อัลตราฟิลเตรชันสำหรับการทำให้เซรุ่มแก้พิษงูมีความบริสุทธิ์และความเข้มข้น
Ultrafiltration for Purification and Concentration of Snake Antivenom

นิพนธ์ปริทัศน์

อรนุช กลิ่นเพชร*
สถานเสาวภา สภากาชาดไทย กทม 10330
* **Corresponding author:** araikanuch@gmail.com
วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2563;15(1):49-55.

Review Article

Oranuch Klinpaj*
Queen Saovabha Memorial Institute, Thai Red Cross, Bangkok 10330, Thailand
* **Corresponding author:** araikanuch@gmail.com
Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2020;15(1):49-55.

บทคัดย่อ

การรักษางูกัดด้วยเซรุ่มแก้พิษงูสามารถช่วยชีวิตผู้ถูกกัดได้ เซรุ่มแก้พิษงูทำโดยฉีดพิษงูปริมาณเล็กน้อยเข้าไปในสัตว์ ให้ผลิตภูมิต้านทานต่อพิษงูนั้น แล้วแยกพลาสมาออกจากเลือด ซึ่งต้องผ่านกระบวนการแยกโมเลกุลที่ออกฤทธิ์ต้านพิษได้ 1 ชนิด ได้แก่ IgG หรือ $F(ab')_2$ หรือ Fab เพื่อนำมาใช้เป็นเซรุ่มต้านพิษ โดย immunoglobulin เมื่อถูกย่อยด้วย pepsin จะได้เป็น $F(ab')_2$ หรือ ย่อยด้วย papain จะได้เป็น Fab แล้วกำจัดโปรตีนที่ไม่มีฤทธิ์ต้านพิษซึ่งไม่ต้องการออกโดยการตกตะกอนด้วย ammonium sulfate หรือกรด caprylic ตะกอนโปรตีนเหล่านั้นถูกกำจัดทิ้งโดยการกรอง หรือปั่นเหวี่ยง ได้สารละลายที่ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ แล้วนำเข้าสู่ ultrafiltration เพื่อ diafiltration และ concentration เมื่อสารละลายเข้าสู่ ultrafiltration สารละลายจะไหลไปตาม membrane ภายใต้แรงดัน รูของ membrane จะอนุญาตให้ตัวทำละลาย และโมเลกุลเล็กผ่านออกไป แต่ยังคงเก็บ molecule ขนาดใหญ่ไว้ การเลือก ultrafiltration membrane และสภาวะการทำงาน ต้องมีความเข้าใจในกระบวนการและตัวแปรต่าง ๆ ด้วยการออกแบบกระบวนการ และกำหนดตัวแปร ได้แก่ transmembrne pressure, temperature, volume concentration factor และ diafiltration volume อย่างเหมาะสม จะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตได้

คำสำคัญ: เซรุ่มต้านพิษงู, อัลตราฟิลเตรชัน, การทำให้บริสุทธิ์, การทำให้เข้มข้น

Editorial note
Manuscript received in original form on February 22, 2019;
revised August 5, 2019;
and accepted in final form on December 17, 2019

Abstract

Snake antivenom is life saving for snake bite. By injecting a small amount of the snake venom into an animal, the antibodies against the venom's active molecule is produced and harvested from the animal's blood. The plasma separated from the animal blood is subject to isolating an active antivenom molecule (IgG or $F(ab')_2$ or Fab). Immunoglobulins are digested using either pepsin to produce $F(ab')_2$, or papain to produce Fab. Proteins with no antivenom action are eliminated by precipitation with ammonium sulfate or caprylic acid. The precipitated proteins are removed by filtration or centrifugation. The filtrate containing the active substances is subject to ultrafiltration for diafiltration and further concentration. Ultrafiltration is a filtration that allows solution to flow parallelly under pressure through a membrane with pores allowing solvent and small molecules to pass through and retaining larger molecules. Selection of the appropriate ultrafiltration membrane and operating conditions requires a thorough understanding of the optimally designed process and defined parameters including transmembrne pressure, temperature, volume concentration factor, and diafiltration volume, which could enhance product yield.

Keywords: snake antivenom, ultrafiltration, purification, concentration

Journal website: http://ejournals.swu.ac.th/index.php/pharm/index

Introduction

งูเป็นสัตว์ที่พบได้ทั่วไป มีทั้งงูที่มีและไม่มีพิษ ซึ่งหากถูกงูพิษชนิดใดกัดจะได้รับพิษจากงูชนิดนั้น มีพยาธิสภาพ และความรุนแรงแตกต่างกันตามชนิดของพิษงู ซึ่งอาจรุนแรงถึงขั้นสูญเสียอวัยวะหรือชีวิตได้ การได้รับการรักษาอย่างทันท่วงที จะสามารถช่วยลดการสูญเสียดังกล่าว ซึ่งการรักษาด้วยเซรุ่มเป็นที่ยอมรับมานานจนถึงปัจจุบัน โดยเซรุ่มแก้พิษงู (snake antivenom) ทำหน้าที่จับพิษงูแล้วทำลายความเป็นพิษลง ไม่ให้พิษไปทำลายเซลล์และเนื้อเยื่อในร่างกาย

เซรุ่มแก้พิษงู (snake antivenom) ต้องมีความเฉพาะเจาะจงต่อพิษงูที่ได้รับ และมีความบริสุทธิ์เพียงพอเพื่อให้การรักษามีประสิทธิภาพ ไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ซึ่งการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูมีหลายวิธี และมีการนำเทคโนโลยีต่าง ๆ มาใช้ในการผลิตเพื่อให้ได้เซรุ่มแก้พิษงูที่มีความแรงและความบริสุทธิ์ตามต้องการ โดยมีการนำultrafiltration มาใช้ทำให้เซรุ่มบริสุทธิ์อย่างมีประสิทธิภาพ บทความนี้ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตเซรุ่มแก้พิษงู, หลักการ ultrafiltration และการนำ ultrafiltration มาใช้ในการผลิตเซรุ่มดังรายละเอียดต่อไปนี้

