

การเตรียมน้ำยางชั้นธรรมชาติที่มีโปรตีนก่อภูมิแพ้ต่ำ โดยการเติมอนุพันธ์เซลลูโลสที่ลดขนาดโมเลกุลให้เล็กลงโดยใช้รังสีแกมมา

ชยากริต สิริอุปถัมภ์^{1*} และ จริยา บุญญวัฒน์²

¹ภาควิชานิวเคลียร์เทคโนโลยี คณะวิศวกรรมศาสตร์ ²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 0 2218 6778 โทรสาร 0 2218 6780 E-Mail: chyagrit@chula.ac.th

บทคัดย่อ

ได้ทดลองเตรียมน้ำยางชั้นธรรมชาติที่มีโปรตีนก่อภูมิแพ้ต่ำ โดยการเติมอนุพันธ์เซลลูโลสโมเลกุลเล็ก 4 ชนิดคือ Carboxy Methyl Cellulose (CMC), Hydroxyl Ethyl Cellulose (HEC), Hydroxyl Propyl Cellulose (HPC) และ Methyl Cellulose (MC) ใช้วิธีฉายรังสีแกมมาเพื่อลดขนาดโมเลกุลของอนุพันธ์เซลลูโลส และหาขนาดโมเลกุลที่เหมาะสม เพื่อให้สามารถจับโปรตีนโมเลกุลเล็ก ซึ่งเป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ที่อยู่นานในอากาศและแยกออกไปจากน้ำยางได้เมื่อใช้เครื่องเหวี่ยง การฉายรังสีอนุพันธ์เซลลูโลสทำในรูปสารละลายน้ำความเข้มข้น 1.3% ที่ปริมาณรังสี 0.5-5.0 กิโลเกรย์ เมื่อนำสารละลายของอนุพันธ์เซลลูโลสที่มีขนาดโมเลกุลต่าง ๆ กันนี้ปริมาณ 2.0 phr เติมในน้ำยางชั้นธรรมชาติที่เจือจางด้วยน้ำเป็น 2 เท่า กวนและทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง นำไปเหวี่ยงที่ g.min ประมาณ 25,000 ได้ผลว่าขนาดโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืดของ CMC และ HEC ที่ 17-18 กิโลดาลตันสามารถลดปริมาณโปรตีนโมเลกุลเล็ก (14-94 กิโลดาลตัน) ในน้ำยางชั้นได้ โดยตรวจสอบไม่พบด้วยวิธี SDS PAGE

คำสำคัญ: น้ำยางธรรมชาติโปรตีนต่ำ อนุพันธ์เซลลูโลสโมเลกุลเล็ก การฉายรังสีอนุพันธ์เซลลูโลส

Preparation of Low Allergenic Protein Concentrated Natural Rubber

Latex Using Suitable Low Molecular Weight Cellulose Derivatives

Induced by Gamma Irradiation

Chyagrit Siri-Upathum^{1*} and Jariya Boonyawat²

¹Department of Nuclear Technology, Faculty of Engineering, ²Department of Biochemistry, Faculty of Science

Chulalongkorn University, Phone: 66 2218 6778, Fax: 66 2218 6780, E-Mail: chyagrit@chula.ac.th

Abstract

Low molecular weight carboxy methyl cellulose (CMC), hydroxyl ethyl cellulose (HEC), hydroxyl propyl cellulose (HPC) and methyl cellulose (MC) prepared by radiation-induced degradation were added into diluted natural concentrated latex prior to centrifuge for a purpose of reducing allergenic rubber protein in the latex. Optimum molecular weight (M_v) of CMC and HEC for such a purpose was found to be 17-18 kDa which decreased allergenic rubber protein (14-94 kDa) to an undetectable amount as determined by SDS PAGE method.

