

## VỀ ĐỘ ĐỘC CỦA CHITIN VÀ CHITOSAN

Trịnh Bình

Đại học Y khoa Hà Nội - Bộ Y tế

Phạm Lê Dũng

Viện Hoá học - Trung tâm Khoa học Tự nhiên và Công nghệ Quốc gia

Cao Văn Diễm

Viện Trang thiết bị và Công trình y tế - Bộ Y tế

### Abstract:

#### THE TOXICITY OF CHITIN AND CHITOSAN

*Before 1990, the toxicity of chitin, chitosan has been done only on the small animals (rat, mice, rabbit, chicken...). After 1994, the lethal response in dogs by severe hemorrhagic pneumonia is caused by chitosan subcutaneous administration at the 200 mg/kg dose; the fairly serious toxicity of chitosan has been conceded due to the stimulation of immune system. The number of amino groups (-NH<sub>2</sub>) is the important factor corresponding to the intensity of complement activation C3.*

Chitin đã được biết đến từ rất lâu, nhưng chỉ từ 1970, sau khi J. F. Prudden phát hiện khả năng chữa lành vết thương của bột chitin [1], người ta mới tập trung vào nghiên cứu ứng dụng chitin và dẫn xuất - một loại polyme thiên nhiên cuối cùng.

Về bản chất hoá học và nguồn gốc của chitin, chitosan xin xem thêm [2,3]. Cần chú ý đến sự khác nhau về bản chất cấu tạo hoá học của chitin và chitosan. Chitin, trung hoà điện, chỉ có khoảng dưới 10% nhóm amino (-NH<sub>2</sub>) ở C2, còn lại hơn 90% là nhóm N-axetyl (-NHCOCH<sub>3</sub>); nhưng chitosan, một cationit, có khoảng 70-90% nhóm amino. Sự khác nhau này sẽ dẫn đến những tính chất vật liệu khác nhau.

Chitin là sản phẩm của tự nhiên. Chitosan hầu hết là sản phẩm nhân tạo từ chitin. Tuy rằng rất nhiều ứng dụng (applications) của chúng đã được phát hiện, nhưng cho đến nay chỉ một vài ứng dụng đó được phép đưa vào sản phẩm (approvals) để ứng dụng trên cơ thể người - Vì sao như vậy?

Theo thời gian và tuỳ thuộc vào vật và cách thử nghiệm, người ta đã dần dần phát hiện ra những mặt lợi và bất lợi của chitin và chitosan.

#### Độ độc LD<sub>50</sub> của chitosan

Cách dùng	LD <sub>50</sub> (g/kg)	Vật thử	Tài liệu
Uống	1,5	Chuột lớn	[4, 5]
Dưới da	10	Chuột nhỏ	[4, 5]
Trong màng bụng	5,2	Chuột lớn	[4, 5, 6]
Trong màng bụng	3,0	Chuột nhỏ	[4, 5]

Người ta cũng đã cho gà, thỏ, gà con uống cả chitin, chitosan; 2 loại này đều được tiêu hoá tốt, không có hiện tượng khác thường nào xảy ra, nhưng cho đến nay chưa có số liệu nào về sự chuyển hoá chitin và chitosan ở ruột người, cũng như sự hấp thụ các oligome này qua ruột vào máu [7]. Chitosan cũng được phép sử dụng làm chất phụ gia thực phẩm (food additives) (Nhật) và trong thành phần chất ăn kiêng, chống béo phì (diet food) (Mỹ, Nhật, Nam Triều Tiên) [8] nhưng cả hai sản phẩm trên đều được sử dụng với liều lượng chitosan rất nhỏ.