การผลิตเซรุ่มแก้พิษงู
Production of snake antivenom

การผลิตเซรุ่มแก้พิษงู (snake antivenom) จากพลาสมาสัตว์ซึ่งได้รับการกระตุ้นให้มีภูมิคุ้มกันต่อพิษงูนั้น มีการใช้สัตว์หลายชนิดสำหรับผลิต antivenom เช่น ม้า แกะ ลา แพะ และกระต่าย เป็นต้น ในการผลิตปริมาณมากการใช้สัตว์ขนาดใหญ่ เช่น ม้า สามารถให้พลาสมาปริมาณมากกว่าสัตว์ขนาดเล็ก ซึ่ง antivenom จากพลาสมาม้า[1,2] ได้รับการพิสูจน์แล้วว่ามีความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพ และใช้อย่างกว้างขวางในการผลิต antivenom[1,3-8]

ในการผลิตเซรุ่มแก้พิษงู เมื่อได้พลาสมาที่มีปริมาณ antibody ที่สามารถทำลายพิษงูตามชนิดของพิษงูแล้ว ต้องนำพลาสมามาผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ (purification) ซึ่งสามารถเลือกกระบวนการหลายวิธีขึ้นอยู่กับความต้องการให้ได้เซรุ่มแก้พิษงูในรูปแบบใด เช่น เป็น IgG หรือ $F(ab')_2$ หรือ Fab ซึ่งหากต้องการ

IgG ก็ทำได้โดยนำพลาสมาไปตกตะกอนเพื่อแยก IgG ออกจากโปรตีนอื่นที่ไม่ต้องการโดยไม่ต้องผ่านการย่อย แต่หากต้องการ $F(ab')_2$ หรือ Fab ต้องนำพลาสมาไปผ่านการย่อยด้วย enzyme เพื่อเปลี่ยน IgG ให้กลายเป็น $F(ab')_2$ หรือ Fab ก่อน แล้วจึงนำไปตกตะกอนโปรตีนอื่นที่ไม่ต้องการออก จากนั้นนำไปกรองหรือปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดตะกอนโปรตีนเหล่านั้นให้ได้เป็นสารละลาย แล้วนำไปกำจัดชิ้นส่วนโปรตีนขนาดเล็ก รวมถึงสิ่งปนเปื้อนอื่นที่ไม่ต้องการออก เช่น เกลือที่ใช้ในการตกตะกอน รวมถึงทำให้เข้มข้นขึ้นโดยอาศัยเทคโนโลยีต่าง ๆ เช่น ultrafiltration, chromatography เป็นต้น จากนั้นทำให้ปราศจากเชื้อด้วย sterile filtration แล้วบรรจุลงภาชนะ ได้เป็นเซรุ่มต้านพิษงูที่มีความบริสุทธิ์ และเข้มข้น ซึ่งจะอธิบายการทำให้บริสุทธิ์เพิ่มเติมดังต่อไปนี้

การทำให้บริสุทธิ์ Purification

การเตรียม antivenom เตรียมโดยนำพลาสมามาผ่านวิธีการหลากหลายดังต่อไปนี้ ให้ได้เป็นสารสำคัญได้แก่ Intact IgG molecule หรือ $F(ab')_2$ fragment หรือ Fab fragment

การทำให้ intact IgG antivenom บริสุทธิ์ (Purification of intact IgG antivenom)

สามารทำให้ intact IgG antivenom บริสุทธิ์ได้โดยนำพลาสมามาตกตะกอน ซึ่งมี 2 วิธี ได้แก่ 1) การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate (Ammonium sulfate precipitation) ซึ่งการใช้เกลือ ammonium sulfate หรือ sodium sulfate ให้เกิด salting-out โดยการตกตะกอน 2 ครั้ง ด้วยเกลือที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยทั่วไปวิธีการนี้ให้ recovery ราว 40 - 50% และให้ผลิตภัณฑ์ที่มีโปรตีนที่ไม่ต้องการปนอยู่ในปริมาณสูง เช่น albumin และเกิดอาการไม่พึงประสงค์สูง และ 2) วิธีตกตะกอนด้วยกรด caprylic (Caprylic acid precipitation) ซึ่งทำโดยเติม caprylic acid (octanoic acid) เพื่อตกตะกอน แล้วนำส่วนใสไปกำจัด caprylic acid ที่หลงเหลือ วิธีนี้ให้ antivenom ที่มีความบริสุทธ์สูง เพราะ immunoglobulin ไม่ตกตะกอนลงมา ซึ่ง yield อาจสูงถึง 60 - 75% ของพลาสมาตั้งต้น

การทำให้ $F(ab')_2$ antivenom บริสุทธิ์ (Purification of $F(ab')_2$ antivenom)

สามารถทำให้ $F(ab')_2$ antivenom บริสุทธิ์โดยนำพลาสมามาย่อยด้วย pepsin ทำให้ IgG ถูกย่อยเป็น $F(ab')_2$ และย่อย Fc เป็น peptide ชิ้นเล็ก ๆ รวมทั้ง non-IgG protein แล้วนำไปตกตะกอน ซึ่งมี 2 วิธี ได้แก่ 1) การตกตะกอนด้วย ammonium sulfate (Ammonium sulfate precipitation) ซึ่งหลังจากย่อยด้วย pepsin แล้วตกตะกอนด้วย ammonium sulfate โดยปกติใช้ถึง 12% เพื่อตกตะกอนส่วนที่ไม่ต้องการออก แล้วนำส่วนใสมาผ่านกระบวนการ thermocoagulation จากนั้นตกตะกอนต่อด้วย ammonium sulfate โดยปกติใช้ 23% หรือสูงกว่า เพื่อตกตะกอน $F(ab')_2$ ออกมา แล้วนำ $F(ab')_2$ มาละลาย และกำจัด ammonium sulfate และทำให้เข้มข้นด้วย tangential flow diafiltration and concentration โดยปกติวิธีนี้ได้ yield 30 - 40% ส่วนวิธีที่ 2) เป็นการตกตะกอนด้วยกรด caprylic (Caprylic acid precipitation) ซึ่งหลังย่อยด้วย pepsin แล้วตกตะกอน non-IgG protein ด้วย caprylic acid ได้ yield ประมาณ 60% บางผู้ผลิตกำจัด molecule ขนาดเล็กที่ปนเปื้อนออก โดยใช้ ion-exchange chromatography หรือ ultrafiltration