Keywords: Low Allergenic, Natural Rubber Latex, Cellulose, Gamma Irradiation

บทนำ

จากมาตรการกำหนดปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำ อันเป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้แบบเฉียบพลันในถุงมือยางขององค์การอาหารและยา สหรัฐอเมริกาและสหภาพยุโรป ให้มีได้ไม่เกิน 50 ไมโครกรัมต่อกรัม⁽¹⁾ นั้นทำให้มีการวิจัยเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวอยู่ในข้อกำหนดหลายๆ วิธีเช่นการล้างถุงมือยางขณะเป็น Wet Gel โดยใช้เอ็นไซม์⁽²⁾ การเคลือบผิวผลิตภัณฑ์ด้วยพอลิเมอร์บางชนิด การใช้เอ็นไซม์ย่อยโปรตีนในน้ำยางสดและปั่นแยกออก⁽³⁾ การใช้ยางขึ้นพรีวัลคาไนซ์ด้วยรังสีมาเติม Synthetic Water Soluble Polymer บางชนิดลงและปั่นแยกออก⁽⁴⁾ ก่อนนำไปขึ้นรูปเป็นถุงมือ ในการวิจัยนี้ได้ใช้อนุพันธ์ของโพลิเมอร์ธรรมชาติ 4 ชนิดคือ Carboxy Methyl Cellulose (CMC), Hydroxyl Ethyl Cellulose (HEC), Hydroxyl Propyl Cellulose (HPC) และ Methyl Cellulose (MC) ซึ่งมีขนาดโมเลกุลต่างๆกันมา Depolymerize ด้วยรังสีแกมมา เพื่อให้ละลายในน้ำได้ง่ายขึ้น และมีขนาดโมเลกุลเล็กพอเหมาะที่จะจับกับโปรตีนโมเลกุลเล็ก (14-94 kDa) บนผิวอนุภาคยางของยางขึ้นธรรมชาติซึ่งเป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้และแยกออกมาโดยการปั่น

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

- เครื่องฉายรังสีแกมมา ความแรงรังสี 5.8 kCi (BSV-06, Institute of Isotope, Hungary)
- Brookfield Viscometer (HAAKE)
- Capillary Viscometer (Schott Gmbh)
- เครื่องเหวี่ยงปรับอุณหภูมิ 0-25°C, Rotor Diameter 20 cm, 18,000 rpm, max. (Hitachi Koki, 20PR-52D)
- สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีนที่ละลายน้ำได้โดยวิธี Microtiter Plate อ่านค่า Absorbancy ที่ 600-750 nm โดยวิธี Modified Lowry
- สารเคมีและอุปกรณ์วิเคราะห์โปรตีน 14-94 kDa โดยวิธี SDS-PAGE

วิธีการ

1. การ Depolymerize อนุพันธ์ของเซลลูโลสชนิดต่างๆโดยใช้รังสีแกมมา

เตรียมสารละลายของ CMC, HEC, HPC และ MC ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยน้ำหนัก (M_w) 800, 250, 80 และน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยจำนวน (M_n) 14 kDa ตามลำดับโดยละลายในน้ำกลั่นให้มีค่าความเข้มข้น 1.3% ฉายรังสีแกมมาที่ Dose Rate 0.85 kGy/hr ปริมาณรังสี 0.5, 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0 kGy หาความหนืดของสารละลายที่ได้ด้วย Brookfield Viscometer ค่าความหนืดนี้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับน้ำหนักโมเลกุล สำหรับอนุพันธ์ของเซลลูโลสชนิดหนึ่งๆ

2. การหา Viscosity Average Molecular Weight (M_v) โดย Capillary Viscometer

ใช้วิธีหา Intrinsic Viscosity ด้วย Capillary Viscometer โดยใช้ 0.1 M NaCl และน้ำเป็นตัวทำละลายสำหรับ CMC และ HEC, HPC, MC ตามลำดับ หา Intrinsic Viscosity $[\eta]$ โดยสร้างกราฟระหว่าง $[\eta]_{sp}/C$ กับความเข้มข้นของสารละลายในหน่วย g/dl และลากเส้นเพื่อทำการประมาณค่านอกช่วง (Extrapolation) ไปยังจุดที่

ความเข้มข้นเป็นศูนย์ (Zero Concentration) ตามสมการของ Mark-Houwink: $[\eta] = k \times M^{\alpha}$ โดยใช้ค่า k และค่า α ตามรายงานการวิจัยของ Wrick, M.G.⁽⁵⁾ และรายงานการวิจัยของ Brown W. และคณะ⁽⁶⁾ คือสำหรับ CMC, $k = 1.8 \times 10^{-2}$, $\alpha = 0.97$ สำหรับ HEC, $k = 3.16 \times 10^{-3}$, $\alpha = 0.55$

