บทที่ 2

ทฤษฎี

โปรตีนมีทั้งส่วนที่เป็นประจุลบและประจุบวก ดังนั้นจึงสามารถแลกเปลี่ยนประจุกับตัวแลกเปลี่ยนประจุทั้งแบบประจุลบและประจุบวก (cation/anion exchanger) ค่าประจุสุทธิของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรดหรือด่าง (pH) ในกรณีที่พีเอชมีค่าต่ำๆ ค่าประจุสุทธิจะเป็นบวก ในกรณีที่พีเอชมีค่าสูงๆ ค่าประจุสุทธิจะเป็นลบ ค่าพีเอชทำให้ค่าประจุสุทธิมีค่าเป็นศูนย์เรียกว่า ค่าไอโซอิเลคทริค ซึ่งที่จุดนี้โปรตีนจะไม่มีการแลกเปลี่ยนประจุใดๆ เกิดขึ้น

สมมติในการแยกสารผสมโปรตีน A ออกจากสารละลาย ถ้าโปรตีนดังกล่าวมีพีเอชที่จุดไอโซอิเลคทริก เป็น I_A และ $pH_2<I_A<pH_1$ พบว่าโปรตีน A จะมีประจุเป็นลบที่ pH_1 และมีประจุเป็นบวกที่ pH_2 ถ้าในกรณีที่ทำการทดลองในคอลัมน์ซึ่งบรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก ประจุบวกของโปรตีน A จะถูกแทนที่โดยการแลกเปลี่ยนกับตัวกลางที่เหมาะสม (S^+) ที่ pH_2 และถูกปลดปล่อยที่ pH_1 ซึ่งแสดงได้ตามสมการ

$$R^-S^+ + A^+ \rightarrow R^-A^+ + S^+ \qquad \text{ที่ } pH_2$$

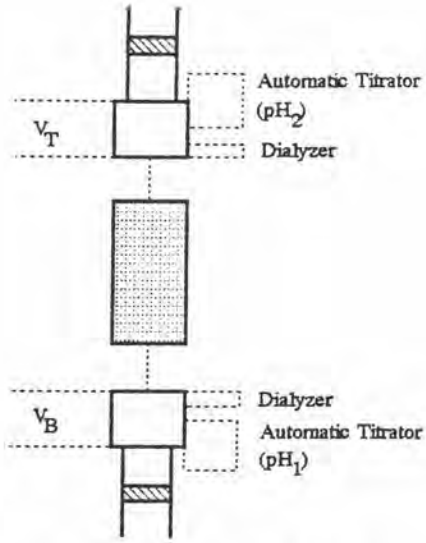
$$R^-A^- + S^+ \rightarrow R^-S^+ + A^- \qquad \text{ที่ } pH_1$$

ดังนั้นจากการทำการทดลองดังกล่าวข้างต้น ควรที่จะสามารถแยกโปรตีน A จากสารละลายได้ทางปลายของคอลัมน์ด้านที่มีค่าพีเอชสูง ผลการทดลองจะกลับกันในกรณีที่เลือกใช้ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ

2.1. แบบจำลองสมดุลของการแยกสารผสม สำหรับกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง

คุณลักษณะของกระบวนการพีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง สามารถอธิบายโดยใช้ แบบจำลองสมดุลของการถ่ายเทในแต่ละขั้นตอน (discrete transfer equilibrium stage model) โดยการสมมติให้คอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุถูกแบ่งออกเป็น N ขั้นตอน (stage) ซึ่งมีความยาวเท่ากับ Z/N เมื่อ Z คือค่าความยาวของคอลัมน์ แต่ละขั้นตอนแสดงได้ด้วยความสัมพันธ์ (I,J) เมื่อ I คือ ลำดับของขั้นตอน (stage number) และ J คือ ขั้นตอนการถ่ายเท (transfer step) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

การพิจารณาระบบเริ่มต้นที่ เมื่อระบบอยู่ในสภาวะสมดุลที่ J-1 ในแต่ละขั้นตอนจะมีความเข้มข้นในวัฏภาคของแข็งและของเหลวอยู่ในสมดุลของตัวเอง การแลกเปลี่ยนประจุจะเกิดขึ้นเมื่อ ของเหลวในแต่ละขั้นตอนของคอลัมน์ถูกแทนที่ด้วยของเหลวในขั้นตอนถัดไปอย่างสมบูรณ์ ดังนั้นของเหลวที่ขั้นตอน (I,J-1) ซึ่งในขณะที่อยู่ในสภาวะสมดุลอยู่ตรงกันข้ามกับของแข็งในขั้นตอน (I,J-1) จะมาปรากฏอยู่ตรงกันข้ามกับของแข็งใน