Những nghiên cứu độc tính cấp đã được thực hiện trước đây (đến 1990) chỉ đối với những động vật nhỏ, chưa thấy làm trên động vật lớn như chó, bò... Nhưng gần đây, (vì màng chitosan đã được quen dùng dành cho chữa vết thương động vật, còn màng chitin được dùng cho cả cơ thể người), khi chữa cho 2 con chó rừng bị tai nạn giao thông [9] thì cả 2 đều bị chết vì xung huyết phổi. Từ đó, một nhóm nhiều giáo sư chuyên ngành (hoá học, giải phẫu, thú y, miễn dịch học...) cùng tiến hành nhiều nghiên cứu trên chó và kéo dài trong nhiều năm (1994-2000) để làm rõ hiện tượng này; xem xét kỹ lưỡng các ảnh hưởng của chitosan (loại nguyên liệu, kích thước hạt, độ axetyl hoá  $\overline{DA}$ , xử lý nguyên liệu), các triệu chứng lâm sàng, X-quang, chỉ số máu, nhiệt độ, mổ bệnh phẩm, xét nghiệm mô học [9,10], chitin đưa vào máu [11], chitosan đưa vào dưới da [12], chitosan gây sự biến động hệ thống bạch cầu (PMN) [12, 13, 14].

Người ta đã sử dụng chitosan  $\overline{DA} = 18\%$  (nghĩa là 82% nhóm  $-NH_2$ ) cỡ hạt khoảng  $5\mu m$ , đã khử trùng bằng etylen oxyt, tiêm vào dưới da vùng cổ (trong dung dịch muối sinh lý) với liều lượng chitosan tăng dần 0 mg (đối chứng - 50 ml dung dịch muối sinh lý), 30, 50, 80, 100, 150, 200 mg/kg chó, trên 24 con chó khoẻ mạnh (7-11 kg); với lô nhỏ hơn 30 mg/kg chó, không có hiện tượng gì khác thường. Nhưng các triệu chứng bỏ ăn, thờ ơ, khó thở tăng dần theo liều lượng sử dụng, với lượng chitosan 150mg/kg chó đã có con chết và với lô 8 con ở liều 200 mg/kg chitosan, có 7 con chết ngay sau 4 và 9 ngày (88,9%) chỉ 1 con sống sót đến ngày thứ 11 với các triệu chứng như trên rất nặng. Mổ các con chó chết, tất cả đều vì xung huyết phổi.

Các tác giả này đã nghiên cứu cơ chế tác động đến hoạt động bổ thể C3 của cả chitin và chitosan trên chó (hoạt động bổ thể C3 - một loại biến chứng theo đường C3 vào phổi) và đã kết luận:

- Khi xử lý dưới da bằng chitosan ( $\overline{DA} = 18\%$ ) ở mức 200 mg/kg, tất cả chó đều chết vì xung huyết phổi, nhưng với chitin ( $\overline{DA} > 72\%$ ), cũng với liều lượng này thì chó không chết.

- Nguyên nhân chính đóng vai trò quan trọng của sự khác biệt này là chitin, chitosan tuy cũng ở thể rắn (không tan, dạng hạt khoảng  $5\mu m$  trong dung dịch muối sinh lý) nhưng chitosan có nhiều nhóm amino ( $-NH_2$ ) hơn, làm tăng tương ứng các hoạt động bổ thể C3 (complement activation); còn ở vật nhỏ như chuột để có cùng một mức hoạt động bổ thể C3 như ở chó, cần lượng chitosan tăng lên 5 lần [15].

Những triệu chứng bỏ ăn, không sốt, suy giảm khả năng hô hấp, xung huyết phổi ở chó đều rất giống các triệu chứng suy giảm hô hấp ở người lớn, cho đến nay đã làm chết nhiều người mà chưa có biện pháp nào chữa khỏi [17, 20].

Theo các số liệu về mô học, sự tích tụ neutrophil ở phổi do chitosan là rõ ràng. Một trong những cơ chế gây xung huyết phổi do chitosan được hiểu như sau: các neutrophil sinh ra những enzyme như collagenase đã phá vỡ các thành tế bào máu [10b].