3. การเติมสารละลายอนุพันธ์ของเซลลูโลสลงในน้ำยางข้นและปั่นแยกเอาโปรตีนบนผิวอนุภาคยางออก

ใช้สารละลายอนุพันธ์ของเซลลูโลสชนิดต่างๆ ที่ละลายเพื่อลดขนาดโมเลกุลลง ให้ได้ใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลของโปรตีนก่อนเติม คือประมาณ 14-43 kDa เติมลงในน้ำยางข้นธรรมชาติ (มีเนื้อยาง 60%) ที่เจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ให้มีเนื้อยางลดลงเป็น 30% ตามความเข้มข้นของน้ำยางสดจากสวน ให้มีปริมาณ 1, 2 และ 3 ส่วนต่อยาง 100 ส่วน (phr) กวน 1 ชั่วโมง และทิ้งไว้ค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงนำมาปั่นด้วยเครื่องเหวี่ยง 18,000 rpm ที่ 15°C นาน 1 ชั่วโมง แยกเอาส่วนของน้ำยางข้นด้านบนของหลอดปั่นออก เจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ให้มีเนื้อยาง 60% ตามมาตรฐานน้ำยางข้น ISO 2004

4. การเตรียมฟิล์มยางและสกัดโปรตีนที่ละลายน้ำได้จากฟิล์มยางเพื่อทำการวิเคราะห์

เจือจางน้ำยางข้นจากข้อ 3 ให้ได้ความเข้มข้นประมาณ 40% เพื่อให้ยางไหลได้ดีในแผ่นแก้วมีขอบขนาด 15x15 ซม. ที่เป็นแบบหล่อทิ้งให้น้ำยางแห้งที่อุณหภูมิห้องจนใส ตัดเป็นชิ้น ขนาด 1cm x 1cm ซึ่งน้ำหนักใส่ลงในขวด 200 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 เท่าของน้ำหนักยาง นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 ชั่วโมง โดยเขย่าขวดเป็นเวลา 15 วินาที ทุกๆ ครึ่งชั่วโมง กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 แล้วนำไปปั่นที่ 2,000 g เป็นเวลา 5 นาที เอาสารละลายที่ได้แช่แข็ง (-10°C) เก็บไว้ ก่อนนำไปวิเคราะห์หาปริมาณและตรวจสอบขนาดโมเลกุลโปรตีนที่ละลายน้ำได้

5. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำโดยวิธี Modified Lowry (ASTM D 5712-99)

ใช้สารละลายที่จะวิเคราะห์ 2.5 -40 μ l ให้เกิดปฏิกิริยากับสารละลาย NaOH 0.1 N 200 μ l ในหลุมของ Polystyrene Microtiter Plate เติมสารละลาย D ปริมาณ 75 μ l (1.5% CuSO_4 ใน 3% Sodium Citrate) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นจึงเติมสารละลาย A 25 μ l (Folin Reagent) กวนให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หาปริมาณโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในตัวอย่างโดยใช้เครื่อง Microplate Reader (Multiskan EX, LabSystems) ที่ 750 nm โดยใช้ Ovalbumin เป็นสารมาตรฐาน

6. การตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ละลายในน้ำในตัวอย่างโดยวิธี SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

ใช้วิธีตามรายงานของ Slater และคณะ⁽⁷⁾ โดยมีสารละลาย Polyacrylamide Gel 15% และ 3% เป็น Separating Gel และ Stacking Gel ตามลำดับ และใช้ Tris glycine (25mM Tris, 192mM glycine) กับสารละลาย 0.25 % SDS ที่ pH 8.3 เป็น Electrode Buffer สำหรับตัวอย่างจากข้อ 4 ที่จะนำมาตรวจสอบ ต้องตกตะกอนโปรตีนก่อนโดยนำตัวอย่างมา 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดพอลิพรอพิลีน ขนาด 10 มิลลิลิตร เติม Deoxychoate 0.4 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที แล้วจึงเติม Trichloroacetic Acid ปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร กวนและเติม 0.4 มิลลิลิตร ของ Phosphotungstic Acid กวนและทิ้งไว้ให้ตกตะกอน 30 นาที จากนั้นจึงนำไปปั่นที่ 4,500 rpm เป็นเวลา 45 นาที ละลายตะกอนโปรตีนโดย Tris Buffer ที่มีส่วนผสมของ 60mM Tris, 2% SDS, 25% v/v glycerol,