รูปที่ 2.2 กระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบคอลัมน์เดียว

ใช้เครื่องไตรเตรทแบบอัตโนมัติ สำหรับค่าความเข้มข้นของไอออนในสารละลายสะเทิน (buffer ionic strength) ของถังพักด้านบน และด้านล่างจะรักษาค่าโดยใช้เครื่องกรองแบบ ฮอลโล ไฟเบอร์

ระบบการไหลในแต่ละรอบของการดำเนินการทดลองจะมี 4 ขั้นตอน การทดลองจะดำเนินซ้ำๆ ในแต่ละรอบจนกระทั่งได้ค่าความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

ขั้นตอนที่ 1. สารละลายจากถังพักด้านบนที่ pH_2 จะถูกใส่ลงในคอลัมน์ พร้อมกันนั้นสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์จะไหลลงสู่ถังพักด้านล่าง

ขั้นตอนที่ 2. เป็นขั้นตอนการหมุนวน (circulate) ของสารละลายระหว่างถังพักด้านบนกับคอลัมน์ ขั้นตอนนี้จะสิ้นสุดลงเมื่อค่าพีเอชของสารละลายมีค่าเท่ากับ pH_2 และค่าความเข้มข้นของสารละลายในคอลัมน์กับถังพักด้านบนมีค่าเท่ากัน

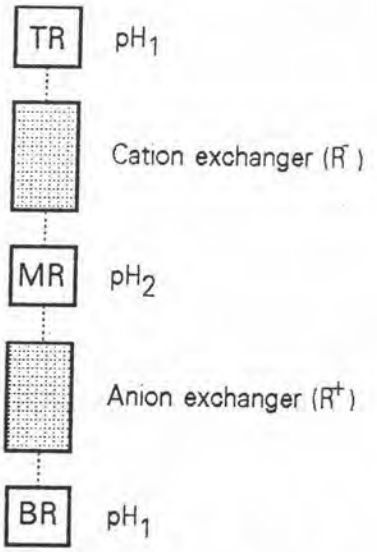
ขั้นตอนที่ 3. สารละลายจากถังพักด้านล่างที่ pH_1 จะผ่านเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์ และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์จะไหลเข้าไปในถังพักด้านบน

ขั้นตอนที่ 4. เป็นขั้นตอนการหมุนวนของสารละลายระหว่างถังพักด้านล่างกับคอลัมน์ ขั้นตอนนี้จะสิ้นสุดลงเมื่อค่าพีเอชของสารละลายมีค่าเท่ากับ pH_1 และค่าความเข้มข้นของสารละลายในคอลัมน์กับถังพักด้านล่างมีค่าเท่ากัน

2.3. <u>การแยกสารผสมโปรตีนโดยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบสองคอลัมน์</u>

จากการพิจารณาในระบบสองคอลัมน์พบว่า จะมีคอลัมน์หนึ่งบรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และอีกคอลัมน์จะบรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ เพื่อจุดประสงค์ในการแยกสารละลายผสมสองชนิด (สมมติให้เป็น

โปรตีน A และ B) ที่มีค่าพีเอชที่จุดไอโซอิเลคทริคเป็น I_A และ I_B ตามลำดับ โดยการกำหนดให้ $pH_3<I_B<pH_2$ และ $pH_2<I_A<pH_1$ เมื่อ pH_1,pH_2 และ pH_3 เป็นระดับพีเอชในถังพักแต่ละชนิด โปรตีน A และ โปรตีน B จะมีประจุเป็นลบที่ pH_1 และมีประจุเป็นบวกที่ pH_3 ในขณะที่ pH_2 โปรตีน A และ B จะมีประจุเป็นบวกและลบตามลำดับ ขั้นตอนการดำเนินการทดลองในแต่ละรอบของระบบสองคอลัมน์ มีดังนี้ (สำหรับกรณี 3 ถังพัก)