การทำให้ Fab antivenom บริสุทธิ์ (Purification of Fab antivenom)

การทำให้ Fab antivenom บริสุทธิ์ โดยนำพลาสมามาย่อยด้วย papain ได้เป็น Fab ซึ่งอาจมีการใช้ ammonium sulfate, sodium sulfate หรือ caprylic acid ในกระบวนการ[1]

ทั้งนี้ ส่วนใหญ่ผู้ผลิตในหลายประเทศผลิตด้วย $F(ab')_2$ จากม้าเตรียมโดยย่อย IgG ด้วย pepsin เป็น $F(ab')_2$ เพราะเชื่อกันว่า Fc ทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์[4,5] ในประเทศไทยมีการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูจากพลาสมาม้าเช่นกัน ซึ่งสถานเสาวภา สภากาชาดไทยเป็นแหล่งผลิตหลักในประเทศไทย โดยกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ประกอบด้วยขั้นตอนการย่อยด้วย enzyme การตกตะกอนโปรตีนและการกำจัดเกลือออกโดยวิธี dialysis ด้วย ultrafiltration

จะเห็นได้ว่ามีการนำ ultrafiltration มาใช้ในกระบวนการทำเซรุ่มให้บริสุทธิ์ และ immunoglobulin purification หรือ $F(ab')_2$[3,6,9] โดยใช้เพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนขนาดเล็ก กำจัดเกลือ แลกเปลี่ยน buffer และ concentration เพื่อทำให้เข้มข้นขึ้น

หลักการ ultrafiltration

Ultrafiltration (UF) คือ การกรองสารละลาย (solution) หรือสารแขวนตะกอน (suspension) ภายใต้แรงดันผ่าน membrane โดย membrane มีขนาดรูที่ยอมให้ของเหลว และ molecule ขนาดเล็กผ่านออกไปได้ และกัก molecule ที่มีขนาดใหญ่กว่าเอาไว้ ซึ่งของเหลวจะไหลไปตามผิวหน้าของ membrane และให้แรงดันดันของเหลวผ่าน membrane ไปสู่ด้าน filtrate ซึ่งเป็นการกรองแบบ Tangential flow filtration (TFF) หรือเรียกว่า cross-flow filtration โดยของเหลวที่เข้าสู่การกรองทางด้าน feed เมื่อผ่าน membrane จะถูกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกเป็นของเหลวที่ผ่านรู membrane ไปเรียกว่า filtrate หรือ permeate ส่วนของเหลวที่ไม่ผ่านรู membrane เรียกว่า retentate ซึ่งจะวนกลับไปรวมในภาชนะ ทั้งนี้มีการใช้ ultrafiltration อย่างกว้างขวางในการแยก protein จาก buffer การแลกเปลี่ยน buffer (buffer exchange) และการกำจัดเกลือ (desalting)

Membrane

ส่วนประกอบ และโครงสร้างของ membrane

membrane ที่ถูกทำขึ้นครั้งแรก ทำจาก cellulose acetate ต่อมาได้พัฒนาให้ membrane มี surface บางลง โดยให้ supported sublayer มีความหนาและรูพรุนมากขึ้น เป็นลักษณะ sponge-like sublayer ทำให้โครงสร้างโดยรวมแข็งแรงขึ้น ซึ่งถูกเรียกว่า asymmetric membrane และมีการใช้โดยทั่วไปในปัจจุบัน

cellulose membrane มีข้อดี คือ มีคุณสมบัติ hydrophilic ที่ดีมาก และดูดซับโปรตีนต่ำ แต่เนื่องจาก cellulose acetate ซึ่งเป็น ester ของ polysaccharide มักเกิด hydrolysis ได้ ทำให้ใช้ประโยชน์ได้ที่ช่วง pH 3 - 7 และที่อุณหภูมิไม่สูงกว่า 35 °C และอาจมีปฏิกิริยากับ alcohol และ organic acid บางชนิด สภาพเหล่านี้จึงเป็นข้อจำกัดในการนำ cellulose acetate มาใช้

ส่วน polysulfone membrane มีความทนต่อ pH และอุณหภูมิได้มากกว่า โดยทนได้ที่ช่วง pH 2 - 12 และอุณหภูมิสูงถึง 80 °C นอกจากนี้ ยังสามารถทนต่อ chlorine และแรงดันได้ดีกว่า[10] จึงมีการใช้ polysulfone membrane เช่น polyethersulfone (PES) กันอย่างกว้างขวาง ด้วยคุณสมบัติที่สามารถต้านทานสารเคมี อุณหภูมิ และมีสมบัติเชิงกลที่ดี แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยความเป็น hydrophobic สูง มักนำไปสู่การสะสมโปรตีน บน membrane ได้[11]

นอกจาก polyethersulfone membrane และ cellulose acetate membrane ตามที่กล่าวมา ยังมี membrane ชนิดอื่นได้แก่ regenerated cellulose membrane, polyacrylonitrile membrane และ ceramic membrane เป็นต้น[12]