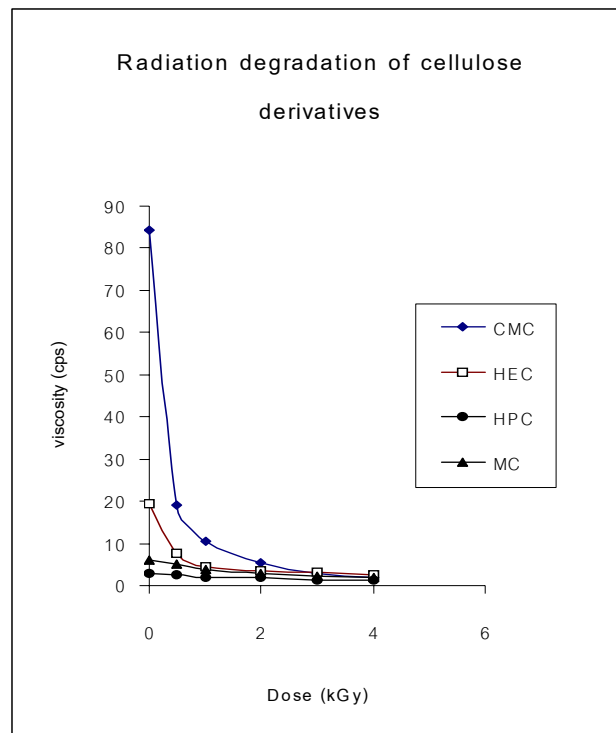
14.4mM 2-Mercaptoethanol และ 0.1% Bromophenol Blue คั้ม 5 นาที จึงนำไปหยดลงบนแผ่น Gel ทำ Electrophoresis (Mini-Protein, Hoefer mini VE) ที่กระแสไฟคงที่ 15 mA ใน Tris Glycine Electrode Buffer (25mM Tris, 192mM glycine) เมื่อทำ Electrophoresis สมบูรณ์แล้ว ย้อมสีแผ่น Gel โดยใช้ Coomassie Blue R-250

Molecular Weight Markers ใช้ α -Lactalbumin 14.4 kDa, Trypsin Inhibitor 20.1 kDa, Carbonic Anhydrase 30 kDa, Ovalbumin 66 kDa, Bovine Serum Albumin 66 kDa และ Phosphorylase B 97 kDa

ผลการทดลอง

1. ผลการ Depolymerize อนุพันธ์ของเซลลูโลสชนิดต่างๆ โดยใช้รังสีแกมมา

การทดลองของขนาดโมเลกุลของอนุพันธ์เซลลูโลสที่ใช้ในการทดลองที่ปริมาณรังสีต่างๆ พบว่าเป็นการลดลงแบบสมการเลขชี้กำลัง (Exponential) (รูปที่ 1) ที่ปริมาณรังสีมากกว่า 3 kGy ขนาดโมเลกุลจะลดลงอีกไม่มากนักและมีความหนืดเท่ากันหมดคือประมาณ 3 Centipois (cps)



รูปที่ 1 การลดลงของความหนืดและขนาดของโมเลกุลของสารละลายอนุพันธ์เซลลูโลส (1.3%) เมื่อฉายรังสีแกมมาที่ปริมาณรังสีต่างๆ

