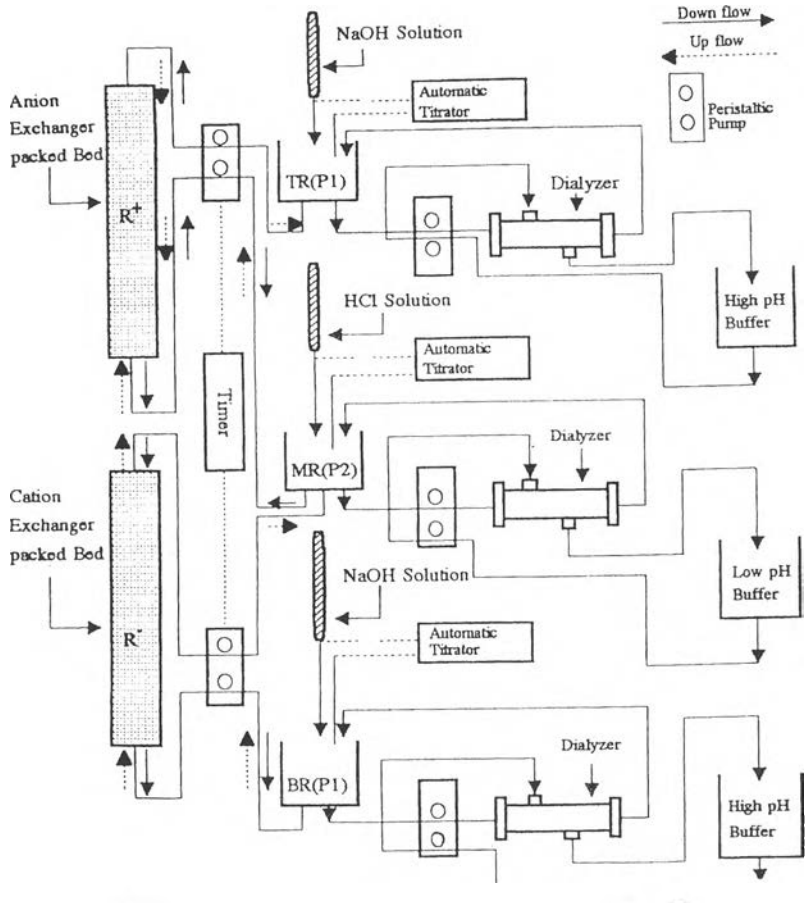
บทที่ 3

การทดลอง และวิธีการพัฒนาโปรแกรม

3.1 การทดลอง และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ภาพแสดงการจัดวางอุปกรณ์สำหรับการทดลองในระบบสองคอลัมน์ ตามวิธีที่ 1 แสดงไว้ในรูปที่ 12 ชุดทดลอง จะถูกควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 4.5°C (40°F) โดยประกอบไปด้วย โครมาโตกราฟี คอลัมน์สองอัน คอลัมน์หนึ่งจะถูกบรรจุไว้ด้วย DEAE-Sepharose (ทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ) ส่วนอีกคอลัมน์หนึ่งจะถูกบรรจุไว้ด้วย CM-Sepharose (ทำหน้าที่เป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก) คอลัมน์ทั้งสองจะต่ออยู่กับถังพักทั้งหมด 3 ถัง คือ ถังพักด้านบน (TR), ถังพักตรงกลาง (MR) และถังพักด้านล่าง (BR)



รูปที่ 3.1 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง ระบบสองคอลัมน์

สารผสมจะถูกทำให้ไหลกลับไปกลับมาในคอลัมน์ โดยใช้เพอริสเตติคปั๊มจำนวน 2 ตัว ซึ่งจะถูกควบคุมให้ทำงานโดยอัตโนมัติด้วยเครื่องจับเวลา ส่วนค่าพีเอชในถังพักทั้งสาม จะถูกควบคุมโดยการ ติเตรตด้วยกรดไฮโดรคลอริค และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความแรงของกรดและเบสได้ถูกเลือกให้มีผลกระทบต่อความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์น้อยที่สุด สารผสมในถังพักจะถูกคนด้วยเครื่องคนแม่เหล็ก เพื่อให้มั่นใจว่าเข้ากันกับสารติแตรนท์เป็นอย่างดี ส่วนประจุของสารผสมจะถูกรักษาให้คงที่โดยใช้ฮอลโลไฟเบอร์ไดอะไลเซอร์ การจัดอุปกรณ์ที่แสดงในรูปที่ 3.1 สามารถนำมาใช้ในการทดลองวิธีที่ 2 และวิธีที่ 4

สารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับค่า พีเอช P_1 และ P_2 จะใช้สารละลายผสมระหว่าง tris (hydroxy methyl) aminomethane maleate sodium hydroxide กับ โซเดียมคลอไรด์ ส่วนสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับค่าพีเอช P_3 จะใช้สารละลายผสมระหว่าง กรดอะซีติค กับ โซเดียมอะซีเตต และ โซเดียมคลอไรด์

สารผสมระหว่างโปรตีนสองชนิดที่ใช้ในการทดลองได้แก่

	ชนิดของโปรตีน	น้ำหนักโมเลกุล	น้ำหนักไอโซอิเลคตริก
A	ฮีโมโกลบิน	63000	6.7
B	อัลบูมิน	69000	4.7

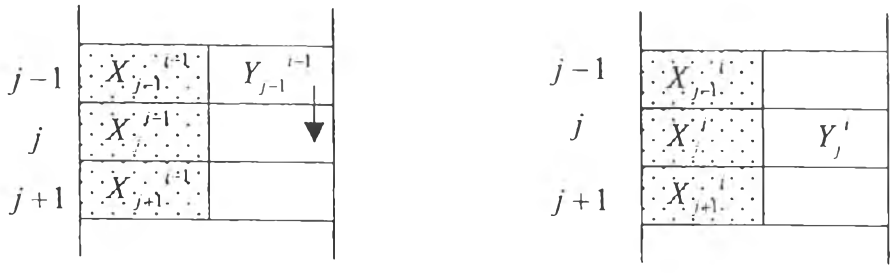
ฮีโมโกลบินที่ใช้ในการทดลองเป็น Worthington human haemoglobin และ ส่วนอัลบูมินเป็น Human serum albumin

ค่าพีเอชที่เลือกใช้ จะต้องเลือกให้เหมาะสมกับจุดไอโซอิเลคตริคของโปรตีนทั้งสองชนิด กล่าวคือ $P_3<I_B<P_2<I_A<P_1$

ตัวแลกเปลี่ยนประจุ CM- และ DEAE-Sepharose ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของ cross-linked agarose gel Sepharose CL-6B มีลักษณะเป็นเม็ดที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ ทำให้มีประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนประจุสูง

3.2 การพัฒนาโปรแกรมเพื่อการคำนวณตามหลักการทางพีชคณิต

ในการศึกษาการแยกสารโปรตีนโดยการใช้กระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง การคำนวณหาค่าความเข้มข้นสารโปรตีนในถังพักของแต่ละรอบการทดลอง ใช้หลักการตามหลักพีชคณิตเชิงเส้น โดยการแบ่งคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุออกเป็นส่วนย่อย ๆ แล้วทำการสมดุลมวลสารรอบส่วนย่อยต่าง ๆ ในขณะที่สารโปรตีนไหลลงสู่ด้านล่างจากถังพักด้านบน



เวลา i −1 เวลา i

input = output

$$\bar{v}x_j^{\,i-1} + vy_{j-1}^{\,i-1} = \bar{v}x_j^{\,i} + vy_j^{\,i} \qquad \text{.....3.1}$$

