

การกราฟต์น้ำยางธรรมชาติพรีวัลคาไนซ์กับเอทิลเมทาคริเลต  
โดยรังสีแกมมาเพื่อใช้เป็นวัสดุฐานฟันปลอมอย่างนิ่ม



นาย นิยม อ่างค้อन्हดีสกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก

คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-14-3298-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

GRAFTING OF PREVULCANIZED NATURAL RUBBER LATEX WITH ETHYL METHACRYLATE  
BY GAMMA IRRADIATION FOR USING AS SOFT LINING DENTURE BASE MATERIAL

Mr. Niyom Thamrongananskul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Oral Biology  
Faculty of Dentistry  
Chulalongkorn University  
Academic year 2005  
ISBN 974-14-3298-4

**481989**

Thesis Title                   GRAFTING OF PREVULCANIZED NATURAL RUBBER LATEX  
WITH ETHYL METHACRYLATE BY GAMMA IRRADIATION  
FOR USING AS SOFT LINING DENTURE BASE MATERIAL

By                                 Niyom Thamrongananskul


Filed of study                 Oral Biology

Thesis Advisor               Associate Professor Somporn Swadison

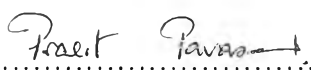
Thesis Co-advisor          Associate Professor Jariya Boonjawat

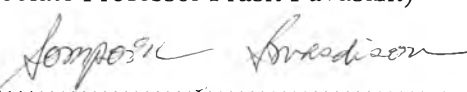
---

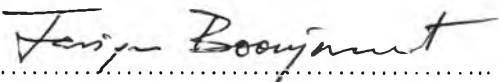
Accepted by the Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctor's Degree

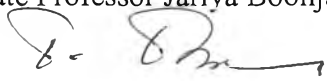
..... Dean of the Faculty of Dentistry  
(Assistant Professor Thitima Pusiri)

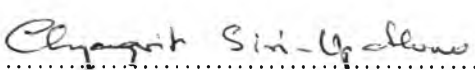
THESIS COMMITTEE


..... Chairman  
(Associate Professor Prasit Pavasant)


..... Thesis Advisor  
(Associate Professor Somporn Swadison)

..... Thesis Co-advisor  
(Associate Professor Jariya Boonjawat)

..... Member  
(Associate Professor Piyawat Phankosol)

..... Member  
(Associate Professor Chyagrit Siri-Upathum)

..... Member  
(Dr. Piyamol Albustany)

..... Member  
(Assistant Professor Nantana Jiratumnukul)

นาย นิยม อ่างรงค์อนันต์สกุล: การกราฟต์น้ำยางธรรมชาติพรีวัลคาไนซ์กับเอทิลเมทาคริเลต  
 โดยรังสีแกมมาเพื่อใช้เป็นวัสดุฐานฟันปลอมอย่างนิ่ม (GRAFTING OF PREVULCANIZED  
 NATURAL RUBBER LATEX WITH ETHYL METHACRYLATE BY GAMMA  
 IRRADIATION FOR USING AS SOFT LINING DENTURE BASE MATERIAL)  
 อ. ที่ปรึกษา: รศ.ทพญ.ดร. สมพร สวัสดิ์สรรพ, อ. ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.จรรยา บุญญวัฒน์  
 จำนวนหน้า 145 หน้า ISBN: 974-14-3298-4