2. ผลการทำ Viscosity Average Molecular Weight (Mv) โดย Capillary Viscometer

อนุพันธ์ของเซลลูโลสที่ละลายน้ำได้และไม่ตกตะกอนที่อุณหภูมิสูงกว่า 55 °C พบว่ามีเพียงสองชนิดคือ CMC และ HEC เท่านั้น ซึ่งเป็นข้อจำกัดของ HPC และ MC ที่ไม่สามารถใช้ในเครื่องปั่นตกติในระดับอุตสาหกรรมได้ เนื่องจากเกิดการตกตะกอนขณะปั่น และจะไม่ใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 แสดงผลการหาหน้าหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Mv) ของ CMC และ HEC ที่ปริมาณรังสีต่างๆ ที่ปริมาณรังสี 2 และ 3 kGy และที่ 1-3 kGy จะให้ขนาดโมเลกุลของ CMC และ HEC ตามลำดับมีค่าใกล้เคียงกับขนาดโมเลกุลเฉลี่ยโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในน้ำยางธรรมชาติ จึงเลือกใช้ CMC ที่ขนาดโมเลกุล 62 และ 18 kDa และ HEC ที่ขนาดโมเลกุล 55 และ 17 kDa เติมลงในน้ำยางข้นธรรมชาติเพื่อทดลองใช้เป็น Latex Allergenic Protein Scavenger ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 1 ขนาดโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Mv) ของอนุพันธุ์เซลลูโลสหลังฉายรังสีที่ปริมาณต่างๆ

ชนิดของสารละลาย อนุพันธุ์เซลลูโลส (1.3%)	M _v (kDa)					
	0.5 kGy	1.0 kGy	2.0 kGy	3.0 kGy	4.0 kGy	5.0 kGy
CMC	135	110	62	18	16	14
HEC	90	55	21	17	16	16

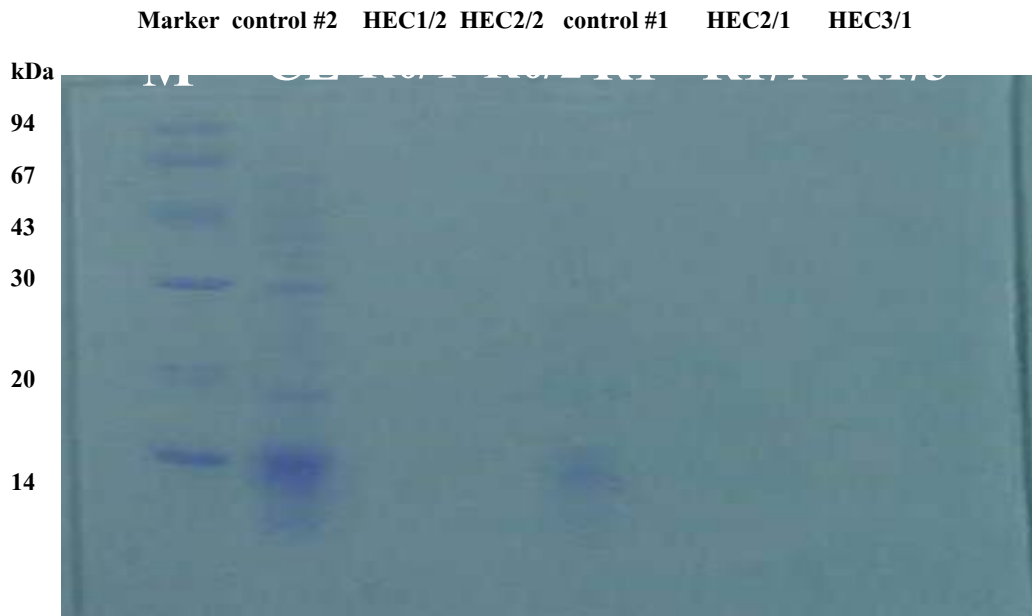
3. ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำในตัวอย่างสารละลายโปรตีนสกัดจากฟิล์มยางโดยวิธี Modified Lowry (ASTM D 5712-99)