Membrane cut-off level

ขนาดรู membrane ของ ultrafiltration มี pore size ขนาด 1 - 100 nm[12] แต่โดยทั่วไปจะระบุโดยใช้ molecular weight (MW) ซึ่ง ultrafiltration membrane มีขนาด 1 kD ถึง 1,000 kD หมายความว่า membrane สามารถกักเก็บ molecule ที่มีขนาดใหญ่กว่าได้มากที่สุด และ molecule ที่มีขนาดเล็กกว่าได้บ้าง โดยเรียกว่า Molecular Weight Cut Off (MWCO) หรือ Nominal Molecular Weight Limit (NMWL) ซึ่งโดยทั่วไป membrane จะสามารถกักเก็บ molecule ที่มีขนาดเล็กที่สุดตาม MWCO ที่ระบุได้มากกว่า 90%[12] จะเห็นได้ว่า ultrafiltration membrane ไม่ได้กักเก็บ molecule ที่ต้องการไว้ได้อย่างสมบูรณ์ จึงควรเลือก ultrafiltration membrane ที่มี MWCO น้อยกว่า molecular weight ของ molecule ที่ต้องการเก็บไว้ 3 - 6 เท่า เพื่อให้สามารถกักเก็บ molecule ที่ต้องการไว้ได้สูง ซึ่งหากเลือก membrane ที่มี MWCO ใหญ่จะมี flow rate ที่เร็ว แต่ recovery อาจน้อย ในทางกลับกันหากเลือก membrane ที่มี MWCO เล็กก็อาจจะได้ recovery สูง แต่ flow rate อาจช้าลง และใช้เวลานานขึ้น ซึ่งการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูมีวิธีการที่หลากหลายดังที่กล่าวมา และมีขนาด molecular weight ที่ต้องการต่างกันไป เช่น การผลิตเซรุ่มแก้พิษงูจากพลาสมาม้า ซึ่งมี molecule ที่ต้องการเก็บไว้ เช่น Immunoglobulin G (IgG) มี molecular weight 150 kDa ส่วน $F(ab')_2$ มี molecular weight 100 kDa หรือ Fab มี molecular weight 50 kDa[7] และอาจมี molecule หรือสิ่งที่ใช้ในกระบวนการผลิตที่ต้องกำจัดทิ้ง เช่น pepsin มี molecular weight 35 kDa[13] ซึ่งในการเลือก MWCO นอกจากต้องคำนึงถึง recovery และ flow rate แล้ว ยังต้องคำนึงถึง purity ด้วย หากเลือก membrane ที่มี MWCO เล็กกว่าทั้ง molecule ที่ต้องการและไม่ต้องการ อาจทำให้ได้ recovery สูง แต่ purity ต่ำ เพราะไม่สามารถกำจัด molecule ที่ไม่ต้องการออกได้ เช่น ในงานวิจัยของ Simsiriwong et al ได้ศึกษาการแยก snake antivenom ให้ได้เป็น $F(ab')_2$ จากพลาสมาม้า เมื่อใช้ ultrafiltration ที่มี MWCO 30 kDa พบว่ามีโปรตีนขนาดเล็กประมาณ 35 kDa ปนมากับ $F(ab')_2$ แต่เมื่อใช้ ultrafiltration ที่มี MWCO 50 kDa พบว่าได้ recovery 90% แต่ไม่พบโปรตีนขนาดเล็กปนอยู่[6] ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jones and Landon ที่พบว่า ภายหลังการย่อยด้วย pepsin เมื่อ diafiltration ด้วย MWCO 30 kDa พบว่าได้ $F(ab')_2$ มากกว่าเมื่อใช้ MWCO 50 kDa ประมาณ 30%[13] จึงควรเลือก membrane ที่มี MWCO เล็กกว่า molecule ที่ต้องการ แต่ใหญ่กว่า molecule ที่ไม่ต้องการ เพื่อให้ได้ทั้ง recovery และ purity ที่สูง

ประสิทธิภาพของ membrane อธิบายได้โดย retention (การเก็บรักษาโมเลกุลขนาดใหญ่), อัตราการกรอง และ permeate flux หรือ filtrate flux โดยวัดปริมาณ filtrate ในหน่วยลิตรต่อชั่วโมงต่อพื้นที่ membrane ในหน่วยตารางเมตร ภายใต้แรงดัน และอุณหภูมิ ดังสมการต่อไปนี้

$$R = [(C_F - C_p) / C_F] \times 100$$

โดยที่

R = Retention

C_F = Feed concentration

C_p = Permeate concentration หรือ filtration concentration

Ultrafiltration ในอุดมคติคือ กักเก็บสิ่งที่ต้องการได้ทั้งหมด (R = 100%) และไม่เหลือสิ่งที่ไม่ต้องการ (R = 0%) การเลือก membrane ที่มี % retention สูง จะช่วยลด % product loss ได้[10]

รูปแบบของ ultrafiltration membrane ที่รู้จักโดยทั่วไป ได้แก่ hallow fiber, spiral wound และ flat sheet ซึ่งแบบ spiral wound เกิดการอุดตันได้ง่าย ทำความสะอาดได้ยาก และมีข้อจำกัดในการปรับปริมาตรการใช้กว่าแบบ hallow fiber หรือ flat sheet[12] แต่ hallow fiber ใช้ pressure ได้น้อยกว่า flat sheet

Membrane area

เมื่อกำหนด permeate flux และ total filtrate volume ของกระบวนการได้แล้ว ก็จะสามารถหา membrane area ซึ่งจะขึ้นอยู่กับเวลาทั้งหมดของกระบวนการด้วย โดยหากเลือกให้กระบวนการนานขึ้น ก็จะทำให้ใช้ membrane area น้อยลง ช่วย

ลดค่าใช้จ่ายของ membrane ลงได้ และยังช่วยลด hold-up volume ซึ่งช่วยลด product loss ได้ แต่การเพิ่มระยะเวลาของกระบวนการ อาจเพิ่มความเสี่ยงในการ degradation ของโปรตีนได้เช่นกัน