Cả  $\overline{DA}$  và trọng lượng phân tử của chitosan đã có ảnh hưởng lớn đến độ độc; khi tăng  $\overline{DA}$  (tức giảm số nhóm  $-NH_2$ ) sẽ giảm đáng kể độ độc của chitosan [10c].

S. Tokura, một chuyên gia đầu ngành và chủ tịch của nhiều hội nghị thế giới về chitin/chitosan đã nhấn mạnh: độ độc của chitosan, đặc biệt loại có 70-89% nhóm  $-NH_2$ , là khá nghiêm trọng, khi sử dụng nó làm các vật liệu y học phải đảm bảo tuyệt đối an toàn vì có sự kích động đến hệ thống miễn dịch [19].

Chính vì thế J. McCurdy, một thành viên của FDA (US) đã viết một mục lớn: "Vì sao chitosan không được thừa nhận là an toàn - Why isn't Chitosan considered Generally Recognized As Safe (GRAS) tham luận tại hội nghị thế giới lần thứ 5 về chitin/chitosan tại Mỹ (Princeton) [21, 22].

**SO SÁNH TÁC DỤNG LÀM LÀNH VẾT THƯƠNG  
CỦA *CHITIN* ĐỐI VỚI *CHITOSAN***

Tên Các chỉ tiêu	Chitin	Chitosan
<b>Monome</b>	<b>N-axetyl-D-glucosamin (NADG)</b> - thành phần cơ bản <b>không thể</b> thiếu được của da người.	<b>D-glucosamin</b> - ít có khả năng làm lành vết thương, khi chitosan có $\overline{DA} \neq 0$ . - <b>không</b> làm lành vết thương khi chitosan thuần khiết ( $\overline{DA} \sim 0$ ).
<b>Nguồn gốc</b>	Thiên nhiên	Nhân tạo
<b>Trữ lượng</b>	Thứ hai sau xenlulô khoảng 100 tỉ tấn/năm.	Hầu như không.
<b>Vai trò trong thiên nhiên</b>	<b>Vỏ bảo vệ</b> (vỏ tôm, vỏ cua, vỏ côn trùng, vỏ nhông, vỏ nấm, vỏ một loài sấu ở đáy biển... kể cả vỏ (da) người.	<b>Không</b>
<b>Độ kết tinh</b>	<b>Rất cao</b> do -N <sub>2</sub> COCH <sub>3</sub> ở C2 làm tăng liên kết hydrogen giữa các mạch và trong mạch	Gần như vô <b>định hình</b> khi $\overline{DA}=0$ do NH <sub>2</sub> ở C2.
<b>Men lysozyme</b>	Bị men lysozyme phân giải thành NADG (và tương tự)	<b>Không</b> (chỉ bị các men có trong động vật (bovin, canin...) phân giải.
<b>Sẹo và Độ bền vết thương (wound tensile strength)</b>	<b>Lớn hơn</b> của chitosan do đó ít hoặc không gây sẹo. Đặc điểm nổi bật nhất của chitin là hầu như <b>không để lại sẹo</b> nhìn thấy	Trọng lượng phân tử của chitosan luôn luôn nhỏ hơn nhiều lần của chitin, do xử lý với NaOH 45%, nên vết thương <b>dễ bị co kéo tạo sẹo</b> .
<b>Độ độc</b> với 200 mg/kg chó.	Chấp nhận được.  <b>Sống</b>	Khá nghiêm trọng, tác động lên hệ miễn dịch  <b>Chết</b>
<b>Công nghệ chế tạo</b>	Đơn giản hơn	Phức tạp Tốn vốn đầu tư (tốn hoá chất, tốn nước rửa, tốn nhân công, tốn thiết bị).
<b>Môi trường</b>	Ít gây ô nhiễm.	Gây ô nhiễm do NaOH ở nồng độ cao.
<b>Thị trường thế giới</b>	Đã dùng cho người	Chỉ dùng cho động vật
<b>Chất lượng</b>	Tốt hơn.	Kém hơn
<b>Giá cả</b>	Rẻ hơn.	Đắt gấp 3 lần của chitin.