ตารางที่ 2 ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำในตัวอย่างสารละลายโปรตีนสกัดจากฟิล์มยางที่เติมสารละลาย CMC หรือ HEC ในน้ำยางข้นและปั่นแยกโปรตีนที่ละลายในน้ำออกเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำในตัวอย่าง (μg/g rubber) *												
ตัวอย่าง ควบคุม	เติมสารละลาย CMC						เติมสารละลาย HEC					
	ขนาดโมเลกุล 62 kDa			ขนาดโมเลกุล 18 kDa			ขนาดโมเลกุล 55 kDa			ขนาดโมเลกุล 17 kDa		
	1 phr	2 phr	3 phr	1 phr	2 phr	3 phr	1 phr	2 phr	3 phr	1 phr	2 phr	3 phr
127	80	87	75	38	32	32	126	132	112	37	32	26
411	220	187	185	69	32	34	243	185	194	47	35	38

*
N = 3

4. ผลการตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ละลายในน้ำในตัวอย่างโดยวิธี SDS-PAGE



รูปที่ 2 ผลการตรวจสอบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในตัวอย่างโดยวิธี SDS-PAGE

HEC1/2 = เดิม HEC 17 kDa 1 phr เปรียบกับ control #2, HEC2/2 = เดิม HEC 17 kDa 2 phr เปรียบกับ control #2
HEC2/1 = เดิม HEC 17 kDa 2 phr เปรียบกับ control #1, HEC3/1 = เดิม HEC 17 kDa 3 phr เปรียบกับ control #1

บทวิจารณ์และสรุปผล

จากการทดลองเงื่อนไขที่เหมาะสมในการเติมสารละลาย CMC หรือ HEC ในน้ำยางข้นและปั่นแยกโปรตีนที่ละลายในน้ำออก เพื่อเตรียมน้ำยางข้นที่มีโปรตีนต่ำ ทำได้โดยใช้ CMC หรือ HEC ที่ Depolymerize โดยรังสีแกมมา ให้มีน้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยโดยความหนืด (Mv) ประมาณ 17-18 kDa แล้วเติมลงให้มีความเข้มข้น 2 phr ในน้ำยางข้นที่เจือจางด้วยสารละลายแอมโมเนีย 0.6% ให้มีเนื้อยางลดลงเป็น 30% กวนและทิ้งไว้ 1 คืนจึงปั่นที่ 18,000 rpm เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จะได้น้ำยางข้นที่มีปริมาณโปรตีนที่ละลายในน้ำได้ อันเป็นโปรตีนก่อภูมิแพ้ต่ำกว่า 50 ppm ของเนื้อยางได้ การแยกเฉพาะโปรตีนที่ละลายในน้ำได้ออกเท่านั้น ทำให้โปรตีนโมเลกุลใหญ่ที่ไม่ก่อให้เกิดภูมิแพ้ยังมีอยู่ที่อนุภาคยาง ในกรณีนี้โปรตีนที่เหลืออยู่จะยังทำให้น้ำยางข้นคงสภาพอยู่ได้โดยไม่ต้องเติม Surfactant หรือ Emulsifier ใดๆ เหมือนกับวิธีใช้เอ็นไซม์ย่อยโปรตีนทุกขนาดโมเลกุลออกจากยางทั้งหมด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนด้านงบประมาณจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยปี พ.ศ. 2544

เอกสารอ้างอิง

1. Scientific Committee on Medicinal Products and Medical Devices. Opinion on natural rubber latex allergy. European Commission, June 2000.
2. Kawasaki Atsuko, Nakade Shinichi and Sasaki Toshiaki, 1999. Process for producing deproteinized natural rubber gloves, US. Patent 5908893.
3. Tanaka Yasuyuki, et al., 1999. Process for preparing deproteinized natural rubber latex molding and deproteinized agent for natural rubber latex, US. Patent 5910567.
4. Makuuchi Keizo, et al., 2000. Method of shaping from mixture of prevulcanized rubber latex and water-soluble polymer and the resulting shaped article, US. Patent 6090328.
5. Wrick M.G., 1968. A study on enzymic degradation of CMC and other cellulose ethers. J. Polym. Sci. Part A-1 6, 1965–1974.
6. Brown W., Henry, D. Ohman J. 1963. Studies on cellulose derivatives: the influence of solvent and temperature on the configuration and hydrodynamic behavior, J. Macromol, 63, 49.
7. Slater, J.E., Trybul, D.E., 1994. Affinity purification of latex antigens, J. Allergy Clin. Immunol. 93, 644-649.