ในปัจจุบันได้มีการนำยางธรรมชาติมาใช้ประโยชน์อย่างมากในทางการแพทย์ วัตถุประสงค์ของ  
 การวิจัยครั้งนี้ เพื่อพัฒนาวัสดุฐานฟันปลอมอย่างนิ่มชนิดใหม่จากยางธรรมชาติโดยวิธีการกราฟต์น้ำ  
 ยางธรรมชาติด้วยสารเอทิลเมทาคริเลตโดยใช้รังสีแกมมา เพื่อปรับปรุงสมบัติทางกายภาพและทางกล  
 ของน้ำยางให้ดีขึ้น ซึ่งในระยะแรกของการศึกษา ได้ทำการวัลคาไนซ์น้ำยางธรรมชาติโดยใช้รังสี  
 แกมมา จากนั้นทำการกราฟต์น้ำยางที่ผ่านการวัลคาไนซ์แล้วด้วยสารเอทิลเมทาคริเลตโดยใช้รังสี  
 แกมมาเช่นกัน น้ำยางที่ผ่านการกราฟต์แล้ว (เรียกว่ากราฟต์โคพอลิเมอร์) ถูกนำมาทดสอบหาค่า  
 สมบัติทางกายภาพ ทางกล และความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ ในการวิจัยนี้เลือกใช้โคชูเปอร์  
 ซอฟท์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ฐานฟันปลอมอย่างนิ่มที่มีขายอยู่ในท้องตลาดเป็นกลุ่มควบคุม ผลการศึกษา  
 ลักษณะทางกายภาพและทางกล พบว่า ค่าความแข็งผิวของวัสดุทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน เมื่อ  
 ทดสอบโดยแช่ในน้ำเป็นเวลา 10 เดือน ค่ากำลังการดึงและการฉีกขาดของกราฟต์โคพอลิเมอร์สูงกว่า  
 ของกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ค่าการยึดติดกับฐานฟันปลอมของวัสดุทั้งสองมี  
 ค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) และพบความไม่สมบูรณ์ของรอยต่อระหว่าง  
 กราฟต์โคพอลิเมอร์และวัสดุฐานฟันปลอม ส่วนค่ามุมสัมผัสโคชูเปอร์ซอฟท์มีค่าเท่ากับ 90 องศา  
 ในขณะที่ค่ามุมสัมผัสของกราฟต์โคพอลิเมอร์มีค่าเท่ากับ 71 องศา แสดงว่าผิวหน้าของกราฟต์โคพอลิ  
 เมอร์เปียกน้ำได้ดีกว่าโคชูเปอร์ซอฟท์ ค่าร้อยละของน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่อแช่วัสดุกราฟต์โคพอลิเมอร์  
 และโคชูเปอร์ซอฟท์ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 เดือนเท่ากับ 4.93% และ 6.14 % ตามลำดับ วัสดุทั้งสอง  
 ชนิดมีแนวโน้มของการติดสีจากสารละลายกาแฟมากกว่าน้ำชา ผลจากการศึกษาด้วยวิธีการเพาะเลี้ยง  
 เซลล์ พบว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเหงือกของคนสามารถเจริญเติบโตและยึดเกาะบนผิวหน้าของวัสดุ  
 กราฟต์โคพอลิเมอร์ได้ดี แต่ไม่พบปรากฏการณ์ดังกล่าวกับวัสดุโคชูเปอร์ซอฟท์ ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็น  
 เห็นว่าการกราฟต์น้ำยางด้วยสารเอทิลเมทาคริเลตโดยใช้รังสีแกมมาช่วยพัฒนาให้น้ำยางพรีวัลคาไนซ์มี  
 สมบัติทางกายภาพและทางกลดีขึ้น และมีความเข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ของคนด้วย ดังนั้นการ  
 กราฟต์น้ำยางธรรมชาติด้วยสารเอทิลเมทาคริเลตจึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปพัฒนาเป็นวัสดุฐาน  
 ฟันปลอมอย่างนิ่มได้

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก  
 ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... น.ส. ช.ธนาพร.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... ศ.ดร.จรรยา.....  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## 4476451432: MAJOR ORAL BIOLOGY

KEYWORD: NATURAL RUBBER LATEX / ETHYL METHACRYLATE / GRAFTED COPOLYMER / RADIATION / SOFT LINING MATERIAL / DENTURE BASE

NIYOM THAMRONGANANSKUL: GRAFTING OF PREVULCANIZED NATURAL RUBBER LATEX WITH ETHYL METHACRYLATE BY GAMMA IRRADIATION FOR USING AS SOFT LINING DENTURE BASE MATERIAL.

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. SOMPORN SWASDISON.

THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. JARIYA BOONJAWAT.