รูปที่ 2.3 กระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบสองคอลัมน์

ขั้นตอนที่ 1. สารละลายในถังพักด้านบน จะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์บนจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง ในเวลาเดียวกันนั้นสารละลายในถังพักตรงกลางจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์คอลัมน์ล่าง (บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ) และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านล่าง

ขั้นตอนที่ 2. เป็นขั้นตอนการปรับค่าพีเอชซึ่งทำได้โดยการหมุนวนสารละลายระหว่างถังพักด้านบนกับคอลัมน์บน และระหว่างถังพักตรงกลางกับคอลัมน์ล่าง ค่าพีเอชในคอลัมน์บนจะเปลี่ยนจาก pH_2 เป็น pH_1 และในเวลาเดียวกันค่าพีเอชในคอลัมน์ล่างจะเปลี่ยนจาก pH_1 เป็น pH_2 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในขั้นตอนนี้แล้วพบว่าจะเกิดสภาวะสมดุลขึ้นใหม่ทั้งสองคอลัมน์

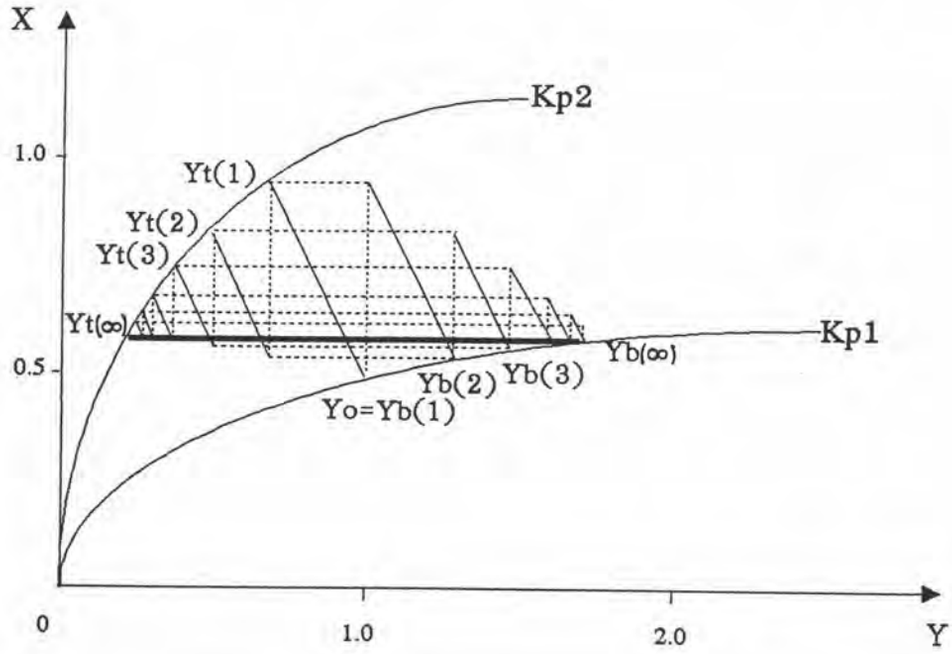
ขั้นตอนที่ 3. สารละลายในถังพักด้านล่างจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ล่าง สารละลายในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง และในเวลาเดียวกันนั้นสารละลายในถังพักตรงกลาง จะถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์บน

ขั้นตอนที่ 4. เป็นขั้นตอนการปรับค่าพีเอชซึ่งทำได้โดยการหมุนวนสารละลายระหว่างถังพักด้านบน

กับคอลัมน์บน และระหว่างถังพักตรงกลางกับคอลัมน์ล่าง ค่าพีเอชในคอลัมน์บนจะเปลี่ยนจาก pH_1 เป็น pH_2 และในเวลาเดียวกันค่าพีเอชในคอลัมน์ล่างจะเปลี่ยนจาก pH_2 เป็น pH_1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในขั้นตอนนี้แล้ว พบว่าจะเกิดสภาวะสมดุลขึ้นใหม่ทั้งสองคอลัมน์

2.4. <u>การทำนายผลการทดลองโดยใช้กราฟ</u>

ถ้ากำหนดให้ X เป็นค่าความเข้มข้นของโปรตีน A ในวัฏภาคของแข็ง และ Y เป็นค่าความเข้นข้นในวัฏภาคของเหลว จากการใช้สมการที่ 2.2 จะสามารถเขียนเส้นสมดุลได้ 2 เส้น สำหรับระบบคอลัมน์เดียวบนระนาบ X-Y ขั้นตอนการทำนายผลสำหรับการดำเนินการทดลองรอบแรกสามารถอธิบายได้ดังนี้