Crossflow rate

โดยทั่วไป crossflow rate ที่สูงขึ้นจะให้ permeate flux ที่สูงขึ้น เมื่อ TMP เท่ากัน เนื่องจาก crossflow rate ที่สูงขึ้นจะช่วยกวาดผิวหน้า membrane และลด concentration gradient บนผิวหน้า membrane แต่อย่างไรก็ตาม การให้ crossflow rate ที่สูงขึ้น จะทำให้เซรุ่มไหลผ่าน pump มีจำนวนครั้งที่มากขึ้น และอาจนำไปสู่การ degradation ของเซรุ่ม และเพิ่ม product loss ดังนั้นหากต้องการเพิ่ม crossflow rate อาจต้องเพิ่มขนาดของ pump ให้ใหญ่ขึ้น และขนาดท่อใหญ่ขึ้น ซึ่งจะเพิ่ม hold-up volume ตามไปด้วย เป็นเหตุให้เกิด product loss จากการที่ไม่สามารถเก็บเซรุ่มออกจากระบบได้หมด

Transmembrane pressure (TMP)

การไหลของของเหลวไปตามแนวยาวของช่อง จากด้านทางเข้า (feed) ไปสู่ด้านทางออก (retentate) ทำให้ความดันด้านทางออกลดลง ดังนั้นแรงดันที่กระทำต่อ membrane ด้าน filtrate ตลอดแนว membrane จึงเป็นค่าเฉลี่ยที่เรียกว่า Transmembrane Pressure (TMP) ดังสมการต่อไปนี้

$$TMP = [(P_F+P_R)/2]-P_p$$

โดย

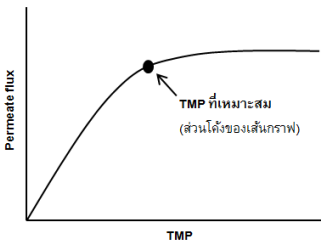
TMP = Transmembrane Pressure

P_F = Feed pressure (bar)

P_R = Retentate pressure (bar)

P_p = permeate pressure หรือ filtrate pressure (bar)

เมื่อเพิ่ม TMP จะทำให้ permeate flux เพิ่มขึ้น จนถึงจุด ๆ หนึ่งแล้วจะคงที่ ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง transmembrane pressure (TMP) และ Permeate flux

ในช่วงแรกของเส้นกราฟ พบว่า permeate flux เพิ่มขึ้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้น ส่วนช่วงที่สองของเส้นกราฟ พบว่า permeate flux ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อความดันเพิ่มขึ้น ในช่วงที่สองนี้ โปรตีนจะมีความเข้มข้นสูงบนผิวหน้า membrane ถ้ากระบวนการใช้ TMP ในช่วงที่สองของเส้นกราฟเพื่อให้ได้ permeate flux มากที่สุด และสามารถใช้ membrane area ได้น้อยที่สุด แต่อาจทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนบริเวณผิวหน้า membrane สูงจนเกินขีดการละลาย และอาจนำไปสู่ product loss แต่ถ้าใช้ TMP ในช่วงแรกของเส้นกราฟจะให้ permeate flux ต่ำกว่า และใช้ membrane area มากขึ้น ดังนั้น TMP ที่เหมาะสมคือ TMP ที่ส่วนโค้งของเส้นกราฟ ซึ่ง slope ของเส้นกราฟที่ช่วงนี้จะลดลง 50% จาก slope ตั้งต้น ซึ่งจะทำให้ permeate flux เข้าใกล้ค่าที่สูงที่สุด แต่ไม่ทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนบริเวณผิวหน้า membrane มากเกินไป

กระบวนการ ultrafiltration มีปัจจัยหลายประการมาเกี่ยวข้อง เช่น คุณสมบัติของ membrane ได้แก่ ขนาดรู membrane ความหนา และความชอบน้ำของ membrane ซึ่งมีผลต่อความซึมผ่าน membrane (permeability) คุณสมบัติขององค์ประกอบในของเหลว ได้แก่ ขนาดและรูปร่าง molecule ความเข้มข้น ความหนืด และอุณหภูมิซึ่งมีผลต่อความหนืด เหล่านี้มีผลต่ออัตราการไหลของ permeate เพราะในกระบวนการใช้แรงดันเพื่อขับเคลื่อนนั้น เมื่อมีแรงดันมาก flux ก็จะมากตามไปด้วย แต่ความหนืดจะทำให้เกิดแรงในทิศทางตรงกันข้าม ทำให้ของเหลวเคลื่อนที่ลดลงด้วย รวมถึงการสะสมของ molecule ที่ต้องการกักเก็บไว้บริเวณผิวหน้า membrane หรืออาจเข้าไปอยู่ในรูของ membrane แล้วขัดขวางการกรอง และทำให้ permeate flux ลดลง[10] ซึ่งการสะสมของ molecule นั้นเกิดจากการที่ pump ดันของเหลวไหลผ่านช่องระหว่างผิวหน้า membrane จะเกิดแรงดันให้ของเหลวไหลผ่าน membrane ออกไปทาง permeate หรือ filtrate เป็นผลให้เกิดการไล่ระดับความเข้มข้น (concentration gradient) จากความเข้มข้นของของเหลวตรงกลางระหว่างผิวหน้า membrane (bulk concentration) ไปจนเข้มข้นมากบริเวณผนังผิวหน้า membrane (wall concentration) และไล่ระดับความเข้มข้นตามความยาวช่อง membrane จากด้านทางเข้า (feed) ไปสู่ด้านทางออก (retentate) ซึ่งความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นบริเวณผิวหน้า membrane นี้เรียกว่า concentration polarization ซึ่งระดับของ concentration polarization จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของ feed เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ permeate flux ลดลง หากต้องการเพิ่ม permeate flux อาจทำได้โดยเพิ่มอัตราการไหลของ feed ซึ่งจะเป็นการเพิ่มแรง shear หรือให้เกิด turbulence จะทำให้ molecule ที่สะสมบน membrane แพร่กลับสู่ bulk ซึ่งต้องพิจารณากำลัง pump ร่วมด้วย