145 pp. ISBN: 974-14-3298-4

Recently, natural rubber has been used in several medical products. The purpose of this study was to develop a new soft lining material from natural latex. In this study, natural latex was grafted with ethyl methacrylate using gamma radiation to improve its physical and mechanical properties. Initially, natural latex was vulcanized by gamma radiation. The vulcanized natural latex was then grafted with ethyl methacrylate using gamma radiation also. The grafted vulcanized rubber, so-called graft copolymer, was evaluated for its physical and mechanical properties as well as its cellular biocompatibility. Coe Supersoft<sup>®</sup>, the commercial soft lining material, was used as a control. The results from physical and mechanical evaluation by universal testing machine showed that the surface hardness of both the graft copolymer and control material were not significant difference over ten months of water immersion time. The tensile strength and tear strength of graft copolymer were significantly higher than control group ( $p < 0.05$ ). The tensile bond strength of both materials were not significantly difference ( $p > 0.05$ ). Ultrastructurally, the interface between graft copolymer and the denture base material was not completely blended. The contact angle of the Coe Supersoft<sup>®</sup> was 90 degree compared to 71 degree of the graft copolymer. Therefore, the surface wettability of graft copolymer was better than Coe Supersoft<sup>®</sup>. The percentage of water absorption of graft copolymer and control group for over 10 months were 4.93 % and 6.14% of initial weight, respectively. Both materials were easily stained from coffee solution more than tea. In the *in vitro* study, the human gingival fibroblasts demonstrated well proliferation and well attachment around and on the surface of the graft copolymer while the cells around the control material could not survive in the parallel experiment. These results suggested that grafting of ethyl methacrylate to the gamma irradiated vulcanized latex could help improve the physical and mechanical properties as well as the cellular biocompatibility of the graft copolymer. Therefore, it would be worth to modify natural rubber by radiation grafting to become graft copolymer for using as denture soft lining materials.

Field of study Oral Biology

Academic year 2005

Student's signature.....

Advisor's signature.....

Co-advisor's signature.....

*Niyom Thamrongananskul*  
*Somporn Swasdison*  
*Jariya Boonjawat*

## ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank the members of my graduate committee: Associate Professor Prasit Pavasant, Associate Professor Piyawat Phankosol, Associate Professor Chyagrit Siri-Upathum, Dr. Piyamol Albustany, and Assistant Professor Nantana Jiratumnukul for their valuable comments and suggestion on my work.

My greatest thanks go to Associate Professor Somporn Swasdison, Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry and Associate Professor Jariya Boonjawat, Department of Biochemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, who as my mentors contributed a great deal of valuable advice and were always there when I needed suggestions. Their kindness and concern for my work and future will always be remembered.

I wish to thank those whom I have worked with during my research project: Khun Manit Sonsuk, Office of Atom for Peace, Bangkok, Thailand for his helpful suggestion on gamma irradiation technique and also permission to use the gamma irradiator for the sample preparation in this study, the Department of Biochemistry, Faculty of science, Chulalongkorn, University for the kind support on laboratory facilities, the Pan Asia Biotechnology Co., Ltd., Rayong, Thailand and the company staffs for supplying natural rubber latex, laboratory equipments and also giving a valuable technical training, guidance, and suggestion in every aspect of natural rubber latex.

I also wish to thank the Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund, Chulalongkorn University, for the financial support, the Department of Prosthodontic, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University for giving me a chance to study in this program.

Finally, I would like to express my gratitude to my mother, Mrs. Somjit Thamrongananskul, for giving me the gift of life, her endless love, and encouragement. All of these are expressed from my heart.

# CONTENTS

	<b>Page</b>
THAI ABSTRACT .....	iv
ENGLISH ABSTRACT.....	v
ACKNOWLEDGMENTS.....	vi
CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLE.....	x
LIST OF FIGURES.....	xi
ABBREVIATIONS.....	xvi
CHAPTER I INTRODUCTION.....	1
CHAPTER II REVIEW LITERATURE.....	3
CHAPTER III MATERIALS AND METHODS.....	27
3.1 Biological materials.....	27
3.2 Chemicals for natural rubber grafting and testing.....	27
3.3 Chemicals for cell culture and scanning electron microscopy.....	28
3.4 Apparatus.....	29
3.5 The methods were divided into three parts.....	30
3.5.1 Part I.....	30
3.5.1.1 Preparation of high-ammonium concentrated natural rubber latex .....	30
3.5.1.2 Preparation of gamma irradiated prevulcanized natural latex ..	32
3.5.1.3 Grafting of ethyl methacrylate (EMA) monomer onto prevulcanized latex by gamma irradiation .....	33

	<b>Page</b>
3.5.1.4 Determination of the morphology of the graft copolymer particle by Transmission Electron Microscopy (TEM) .....	34
3.5.1.5 Determination of grafting efficiency.....	35
3.5.1.6 Characteristics of graft copolymer.....	36
3.5.1.7 Glass transition temperature examination.....	37
3.5.2 Part II.....	38
3.5.2.1 Hardness test.....	38
3.5.2.2 Tensile strength test.....	39
3.5.2.3 Tear strength test.....	40
3.5.2.4 Tensile bond strength test.....	42
3.5.2.5 Water absorption test.....	44
3.5.2.6 Contact angle test.....	45
3.5.2.7 Staining test.....	47
3.5.2.8 Statistical analyses.....	48
3.5.3 Part III.....	48
3.5.3.1 Cell culture.....	48
3.5.3.2 Cytotoxicity testing.....	49
3.5.3.3 Study the cellular reaction of fibroblast to the graft copolymer by scanning electron microscopy .....	50
CHAPTER IV RESULTS AND DISCUSSION.....	51