ซึ่ง $\bar{v}$ = ปริมาตรของตัวแลกเปลี่ยนประจุ

v = ปริมาตรของของเหลว

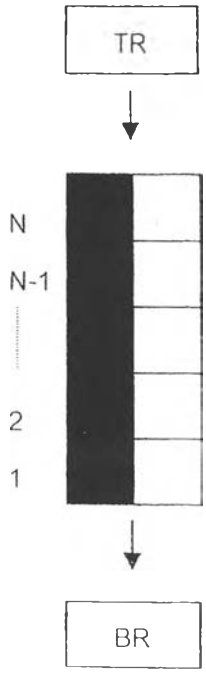
x = ความเข้มข้นสารโปรตีนในวัฏภาคของแข็ง

y = ความเข้มข้นสารโปรตีนในวัฏภาคของเหลว

i = เวลา

j = ส่วนย่อยในคอลัมน์

ถ้าศึกษาทั้งคอลัมน์ โดยการแบ่งแต่ละคอลัมน์ออกเป็น N ส่วนย่อย และ ทางด้านบนประกอบด้วยถังพักด้านบน ส่วนด้านล่างประกอบด้วยถังพักด้านล่างจะได้



$$\bar{v}x^{0}{}_{N} + vy^{0}{}_{T} = \bar{v}x^{1}{}_{N} + vy^{1}{}_{N}$$

$$\bar{v}x^{0}{}_{N-1} + vy^{0}{}_{N} = \bar{v}x^{1}{}_{N-1} + vy^{1}{}_{N-1}$$

$$\vdots$$

$$\bar{v}x^{0}{}_{2} + vy^{0}{}_{3} = \bar{v}x^{1}{}_{2} + vy^{1}{}_{2}$$

$$\bar{v}x^{0}{}_{1} + vy^{0}{}_{2} = \bar{v}x^{1}{}_{1} + vy^{1}{}_{1}$$

$$y^{0}{}_{1} = y^{1}{}_{B} \qquad \text{.....3.2}$$

ในการศึกษาของ Chen ได้กำหนดให้ x เป็นฟังก์ชั่นเชิงเส้นกับ y ตามความสัมพันธ์

$$x = k\,y \qquad \text{.....3.3}$$

หรือ $$k = x/y \qquad \text{.....3.4}$$

ซึ่ง Chen ได้ตั้งสมมติฐานกำหนดให้ค่า k เป็นค่าคงที่ตลอดการทดลอง แต่ในงานวิจัยนี้ได้กำหนดให้ x เป็นฟังก์ชั่นโพลิโนเมียลกับ y โดยมีความสัมพันธ์แตกต่างกันในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุที่ต่างกัน ในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก ความสัมพันธ์แสดงได้ดังสมการ

$$x = f(y) = Ay^{3} + By^{2} + Cy + D \qquad \text{.....3.5}$$

ส่วนในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ ความสัมพันธ์จะแสดงได้ดังนี้

$$x = f(y) = Ay^2 + By + C + D/y \qquad \text{.....3.6}$$

ดังนั้นค่าของ k ในงานวิจัยนี้จึงมีค่าไม่คงที่ โดยจะเปลี่ยนแปลงตามค่าความเข้มข้นของโปรตีน y_i ที่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลาที่ทำการทดลอง ซึ่งค่า k_i ในแต่ละรอบของการทดลองสามารถหาได้จากสมการ

$$k_i^{+} = \frac{f(y_{i-1})}{y_{i-1}} = \Delta y_{i-1}^{\,2} + By_{i-1} + C + \frac{D}{y_{i-1}} \qquad \text{...3.7}$$

$$k_i^{-} = \frac{f(y_{i-1})}{y_{i-1}} = \Delta y_{i-1}^{\,-2} + By_{i-1}^{\,-1} + C + \frac{D}{y_{i-1}^{\,-1}} \qquad \text{...3.8}$$

i รอบของการทดลอง

k_i ค่าสมดุลในการทดลองครั้งที่ i

y_{i-1} ค่าความเข้มข้นของสารโปรตีน ในวัฏภาคของเหลวในการทดลองครั้งที่ i -1

สมการค่าสมดุล (k_i) ที่ใช้ในโปรแกรมสำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนประกอบด้วย 2 สมการความสัมพันธ์ที่แตกต่างกัน คือในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^{+}) มีความสัมพันธ์ดังนี้

$$k_i = Ay_i^{\,2} + By_i + C + \frac{D}{y_i} \qquad \text{.....3.9}$$

ส่วนในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R) มีความสัมพันธ์ดังนี้

$$k_i = Ay_i^{-2} + By_i^{-1} + C + \frac{D}{y_i^{-1}} \qquad \text{.....3.10}$$

โดยที่ค่า A, B, C และ D เป็นค่าที่คงที่ของแต่ละสมการค่าสมดุล ซึ่งในการศึกษาจะทำการหาค่าของค่าคงที่ A, B, C และ D เพื่อทำให้ผลของการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนจากโปรแกรมที่พัฒนาขึ้นนั้นมีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการทดลองต่อไป