รูปที่ 2.4 การทำนายผลการทดลองโดยใช้กราฟ

ขั้นตอนที่ 1. เมื่อสารละลายในถังพักด้านบนถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์ และสารละลายในคอลัมน์ถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านล่าง จะทำให้ค่าความเข้มข้นของถังพักด้านล่าง (Yb) จะมีค่าเท่ากับ Yo

ขั้นตอนที่ 2. เป็นขั้นตอนการปรับสภาพค่าพีเอชในคอลัมน์ให้คงที่ (pH_2) และเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลองค์ประกอบใหม่ในคอลัมน์แสดงได้เป็น (Yt(1),Xt(1)) ซึ่งสามารถคำนวณได้โดยการใช้สมการ 2.1 และสมการ 2.2 ถ้าเชื่อมจุด Yb(1) กับ Yt(1) จะได้เส้นดำเนินการทดลอง (operating line)

ขั้นตอนที่ 3. สารละลายในถังพักด้านล่างถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์ และสารละลายในคอลัมน์จะ

ถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านบน เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้พบว่า องค์ประกอบในคอลัมน์แสดงได้เป็น (Yb(1),Xt(1))

ขั้นตอนที่ 4. เป็นขั้นตอนการปรับสภาพค่าพีเอชในคอลัมน์ให้คงที่ (pH_1) และเมื่อระบบเข้าสู่สภาวะสมดุลองค์ประกอบใหม่ในคอลัมน์แสดงได้เป็น (Yb(2),Xb(2)) ซึ่งสามารถคำนวณได้โดยการใช้สมการ 2.1 และสมการ 2.2 และสามารถสร้างเส้นดำเนินการทดลองได้อีกหนึ่งเส้น ซึ่งพบว่าขนานกับเส้นดำเนินการทดลองเดิม

การทำนายผลการทดลองในลำดับต่อไปจะเป็นการทำซ้ำในขั้นตอนที่ 1 ถึงขั้นตอนที่ 4 ข้างต้น โดยที่ค่าความเข้มข้นในถังพักการทดลองด้านล่างจะเปลี่ยนจาก Yb(1) เป็น Yb(2) และเมื่อทำการทำนายตามขั้นตอนดังกล่าวซ้ำๆ กัน จนกระทั่งจำนวนรอบของการทำนายมีค่ามากพอ ค่าความเข้มข้นของสารละลายในถังพักด้านบน (Yt) และถังพักด้านล่าง (Yb) ที่ต้องการจะมีค่าเข้าสู่สภาวะคงตัว (เส้นทึบ) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 2.4

2.5. <u>รูปแบบของระบบการแยกโปรตีน ฮีโมโกลบิน-อัลบูมิน</u>

รูปแบบของระบบการแยกโปรตีน ฮีโมโกลบิน-อัลบูมิน ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 รูปแบบ

2.5.1. การทดลองแยกโปรตีน ฮีโมโกลบิน-อัลบูมิน รูปแบบที่ 1.

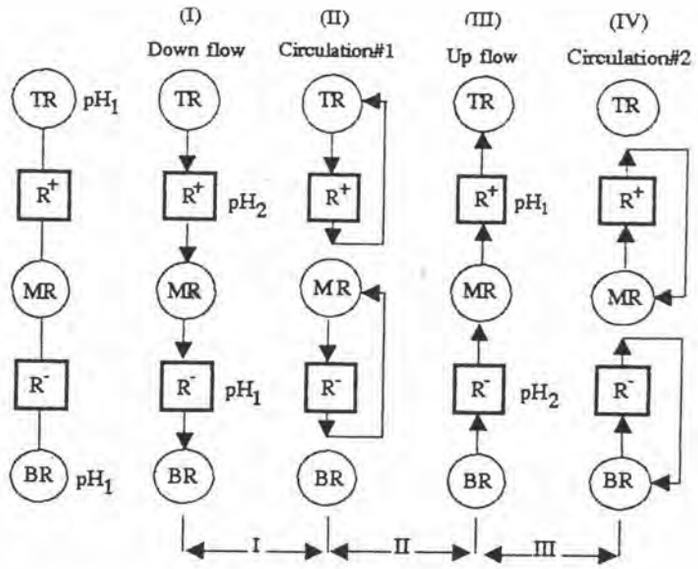
ระบบนี้มีจำนวนถังพักทั้งหมด 3 ถัง ค่าพีเอชในถังพักด้านบนและถังพักด้านล่างถูกควบคุมที่ pH_1 ค่าพีเอชของถังพักตรงกลางถูกควบคุมที่ pH_2 ที่สภาวะเริ่มต้นถังพักทั้งหมดรวมทั้งคอลัมน์ทั้งสอง อยู่ในสภาวะสมดุลที่ pH_1 และ pH_2 ตามลำดับ (รูปที่ 2.5) การดำเนินการทดลองในแต่ละรอบจะประกอบด้วย