	<b>Page</b>
CONCLUSSIONS.....	77
FUTURE STUDY.....	78
REFERENCES.....	79
APPENDICES.....	85
CURRICULUM VITAE.....	145

## LIST OF TABLES

<b>Table</b>	<b>Page</b>
Table 2.1. Composition of two acrylic resin soft lining materials.....	6
Table 2.2. Composition of two silicone soft lining materials.....	6
Table 2.3. Composition of two treatment liners.....	6
Table 2.4. The peel strength of some soft lining materials.....	14
Table 2.5. The tensile properties of some soft lining materials.....	15
Table 2.6. The tear strength of some soft lining materials.....	15
Table 2.7. The composition of fresh natural rubber latex.....	20
Table 4.1. The mean and standard deviation of tensile strength of vulcanized rubber at different doses of gamma irradiation.....	52
Table 4.2. The mean and standard deviation of tensile properties of graft copolymer and Coe upersoft <sup>®</sup> .....	65

## LIST OF FIGURES

Figure	Page
Figure 2.1. The water uptakes by water-soluble impurities.....	17
Figure 2.2. The water uptake of the acrylic soft lining material.....	17
Figure 2.3. The molecular structure of <i>cis</i> -1,4-polyisoprene.....	19
Figure 2.4. The molecular structure of <i>trans</i> -1,4-polyisoprene.....	19
Figure 2.5. The fresh latex was collected from <i>Hevea</i> tree by tapping.....	20
Figure 2.6. The ultracentrifugation of NR latex.....	21
Figure 2.7. Presumed structure of a rubber particle.....	22
Figure 2.8. Polyisoprene is a back bone while as polyethyl methacrylate is a graft block polymer.....	24
Figure 3.1. The fresh field latex contained in plastic container.....	31
Figure 3.2. The determination of DRC a) The natural latex was coagulated b) The rubber was creped and dried in an oven at 60 °C .....	31
Figure 3.3. The process of determination of volatile fatty acid by modified equipments.....	32
Figure 3.4. The latex was centrifuged using a factory scale centrifuge machine.....	32
Figure 3.5. The <i>n</i> -BA was added into 50% DRC of latex .....	33
Figure 3.6. The EMA monomer was added into prevulcanized latex.....	34
Figure 3.7 a) The graft copolymer latex was casted in open glass trays b) The graft copolymer sheets turned clear .....	35
Figure 3.8. The residual of ungrafted natural rubber and residual EMA were extracted by Soxhlet extraction procedures.....	36

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
Figure 3.9. Thin film of graft copolymer was smeared on KBr .....	37
Figure 3.10. The graft copolymer and Coe Supersoft <sup>®</sup> specimen were prepared in the circular disk for determination of T <sub>g</sub> value.....	37
Figure 3.11. The Durometer apparatus was used for measuring the surface hardness of specimens.....	38
Figure 3.12 a) The flat and smooth rectangular sheet of tested materials b) Dumbbell-shaped test piece (type IV) with its dimensions.....	39
Figure 3.13 a) The dumbbell-shaped test piece of graft copolymer and Coe Supersoft <sup>®</sup> b) The specimen was fixed to the holder of the universal testing machine for determination tensile strength .....	40
Figure 3.14 a) The shape and dimensions of test piece for tear strength b) The graft copolymer and Coe Supersoft <sup>®</sup> c) The test piece was fixed on the holder of the Universal testing machine for tear strength determination.....	41
Figure 3.15 a) The rectangular space moulds with the small pieces of silicone placed in the middle of the space. b) The tested material was packed between the denture base materials...	43
Figure 3.16 a) The tested specimens after immersion in water for 24 hours b) The specimens was fixed to the holder and measured the tensile bond strength by a Lloyd universal testing machine. ....	43
Figure 3.17 a) The specimens were cut into a square shape b) The specimens were immersed in distilled water at 37°C.....	44