\*  $\overline{DA}$  (degree of acetylation)= độ axetyl hoá, cũng có nghĩa là mức độ *giống chitin*.

Cho đến nay, người ta còn rất dè dặt trong việc sử dụng trực tiếp chitin, chitosan trên cơ thể người, như:

- Chất phụ gia thực phẩm (food additive): chỉ một lượng rất nhỏ để bảo quản thực phẩm, trong các loại dưa muối từ thực vật chỉ có 0,025% chitosan, trong nước chấm 0,1% trong tinh bột hấp chín 0,2%.

- Mức an toàn thực phẩm qua khảo sát về tác động sinh trường, chỉ số máu, chức năng gan của chuột được đề nghị như sau: 10% với chitin, 5% với chitosan  $\overline{DA}=25\%$  còn 2,5% với  $\overline{DA}=10\%$ .

- Chất chống béo phì (diet): với hàm lượng chitosan chỉ khoảng 2%.

- Màng chữa lành vết thương: Mỹ và Nhật là những nước khởi xướng và dẫn đầu trong việc nghiên cứu ứng dụng chitin/chitosan, chưa có nước nào cho phép sử dụng màng chitosan để chữa lành vết thương (wound healing) ở con người mà chỉ dùng cho động vật; còn màng chitin (Beschitin, Chitipack) đã được phép dùng cho con người [16, p.49] Glycoprotein và glycoaminoglycan là 2 nhân tố quyết định cho việc tạo thành mô liên kết (connective tissue) để gắn liền vết thương [25]. Cả 2 chất này đều cần có N-acetyl-D-glucosamin (monome của chitin) chứ không phải là D-glucosamin (monome trong chitosan). Vai trò độc tôn (uniqueness) làm lành vết thương [26] của chitin nguyên (unmodified chitin, chưa bị biến đổi thành dẫn xuất, kể cả chitosan) đã được nhiều tác giả có kinh nghiệm thừa nhận [26, 27, 28]. Mặt khác, màng VINACHITIN đã được sản xuất theo phương pháp mới, đơn giản và rẻ tiền hơn phương pháp của Nhật [2, 3]; hơn nữa, chitosan gây chết chó, do đó việc chỉ dùng CHITIN làm màng sinh học chữa lành các vết thương ở người là hợp lý và an toàn hơn.

#### Tài liệu tham khảo

- [1] J. F. Prudden et al. The discovery of a potent pure chemical wound-healing accelerator. American. J. Surgery, Vol. 119, p.560-4 (1970).
- [2] Phạm Lê Dũng et al. Tạp chí Hoá học, Vol. 39, N°2, p.21-27 (2001).
- [3] Phạm Lê Dũng et al. Advances in Natural Sciences, Vol. 1, N°1, p. 95-106 (2000).
- [4] Mita Y. Development and application of chitin and chitosan. Kogyo-gijyutsukai, Tokyo, p.248-249 (1987).
- [5] Seo H. Processing and utilisation of chitin and chitosan. Sen-i Gakkaishi, Vol. 46, p.564-69 (1990).
- [6] Onishi H. et al. Proceedings of 6th Intern. Conference on Chitin/Chitosan. Poland, p.304, (1994).
- [7] S. Hirano. Chitin biotechnology applications. Biotechnology Annual Review. Vol. 2, pp.237-258, (1996).
- [8] David N., S. Hon. Chitin and chitosan: Medical applications in: "Polysaccharides in Medicinal Application" (Ed. S. Dumitue). Marcel Dekker. pp. 638, (1996).
- [9] S. Minami et al. Chitosan causes a lethal response in dogs. Proceedings of 6th Intern. Conference on Chitin/Chitosan. Gdynia - Poland, p.387, (1994).
- [10a] S. Minami et al. Chitosan inducing hemorrhagic pneumonia in dogs. Carbohydrate Polymers. Vol. 29, p. 241-246 (1996).
- [10b] K. Miyatake, Y. Okamoto, Y. Shigemasa, S. Tokura, S. Minami. Anti-inflammatory effect of chemically modified chitin. In 'Chitin and Chitosan in Life Science'. Ed. By T. Uragami et al. Kodansha Scientific Ltd. Tokyo, 2001, p. 348.
- [10c] O. Smidsrod, K. M. Varum. Structure function relations in Chitosan. ibid. p.1-11