ขั้นตอนที่ 1. สารละลายในถังพักด้านบนจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์บนจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง ในเวลาเดียวกันนั้นสารละลายในถังพักตรงกลางจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านล่าง

ขั้นตอนที่ 2. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านบนกับคอลัมน์บน และระหว่างถังพักตรงกลางกับคอลัมน์ล่าง

ขั้นตอนที่ 3. สารละลายในถังพักด้านล่างจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ล่าง สารละลายในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง และในเวลาเดียวกันสารละลายในถังพักตรงกลางถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์บน สารละลายในคอลัมน์บนจะถูกส่งเข้าไปในถังพักด้านบน

ขั้นตอนที่ 4. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านล่างกับคอลัมน์ล่าง และระหว่างถังพักตรงกลางกับคอลัมน์บน



รูปที่ 2.5 กระบวนการแยกสารผสมโดยใช้ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง รูปแบบที่ 1.

2.5.2. การทดลองแยกโปรตีน ฮีโมโกลบิน-อัลบูมิน รูปแบบที่ 2.

ระบบนี้มีจำนวนถังพักทั้งหมด 4 ถัง ค่าพีเอชในถังพักด้านบนและถังพักด้านล่างถูกควบคุมที่ pH_1 ค่าพีเอชของถังพักตรงกลางถูกควบคุมที่ pH_2 ส่วนค่าพีเอชของถังพักด้านข้างถูกควบคุมที่ pH_3 ที่สภาวะคอลัมน์ทั้งสองอยู่ในสภาวะสมดุลที่ pH_3 และ pH_1ตามลำดับ (รูปที่ 2.6) การดำเนินการทดลองในแต่ละรอบจะประกอบด้วย

ขั้นตอนที่ 1. สารละลายในถังพักด้านบนจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์บนจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านข้าง ในเวลาเดียวกันสารละลายในถังพักตรงกลางจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ล่าง และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านล่าง

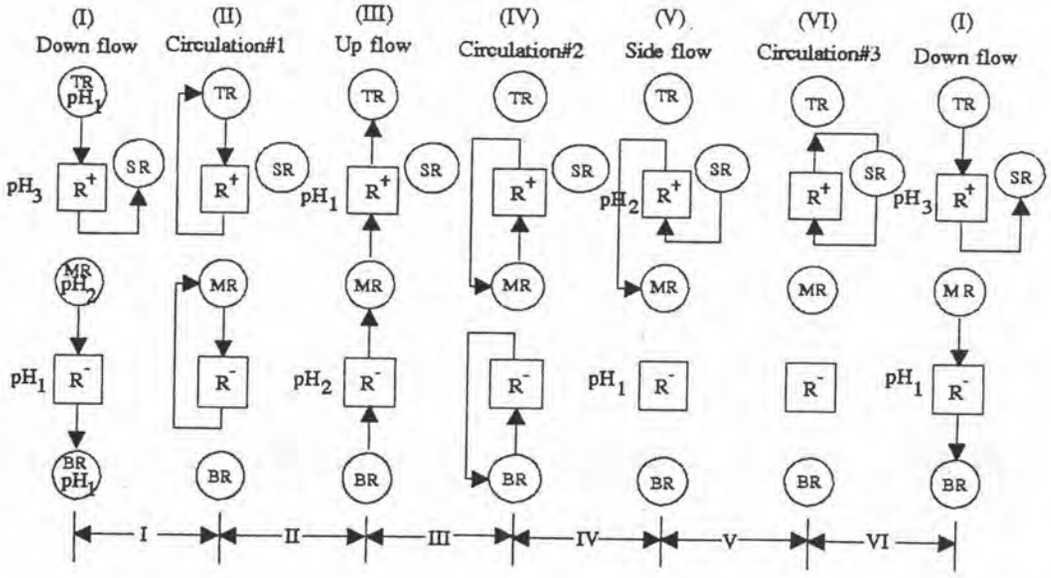
ขั้นตอนที่ 2. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านบนกับคอลัมน์บน และระหว่างถังพักตรงกลางกับคอลัมน์ล่าง