ซึ่งในระหว่างกระบวนการ ultrafiltration เพื่อทำเซรุ่มให้บริสุทธิ์นั้น ควรกำหนดและควบคุม parameter ต่าง ๆ เช่น TMP และ temperature เป็นต้น ให้เหมาะสมเพราะมีผลต่อ yield, purity และ cost ในกระบวนการ ซึ่งการเพิ่ม TMP อาจทำให้ permeate flux เพิ่มขึ้น แต่ก็ต้องใช้กำลัง pump เพิ่มขึ้น ซึ่งถ้า permeate flux สูงตลอดกระบวนการก็อาจช่วยลดเวลาของกระบวนการให้สั้นลงได้ แต่อาจไม่เป็นเช่นนั้นเพราะเมื่อ permeate flux เพิ่มขึ้น อาจทำ

ให้เกิดการสะสมของ molecule ต่าง ๆ บนผิวหน้า membrane ได้ การเพิ่มอุณหภูมิช่วยลดความหนืดของของเหลว อาจช่วยให้ permeate flux เพิ่มขึ้น แต่อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นอาจมีผลต่อความคงตัวของโปรตีน อาจเกิดการ degradation แล้วไปสะสมหน้า membrane แล้วทำให้ permeate flux ลด และได้ yield ลดลง ซึ่งหากใช้อุณหภูมิต่ำเซรุ่มก็จะมีความหนืดเพิ่มขึ้น และเพิ่มโอกาสการเกิด concentration polarization[14] มีผลให้ permeate flux ลดลง และอาจทำให้การละลายของโปรตีน เกลือ และองค์ประกอบอื่น ๆ ในเซรุ่มลดลง ทำให้การกำจัดออกยากตามไปด้วย ซึ่งอาจกระทบกับระยะเวลาในการ diafiltration และ concentration ที่นานขึ้น รวมถึงปริมาณ buffer ที่ใช้ก็อาจจะมากขึ้นตามไปด้วย และถึงแม้ว่าการเพิ่ม membrane area จะช่วยชดเชย permeate flux ที่ลดลงได้ แต่ก็ต้องเพิ่ม cross flow rate ให้สูงขึ้นซึ่งจะส่งผลให้เซรุ่มต้องผ่าน pump มากขึ้นด้วย

Diafiltration

diafiltration คือ กระบวนการที่ทำให้โมเลกุลขนาดเล็กผ่านรู membrane ออกไป และยังคงกักเก็บ molecule ขนาดใหญ่กว่าใน retentate โดยไม่มีการเปลี่ยนความเข้มข้น จึงสามารถใช้ในการกำจัดเกลือ หรือแลกเปลี่ยน buffer หรือกำจัด ethanol หรือตัวทำละลายขนาดเล็กได้

diafiltration มี 2 วิธีหลัก continuous diafiltration (constant volume diafiltration) และ discontinuous diafiltration (batch diafiltration) ซึ่ง continuous diafiltration จะเป็นการเติมสารละลายที่ใช้สำหรับ diafiltration เช่น น้ำ หรือ buffer ในของเหลวในภาชนะสำหรับ feed ด้วยอัตราเดียวกับที่กรองออกไปทาง permeate ดังนั้นปริมาตรของเหลวในภาชนะจะคงที่แต่ molecule จะถูกกำจัดออกผ่านรู membrane ไปสู่ permeate ได้ ส่วน discontinuous diafiltration สารละลายที่ใช้สำหรับ diafiltration จะถูกเติมในของเหลวเพื่อเจือจาง และทำให้เข้มข้นให้ของเหลวกลับมาสู่ปริมาตรตั้งต้น จะทำซ้ำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งความเข้มข้นของ molecule ขนาดเล็ก เช่น เกลือ ในของเหลวในภาชนะมีค่าตามต้องการ แม้ว่า discontinuous diafiltration จะไม่ต้องควบคุมระดับของเหลว แต่ continuous diafiltration มีประสิทธิภาพมากกว่า โดยจะใช้สารละลายสำหรับ diafiltration ที่น้อยกว่าในการกำจัดเกลือปริมาณเท่ากัน ทำให้ประหยัด buffer และเวลา

Concentration

concentration คือ การทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการกำจัดตัวทำละลายออกจากของเหลว ในขณะที่ยังคงกักเก็บตัวถูกละลายที่มีขนาดใหญ่กว่า membrane ไว้ได้ ความเข้มข้นของตัวถูกละลายที่ใหญ่กว่ารู membrane จะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนผกผันกับปริมาตรของเหลวที่ลดลง เช่น ในขั้นตอนการทำเซรุ่มให้บริสุทธิ์ อาจมีการเจือจางพลาสมา ซึ่งก็สามารถทำให้เข้มข้นได้ด้วย ultrafiltration[8] ส่วนตัวถูกละลายที่มีขนาดเล็กกว่ารู membrane ก็จะถูกกำจัดออกไปทาง permeate เช่นกัน เรียกว่า demineralization ปริมาณของตัวถูกละลายที่เล็กกว่ารู membrane ก็จะลดลง เช่น ในพลาสมามี ion ต่างๆ เช่น Na^+, Ka^+, Ca^{2+} และ Cl^- เป็นต้น เมื่อผ่านกระบวนการ concentration ก็จะมีปริมาณลดลง[15,16]