- [124] S. Minami et al. Systemic effect of chitin after intravenous administration to dogs. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 33, p. 243-249 (1997).
- [124] S. Minami et al. Subcutaneous injected chitosan induces systemic activation in dogs. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 33, p. 285-294 (1997).
- [113] Y. Usami, S. Minami... Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cell to release leukotiene B<sub>2</sub> and prostaglandin E<sub>2</sub>. *J. Biomed. Mater. Res.* Vol. 42, p.517-522 (1998).
- [114] Y. Usami, S. Minami... Effect of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine oligomers on canine polymorphonuclear cells in vitro. *Carbohydrate Polymers*, Vol.36, p. 137-141 (1998).
- [115] S. Minami et al. Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 36, p. 151-155 (1998).
- [116] Y. Shigemasa et al. Application of Chitin and Chitosan for Biomaterials. *Proceedings of the 3rd Asian - Pacific Symposium on Chitin/Chitosan*, Taipei-Taiwan, p.47-54 (1998).
- [117] Y. Suzuki, S. Minami et al. Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 42, p. 307-310 (2000).
- [118] Y. Suzuki, S. Minami et al. The Mechanism of Complement activities by chitin and chitosan. In *Chitin and Chitosan Research*, Vol. 7, N°2, p.126-127 (2001).
- [119] S. Tokura et al. Biological Activities of Biodegradable polysaccharide. *Macromol. Symp.* Vol. 101, p.389-396 (1996).
- [120] K. Miyatake, Y. Okamoto, S. Tokura, S. Minami. Anti-inflammatory effect of chemically modified chitin. *Proceedings of 8th International Conference on Chitin/Chitosan*, Sept./2000 (Japan), p.90, Preprint.
- [121] M. L. Weimer. An overview of the regulatory status and of the safety of chitin and chitosan as food and pharmaceutical ingredients. In *Advances in Chitin and Chitosan* (Ed. by C. J. Brine, P. A. Sandford and J. P. Zikakis). Elsevier Applied Science, London & New York, p.663-670 (1992).
- [122] John. D. Mc Curdy. US Food & Drug Administration. FDA and Use of Chitin and Chitosan Derivatives. *Ibid*, p. 659-662 (1992).
- [123] Deng Fwu Hwang et al. Evaluation of food safety for chitin and chitosan. *Proceedings of 3rd Asia-Pacific Chitin Chitosan Symposium*, Taiwan, p. 356 (1998).
- [124] K. Nishimura, S. Tokura et al. Immunological activity of chitin and its derivatives in *Studies on Chitin 1977-1988*. Hokkaido University Sapporo, Japan, p.129 (1989).
- [125] R. A. A. Muzzarelli et al. Medical and veterinary applications of chitin & chitosan. *Proceedings of 7th Intern. Conf. on Chitin/Chitosan*, Lyon - France, p.580 (1997).
- [126] R. A. A. Muzzarelli et al. Biochemical significance of exogenous chitin and chitosans in animals and patients. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 20, p. 1-10 (1993).
- [127] Y. Shigemasa, S. Minami. Applications of chitin and chitosan for biomaterials. *Biotech. Gen. Eng. Reviews*, Vol. 13, p. 384 (1995).
- [128] S. Tokura et al. Polymeric N-acetyl-D-glucosamine (chitin) induces Histionic Activation in Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* Vol. 55, N°5, p. 739 (1993).