลายออกมาได้เร็วกว่าที่เตรียมอยู่ในรูปแบบยาเม็ดเล็กชนิดออกฤทธิ์เน้น และเนื่องจากแต่เดิมหากไม่มีไตรเมธิลโคโตซานทำหน้าที่ขยาย tight junction ยาที่จะละลายออกมาจะถูกเอนไซม์ที่อยู่บริเวณลำไส้เล็กทำลายอย่างรวดเร็ว ทำให้ยามีค่าชีวประสิทธิผลต่ำ ดังนั้นเพื่อให้ได้ตำรับที่มีประสิทธิภาพดี ควรให้ไตรเมธิลโคโตซานละลายออกมาก่อนที่ตัวยาก็จะละลาย เพื่อให้ไตรเมธิลโคโตซานทำหน้าที่ขยาย tight junction เมื่อยาละลายออกมาก็จะสามารถดูดซึมผ่าน paracellular pathway เข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งเป็นการเพิ่มชีวประสิทธิผลของยาให้ดียิ่งขึ้น ในปัจจุบันมีรายงานวิจัยที่มีการนำไตรเมธิลโคโตซานในรูปแบบต่างๆ มาเป็นสารช่วยนำส่งและเพิ่มการดูดซึมร่วมกับยาหรือโปรตีนชนิดต่างๆ รายละเอียดแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ตัวอย่างการใช้ไตรเมธิลโคโตซานเป็นสารช่วยนำส่งและเพิ่มการดูดซึมร่วมกับยาหรือโปรตีนชนิดต่างๆ (ดัดแปลงข้อมูล^{4, 10, 11, 12})

รูปแบบที่ทำการศึกษา	ยาหรือโปรตีนที่ใช้	รูปแบบการให้	การทดลอง
Nanoparticles	Insulin	Oral delivery	<i>in vitro</i> ใน Caco-2 cell
Microparticles	Insulin	Pulmonary delivery	<i>in vivo</i> ในหนู
Microparticles	Diphtheria toxoid	Pulmonary delivery	<i>in vivo</i> ในหนู
Nanoparticles	Thymopenthin	Oral delivery	<i>in vivo</i> ในหนู
Nanocomplexes, nanoparticles	Insulin	Oral delivery	-
Absorption enhancer	Desmopressin	Oral delivery	<i>in vitro</i> ใน everted intestinal
Absorption enhancer	Monocaprin และ melitin	Oral delivery	<i>in vitro</i> ใน Caco-2 cell
Nanoparticles	Influenza subunit antigen	Nasal delivery	<i>in vivo</i> ในหนู
Absorption enhancer	Ovalbumin	Nasal delivery	<i>in vivo</i> ในหนู
Microparticles	Ovalbunin	Oral delivery	<i>in vivo</i> ในหนู

ความปลอดภัยของไทรเมธิลไคโตซาน

Thanou และคณะ (ปี ค.ศ. 1999)⁽¹³⁾ ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้ไทรเมธิลไคโตซานที่มี ค่า DQ 20, 40 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (โดยใช้ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) เป็นสารช่วยเพิ่ม การดูดซึม โดยอาศัยกลไกการเปิด tight junction ทำการศึกษาโดยใช้ intestinal Caco-2 cell monolayers และใช้ Confocal Laser Scanning Microscopy Visualization เป็นตัวตรวจวัดการเรืองแสงของตัวชี้วัด Texas red dextran (มวลโมเลกุล 10,000 ดาลตัน) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่มีสีแดงจะเกิดการเรืองแสงในช่องทางขนส่งแบบ paracellular pathway และ YO-PROTM-1 เป็นสารเรืองแสงที่มีสีเขียว ซึ่งจะเกิดการเรืองแสงเพื่อจับกับนิวคลีอิกแอซิดภายในเซลล์ แสดงถึงการถูกทำลายของผนังเซลล์เมมเบรน