ขั้นตอนที่ 3. สารละลายในถังพักด้านล่างจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ล่าง สารละลายในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง และในขณะเดียวกันสารละลายในถังพักตรงกลางถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์บน สารละลายในคอลัมน์บนจะถูกส่งเข้าไปในถังพักด้านบน

ขั้นตอนที่ 4. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านล่างกับคอลัมน์ล่าง และระหว่างถังพักตรงกลางกับคอลัมน์บน

ขั้นตอนที่ 5. สารละลายในถังพักด้านข้างจะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์บน สารละลายในคอลัมน์บนจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง

ขั้นตอนที่ 6. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านข้างกับคอลัมน์บน



รูปที่ 2.6 กระบวนการแยกสารผสมโดยใช้ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง รูปแบบที่ 2.

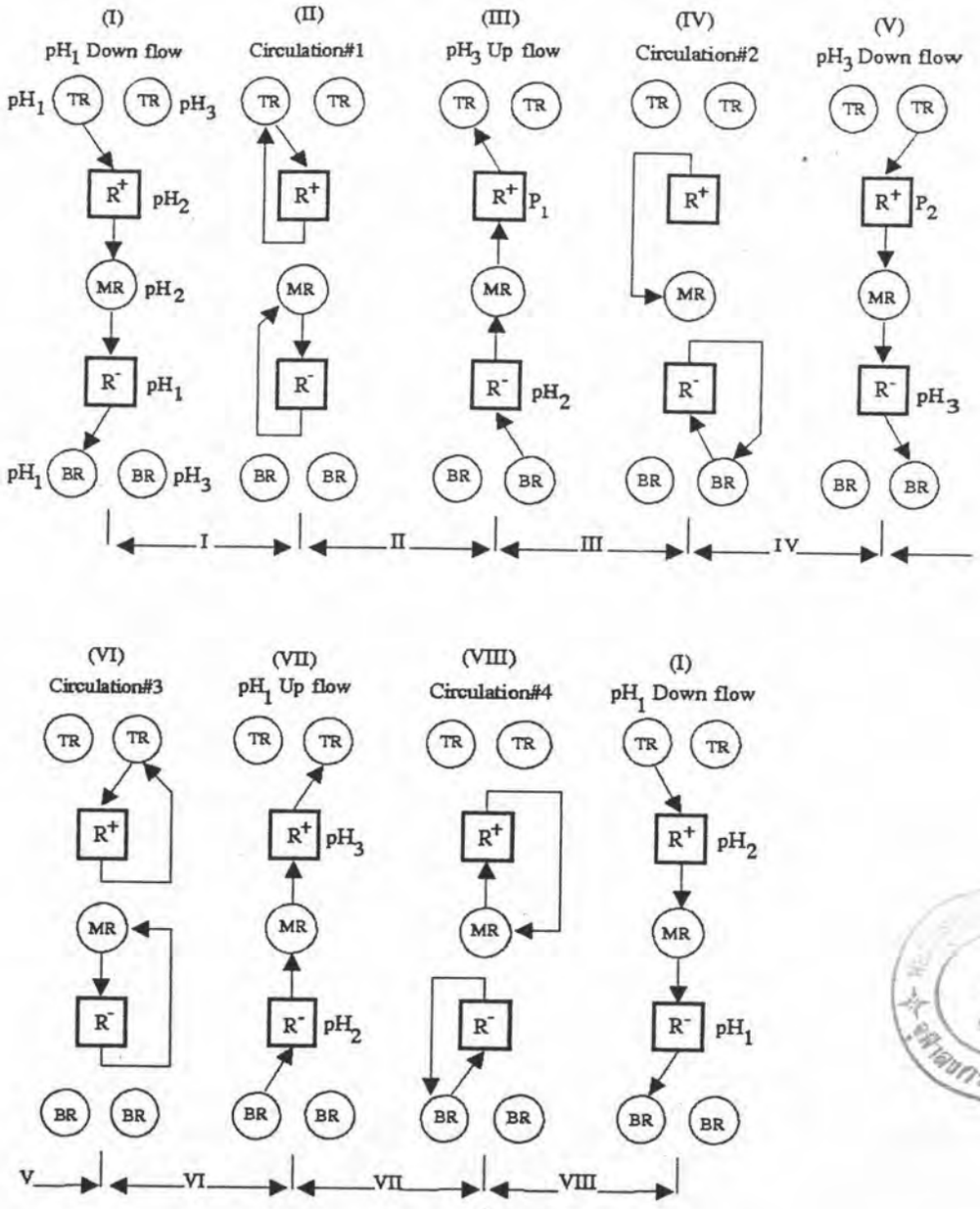
2.5.3. การทดลองแยกโปรตีน ฮีโมโกลบิน-อัลบูมิน รูปแบบที่ 3.