การทำเซรุ่มให้บริสุทธิ์ด้วย diafiltration และ concentration

เนื่องจาก molecule ขนาดเล็ก และน้ำ สามารถผ่าน ultrafiltration membrane ดังนั้นความเข้มข้นขององค์ประกอบในของเหลวที่ผ่านรู membrane ได้ จะเท่ากันทั้งใน bulk และ permeate ซึ่งในเซรุ่มมีสิ่งปนเปื้อนที่ไม่ต้องการที่มีขนาดสามารถผ่านรู membrane ได้ เมื่อเริ่มกระบวนการ ultrafiltration สิ่งปนเปื้อนเหล่านี้จะผ่านรู membrane ทำให้ความเข้มข้นใน permeate เพิ่มขึ้น ส่วนใน bulk จะลดลง ถ้า ใน bulk ของเซรุ่มถูกเจือจางด้วยน้ำหรือ buffer อย่างต่อเนื่องระหว่างกระบวนการ diafiltration สิ่งปนเปื้อนก็จะถูกกำจัดไปใน permeate อย่างต่อเนื่อง ปกติจะใช้ continuous diafiltration โดยระหว่างกระบวนการจะเติมน้ำหรือ buffer ด้วยอัตราเดียวกับ permeate เพื่อรักษาระดับ bulk ให้คงที่

ซึ่งหากในกระบวนการทำเซรุ่มให้บริสุทธิ์มีการเติม enzyme เพื่อใช้ในการย่อย เช่น pepsin หรือ papain หรือเติมเกลือ หรือสารที่ใช้ในการตกตะกอนโปรตีน เช่น ammonium sulfate, caprylic acid นอกจากนี้ ในกรณีที่อาจยังมีชิ้นส่วนโปรตีนเล็ก ๆ ที่หลงเหลือจากการตกตะกอน เช่น ชิ้นส่วนของ Fc ที่ถูกตัดด้วย enzyme ก็สามารถใช้การ diafiltration เพื่อกำจัดสิ่งเหล่านี้ออกจาก bulk ของเซรุ่มได้ เมื่อกระบวนการ diafiltration สิ้นสุดลง bulk จะยังคงมีปริมาณเท่าเดิม และเมื่อนำปริมาณน้ำ หรือ buffer ทั้งหมดที่ใช้ในการ diafiltration หารด้วยปริมาตร bulk ตั้งต้น จะได้ค่า diafiltration volume ซึ่งเป็นค่าคงที่สำหรับ diafiltration เพื่อให้ทราบปริมาณน้ำ หรือ buffer ที่จะใช้เมื่อปริมาตรของ bulk เปลี่ยนไป

ก่อนเข้าสู่กระบวนการ diafiltration การ concentration เพื่อให้ได้ bulk ที่มีความเข้มข้นของโปรตีน หรือปริมาตรตามต้องการก็เป็นสิ่งสำคัญ เพราะถึงแม้ที่ความเข้มข้นของโปรตีนต่ำ ๆ จะทำให้ permeate flux สูง แต่หากปริมาตร bulk มากก็จะต้องใช้ buffer ในการ diafiltration มาก ใช้ membrane ขนาดใหญ่ และใช้เวลาในการ diafiltration นานตามไปด้วย จึงควรหาจุดที่เหมาะสมในการ concentration ให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนที่ยังคงไม่มากเกินไปจนเกิด protein-degradation จาก protein-protein interaction ทำให้เกิด degadration ของเซรุ่ม และปริมาตรไม่น้อยเกินไป จนไม่สามารถ recirculate ระบบได้ โดยหาจุดสมดุลระหว่าง ปริมาตร

กับ permeate flux รวมถึงปริมาณ buffer ที่ใช้สำหรับการ diafiltration ขนาด membrane และระยะเวลาของกระบวนการ แล้วให้ได้เซรุ่มที่มี % recovery และ purity ที่สูงด้วย เมื่อกระบวนการ concentration สิ้นสุดลงจะทำให้ปริมาตร bulk ลดลง และเมื่อนำปริมาตรตั้งต้นก่อน concentration หารด้วยปริมาตร bulk คงเหลือ จะได้ volume concentration factor[15,16] ซึ่งเป็นค่าคงที่สำหรับ concentration เพื่อให้ทราบปริมาตรคงเหลือภายหลังการ concentration เมื่อปริมาตร bulk ตั้งต้นเปลี่ยนแปลงไป

ก่อนที่เซรุ่มจะเข้าสู่ membrane เพื่อ diafiltration หรือ concentration ควรทำระบบให้สมดุลด้วย buffer เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงการละลายและคุณสมบัติของเซรุ่มซึ่งประกอบด้วยโปรตีน โดยสามารถเกิดขึ้นได้ถ้าสารละลายโปรตีนต้องพบกับ pH หรือ ionic strength ที่แตกต่างมากอย่างกะทันหัน นอกจากนี้ การปะทะระหว่างโปรตีนกับ air/liquid interface เป็นผลจากการเติมเซรุ่มลงในถังเปล่า หรือเซรุ่มไหลวนไปในท่อเปล่า จึงควรให้ buffer เข้าสู่ระบบเพื่อทำระบบให้สมดุลก่อน โดยใช้ flow และ pressure ให้มีสภาวะเหมือนกับที่จะใช้กับเซรุ่ม การออกแบบระบบที่ให้ท่อ retentate ไหลกลับลงถังภายใต้ผิวหน้าของเหลวในถังจะสามารถช่วยป้องกัน foaming ได้ นอกจากนี้ หลังเสร็จสิ้นกระบวนการ diafiltration และ concentration และเซรุ่มถูกเก็บออกจากระบบแล้ว ควรล้างทำความสะอาด membrane เพื่อกำจัดสิ่งอุดตันบนผิวหน้า membrane ออกไป เพื่อคงรักษาให้ flow rate ใกล้เคียงเดิม โดยการ flush และวนด้วย sodium hydroxide หรือ sodium hypochloride หรือสารอื่นที่เหมาะสม