จากผลการศึกษาการใช้ไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ 60 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลการเปิด tight junction และผลความเป็นพิษต่อเซลล์ไม่แตกต่างจากการใช้ไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ 40 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบการเปิด tight junction เมื่อใช้ไทรเมธิลไคโตซานที่มีค่า DQ 20 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งไม่พบความเป็นพิษต่อ Caco-2 cell ดังนั้นจึงมีความปลอดภัยหากมีการพิจารณานำไทรเมธิลไคโตซานมาใช้เป็นสารช่วยทางเภสัชกรรม

สรุป

ไคโตซานและไทรเมธิลไคโตซานเป็นสารที่มีสมบัติเกาะติดกับเยื่อเมือก (mucoadhesive) และช่วยเพิ่มการดูดซึม (absorption enhancer) ของสารโดยผ่านกลไกการเปิด tight junction ซึ่งพอลิเมอร์ทั้งสองชนิดนี้เหมาะสำหรับนำมาใช้ในระบบนำส่งยาทางเภสัชกรรม โดยสมบัติดังกล่าวของไคโตซานขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล (MW) ประจุ (charge) และปริมาณการกำจัดหมู่อะเซทิล (DA) ในขณะที่สมบัติทั้งสองข้างต้นของไทรเมธิลไคโตซานนั้นขึ้นกับน้ำหนักโมเลกุล (MW) และค่าเปอร์เซ็นต์ DQ

เอกสารอ้างอิง

1. Thanou M, Verhoef JC, Junginger HE. Oral drug absorption enhancement by chitosan and its derivatives. ADDR 2001 Nov 5;52(2):117-26.
2. Van der Merwe SM, Verhoef JC, Kotzé AF, Junginger HE. N-Trimethyl chitosan chloride as absorption enhancer in oral peptide drug delivery. Development and characterization of minitab and granule formulations. ADDR 2004 Jan;57(1):85-91.
3. การสังเคราะห์ไคตินและไคโตซาน [homepage on the internet]. Bangkok: MTEC; date unknown [revised 2008; cited 2009 Dec 30]. ไคตินและไคโตซาน; [3screens]. Available from: www.mtec.or.th/th/images/pdf/chitin-chitosan/chapter3.pdf
4. Mourya VK, Inamdar NN. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. J master Sci: Master Med. 2009;20:1057-79.
5. Polnok A, Borchard G, Verhoef JC, Sarisuta N, Junginger HE. Influence of methylation process on the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride. Eur J Pharm Biopharm. 2004;57:77-83.
6. Snyman D, Hamman JH, Kotzé AF. Evaluation of the mucoadhesive properties of N-trimethyl chitosan chloride. Drug Dev Ind Phar. 2003;29(1):61-9.

7. Sogias IA, Williams AC, Khutoryanskiy VV. Why is chitosan mucoadhesive? *Biomac*. 2008 Jul;9(7): 1837-42.
8. Zhou X, Hu Y, Tian Y, Hu X, Effect of N-trimethyl chitosan enhancing the dissolution properties of the lipophilic drug cyclosporin A. *Carbohydr. Polym*. 2009;76:258-90.
9. Jonker C, Hamman JH, Kotzé AF. Intestinal paracellular permeation enhancement with quaternised chitosan: in situ and in vitro evaluation. *Int. J. Pharm*. 2002;238:205-13.
10. Boontha S, Junginger HE, Waranuch N, Polnok A, Pitaksuteepong T. Chitosan and trimethyl chitosan particles as oral vaccine delivery systems: comparison of the potential to initiate immune responses. *JMMM*, 2011;21(1): 43-7.
11. Boonyo W, Junginger HE, Waranuch N, Polnok A, Pitaksuteepong T. Chitosan and trimethyl chitosan chloride (TMC) as adjuvants for inducing immune responses to ovalbumin in mice following nasal administration. *J Control Release*. 2007;121:168-75.
12. Amidi M, Romeijn SG, Verhoef JC, Junginger HE, Bungener L, Huckriede A, Crommelin DJ, Jiskoot WN. Trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: Biological properties and immunogenicity in a mouse model. *Vaccine*, 2007;25(1): 144-53.
13. Thanou MM, Verhoef JC, Romeijn SG, Nagelkerke JF, Merkus FW, Junginger HE. Effects of N-trimethyl chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on Caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea. *Int J Pharm*. 1999;185:73-82