ระบบนี้มีจำนวนถังพักทั้งหมด 5 ถัง ค่าพีเอชในถังพักด้านบน และถังพักด้านล่างซึ่งมีอย่างละสองถังถูกควบคุมที่ pH_1 และ pH_3 ตามลำดับ ค่าพีเอชของถังพักตรงกลางถูกควบคุมที่ pH_2 ที่สภาวะเริ่มต้นคอลัมน์ทั้งสองอยู่ในสภาวะสมดุลที่ pH_2 และ pH_1 (รูปที่ 2.7) การดำเนินการทดลองในแต่ละรอบจะประกอบด้วย

ขั้นตอนที่ 1. สารละลายในถังพักด้านบน (pH_1) ถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์บน และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์บนถูกส่งไปยังถังพักตรงกลาง ในเวลาเดียวกันนั้นสารละลายในถังพักตรงกลางถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์อีกคอลัมน์หนึ่ง (pH_1) และสารละลายที่อยู่ในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักด้านล่าง

ขั้นตอนที่ 2. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านบน (pH_1) กับคอลัมน์บน และระหว่างถังพักตรงกลาง (pH_2) กับคอลัมน์ล่าง

ขั้นตอนที่ 3. สารละลายในถังพักด้านล่าง (pH_3) จะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ล่าง และสารละลายในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง และในขณะเดียวกันสารละลายในถังพักตรงกลางถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์บน สารละลายในคอลัมน์บนจะถูกส่งเข้าไปในถังพักด้านบน (pH_1)



รูปที่ 2.7 กระบวนการแยกสารผสมโดยใช้ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง รูปแบบที่ 3

ขั้นตอนที่ 4. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านล่าง (pH_3) กับคอลัมน์ล่าง และระหว่างถังพักตรงกลาง (pH_2) กับคอลัมน์บน

ขั้นตอนที่ 5. สารละลายในถังพักด้านบน (pH_3) ถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์บน สารละลายในคอลัมน์บนจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง ในขณะเดียวกันสารละลายในถังพักตรงกลางถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์ล่าง และสารละลายในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งเข้าไปในถังพักด้านล่าง (pH_3)

ขั้นตอนที่ 6. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านบน (pH_3) กับคอลัมน์บน และระหว่างถังพักตรงกลาง (pH_2) กับคอลัมน์ล่าง

ขั้นตอนที่ 7. สารละลายในถังพักด้านล่าง (pH_1) จะถูกส่งเข้าไปในคอลัมน์ล่าง และสารละลายในคอลัมน์ล่างจะถูกส่งผ่านไปยังถังพักตรงกลาง และในขณะเดียวกันสารละลายในถังพักตรงกลางถูกส่งผ่านเข้าไปในคอลัมน์บน สารละลายในคอลัมน์บนจะถูกส่งเข้าไปในถังพักด้านบน (pH_3)

ขั้นตอนที่ 8. เป็นขั้นตอนการหมุนวนระหว่างถังพักด้านล่าง (pH_1) กับคอลัมน์ล่าง และระหว่างถังพักตรงกลาง (pH_2) กับคอลัมน์บน