บทสรุป

การผลิตเซรุ่มแก้พิษงูทำได้โดยฉีดกระตุ้นสัตว์ให้สร้างภูมิคุ้มกันต่อพิษงู แล้วนำพลาสมาจากสัตว์ซึ่งมีภูมิคุ้มกันต่อพิษงูชนิดที่ฉีดกระตุ้นมาทำให้บริสุทธิ์ โดยอาจใช้ enzyme ย่อย และตกตะกอน เพื่อให้ได้ IgG หรือ $F(ab')_2$ หรือ Fab ซึ่งสามารถนำ ultrafiltration มาใช้เพื่อให้เซรุ่มมีความบริสุทธิ์ขึ้นและเข้มข้น ด้วยกระบวนการ diafiltration และ concentration ซึ่งการใช้ ultrafiltration เพื่อผลิตเซรุ่มให้ได้ yield ที่ดี และมีความบริสุทธิ์สูงนั้น ต้องเลือกชนิดและขนาด membrane ที่เหมาะสม รวมทั้งกำหนด และควบคุม parameter ต่าง ๆ และออกแบบกระบวนการ diafiltration และ concentration เช่น TMP, temperature, volume concentration factor, diafiltration volume เป็นต้น ให้เหมาะสม ก็จะสามารถผลิตเซรุ่มแก้พิษงูได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจุบันมีการกล่าวถึง ultrafiltration แบบ single-pass tangential flow filtration (SPTFF) ซึ่งสารละลายจะผ่าน membrane โดยไม่วนกลับมาเข้าถังเดิมซ้ำ ทำให้ผ่าน pump เพียงครั้งเดียว ซึ่งอาจจะช่วยลดการ aggregation ของผลิตภัณฑ์ได้ และพบว่ามีการศึกษาการนำ monoclonal antibody มาผ่าน concentration หรือ diafiltration ซึ่งในอนาคตอาจมีการศึกษาในการ concentration หรือ diafiltration เซรุ่มแก้พิษงูเพิ่มขึ้น ซึ่งหากการศึกษาสนับสนุนทั้งด้าน recovery, purity และมีความคุ้มค่าทางเศรษฐศาสตร์ ก็อาจเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ในการผลิตเซรุ่มแก้พิษงูและทำให้การผลิตเซรุ่มแก้พิษงูมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น

References

1. WHO Expert Committee on Biological Standardization. WHO guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins. WHO Press, 2010: pp.33-51.
2. Kalyan KB, Nanda SS, Venkateshwarlu P, Kiran KY, Jadhav RT. Antisnake venom serum (ASVA). *Int J Pharm Biomed Res* 2010;1(3):76-89.
3. Wang L, Sun X, Ghosh R. Purification of equine IgG using membrane based enhanced hybrid bioseparation technique, a potential method for manufacturing hyperimmune antibody. *Biotechnol Bioeng* 2008;99(3):625-633.
4. Nudel BC, Perdoménico C, Iácono R, cascone O. Optimization by factorial analysis of caprylic acid precipitation of non-immunoglobulins from hyperimmune equine plasma for antivenom preparation. *Toxicon* 2012;59:68-73.
5. Eursakun S, Simsiriwong P, Ratanabanangkoon K. Studies on the fractionation of equine antivenom IgG by combinations of ammonium sulfate and caprylic acid. *Toxicon* 2012;60:1022-1029.
6. Simsiriwong P, Eursakun S, Ratanabanangkoon K. A study on the use of caprylic acid and ammonium sulfate in combination for the fract-ionation of equine antivenom $F(ab')_2$. *Biologicals* 2012;40:338-344.
7. Baptistão CCS, Marcelino JR, Cunha LER, Gutiérrez JM, Tambourgi DV. Anticomplementary Activity of horse IgG and $F(ab')_2$ Antivenoms. *AM Soc Trop Med Hyg* 2014;90(3):574-584.
8. Rojas G, Jiménez JM, Gutiérrez JM. Caprylic acid fractionation of hyperimmune horse plasma: Description of a simple procedure for antivenom production. *Toxion* 1994;32(3):351-363.
9. Kittipongwarakarn S, Hawe A, Tantipolphan R, et al. New method to produce equine antirabies immunoglobulin $F(ab')_2$ fragments from crude plasma in high quality and yield. *Eur J Pharm Biopharm* 2011;78(2):189-195.
10. Glover FA. Principles of ultrafiltration and the concentration and fractionation of cow's milk. In: Williams AF, Baum JD (eds.). Human milk banking. New York. Vevey/Raven Press, 1984: pp.1-16.
11. Jayalakshmi A, Rajesh S, Mohan D. Fouling propensity and separation efficiency of epoxidated polyethersulfone incorporated cellulose acetate ultrafiltration membrane in the retention of proteins. *Appl Surf Sci* 2012; 258:9770-9781.
12. Saxena A, Tripathi BP, Kumar M, Shahi VK. Membrane-base techniques for the separation and purification of proteins, An overview. *ADV Colloid Interface Sci* 2009;145:1-22.

13. Jones RGA, Landon J. Enchanced pepsin digestion: a novel process for purifying antibody F(ab')$_2$ fragment in high yield from serum. *J Immunol Methods* 2002;263:57-74.
14. Hains SM, Benoit S, Bouchard C, Doyen A, Bazinet L, Poulio Y. Effect of transmembrane pressure control on energy efficiency during skim milk concentration by ultrafiltration at 10 and 50°C. *J Dairy Sci* 2016;99(11): 8655-8664.
15. Hoyo PD, Rendueles M, Diaz M. Effect of processing on functional properties of animal blood plasma. *Meat Sci* 2008;78:522-528.
16. Hoyo PD, Moure F, Rendueles M, Díaz. Demineralization of animal blood plasma by ion exchange and ultrafiltration. *Meat Sci* 2007;76:402-410.