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
Figure 3.18. The contact angle meter was used for measuring the surface wettability of specimens.....	45
Figure 3.19 a) Each square-shaped specimen was drilled at one corner to perform a hold for hanging with stainless steel wire b) The specimens were hanging in a plastic container containing the staining solution.....	46
Figure 4.1. The bar graphs show the mean tensile strength of vulcanized rubber at different doses of gamma irradiation.....	52
Figure 4.2 a) The water bath was modified for controlling the temperature of latex and <i>n</i> -BA. b) The inner site of plastic container consists of glass vial for containing <i>n</i> -BA.....	54
Figure 4.3. The tensile strength (MPa) of vulcanized rubber at different radiation doses and temperature condition .....	55
Figure 4.4. The tensile strength (MPa) of vulcanized rubber with the room temperature storage at different radiation doses.....	56
Figure 4.5 a) The graft copolymer sheet of natural rubber and EMA lower than 100 phr can not grind with carbine bur. b and c) The Coe Supersoft® sheet and the graft copolymer of natural rubber and 100 phr EMA sheet, respectively, can grind easily with carbine bur.....	57
Figure 4.6. The graft copolymer produced from 110 phr of EMA for grafting on natural latex showed the accumulation of solid granules .....	58
Figure 4.7. Transmission electron micrograph of prevulcanized latex.....	59

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
Figure 4.8. Transmission electron micrograph of graft copolymer by using 50% DRC of prevulcanized latex and 100 phr of EMA monomer.....	59
Figure 4.9. The infrared spectrum of latex vulcanized with 15 kGy irradiation.....	61
Figure 4.10. $T_g$ value of vulcanized rubber (top line), graft copolymer (middle line), and Coe Supersoft <sup>®</sup> (bottom line).....	62
Figure 4.11. The surface hardness of graft copolymer and Coe Supersoft <sup>®</sup> at different period of immersion time.....	64
Figure 4.12. The illustration of cross-linking of <i>cis</i> -1,4-polyisoprene and entanglement of polyethyl methacrylate.....	65
Figure 4.13. The mean and standard deviation of tear strength of graft copolymer and Coe supersoft <sup>®</sup> .....	66
Figure 4.14. Transmission electron micrographs (a) the interface between PMMA and graft copolymer (b) the interface between PMMA and Coe Supersoft <sup>®</sup> .....	68
Figure 4.15. The mean and standard deviation of tensile bond strength of graft copolymer and Coe Supersoft <sup>®</sup> .....	68
Figure 4.16. The % of water absorption of three materials: graft copolymer, Coe super Soft <sup>®</sup> , and vulcanized rubber .....	70
Figure 4.17 a) The discoloration for tested materials in coffee solution b) The discoloration for tested materials in tea solution c) The discoloration for tested materials in capsaicin-oil solution.....	73
Figure 4.18. The stained specimens after immersion in different solution over 8 weeks.....	74

<b>Figure</b>	<b>Page</b>
Figure 4.19. The inverted phase contrast micrograph (a) and scanning electron micrograph (b) of the human gingival fibroblasts co-cultured with the graft copolymer.....	75
Figure 4.20. The inverted phase contrast micrograph (a) and scanning electron micrograph (b) of the human gingival fibroblasts co-cultured with the Coe Supersof <sup>®</sup> .....	75

## ABBREVIATIONS

ASTM	American Society for Testing and Materials
CO <sub>2</sub>	Carbon dioxide
Co-60	Cobalt sixty
DAP	Diammonium hydrogen phosphate
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRC	Dry rubber content
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EMA	Ethyl methacrylate
ISO	International Standard Organization
HA latex	High ammoniated latex
kGy	KiloGray
KOH	Potassium hydroxide
kV	KiloVoltage
MEK	Methyl Ethyl Ketone
Mg <sup>++</sup>	Magnesium ion
MMA	Methyl methacrylate
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
MPa	Mega Pascal
MST	Mechanical stability time
<i>n</i> -BA	Normal butyl acrylate
NH <sub>4</sub> OH	Ammonium hydroxide



NRL	Natural rubber latex
OD	Optical density
PB	Phosphate buffer
PEMA	Polyethyl methacrylate
PBS	Phosphate buffer saline
phr	Part per hundred rubber
PMMA	Polymethyl methacrylate
ppm	Part per million
PVC	Poly(vinyl chloride)
IVNRL	Irradiated vulcanized natural rubber latex
SEM	Scanning electron microscopy
TEM	Transmission electron microscopy
$T_g$	Transitional glass temperature
TMTD	Tetramethyl thiuram disulfide
TSC	Total solid content
VFA	Volatile fatty acid
$\mu\text{l}$	Micro liter