ในการเริ่มต้นการคำนวณ สามารถหาค่า k_1 สำหรับใช้ในการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของโปรตีน ในวัฏภาคของเหลว y_1 จากค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารโปรตีน ในวัฏภาคของเหลว y_0

$$\bar{V}k_1y_N^{\,0} + Vy_T^{\,0} = \bar{V}k_1y_N^{\,1} + Vy_N^{\,1}$$

$$\bar{V}k_1y_{N-1}^{\,0} + Vy_N^{\,0} = \bar{V}k_1y_{N-1}^{\,1} + Vy_{N-1}^{\,1}$$

$$\vdots$$

$$\bar{V}k_1y_2^{\,0} + Vy_3^{\,0} = \bar{V}k_1y_2^{\,1} + Vy_2^{\,1}$$

$$\bar{V}k_1y_1^{\,0} + Vy_2^{\,0} = \bar{V}k_1y_1^{\,1} + Vy_1^{\,1}$$

$$y_1^{\,0} = y_{B1}^{\,1} \qquad \text{.....3.11}$$

สมการดังกล่าวสามารถหาค่าความเข้มข้นสารโปรตีนในถังพักทางด้านล่าง y_{B1} ได้ จากนั้นสามารถใช้ค่า y_{B1} เพื่อหาค่าของ k_2 โดยการแทนค่าในสมการที่ 3.9 หรือสมการที่ 3.10 ในลักษณะเดียวกันสามารถหาค่าความเข้มข้นสารโปรตีนในถังพักทางด้านล่างในการทำงานรอบที่ 2 คือ y_{B2} ได้เช่นเดียวกัน

$$\bar{V}k_2 y_N{}^0 + Vy_T{}^0 = \bar{V}k_2 y_N{}^1 + Vy_N{}^1$$

$$\bar{V}k_2 y_{N-1}{}^0 + Vy_N{}^0 = \bar{V}k_2 y_{N-1}{}^1 + Vy_{N-1}{}^1$$

$$\vdots$$

$$\bar{V}k_2 y_2{}^0 + Vy_3{}^0 = \bar{V}k_2 y_2{}^1 + Vy_2{}^1$$

$$\bar{V}k_2 y_1{}^0 + Vy_2{}^0 = \bar{V}k_2 y_1{}^1 + Vy_1{}^1$$

$$y_1{}^0 = y_{B2}{}^1$$

ในทำนองเดียวกันก็สามารถหาค่าความเข้มข้นสารโปรตีน y_i ในการคำนวณรอบที่ i ใดๆ ได้โดยการหาค่า k_i จากค่าความเข้มข้นของสารโปรตีนในวัฏภาคของเหลว y_{i-1} จากสมการที่3.9 และสมการที่ 3.10 หลังจากนั้นจึงนำค่า k_i ที่หาได้จากสมการ 3.9 หรือ 3.10 ไปใช้แทนในสมการที่ 3.2 จะได้

$$\bar{v}ky^0{}_N + vy^0{}_T = \bar{v}ky^1{}_N + vy^1{}_N$$

$$\bar{v}ky^0{}_{N-1} + vy^0{}_N = \bar{v}ky^1{}_{N-1} + vy^1{}_{N-1}$$

$$\vdots$$

$$\bar{v}ky^0{}_2 + vy^0{}_3 = \bar{v}ky^1{}_2 + vy^1{}_2$$

$$\bar{v}ky^0{}_1 + vy^0{}_2 = \bar{v}ky^1{}_1 + vy^1{}_1$$

$$y^0{}_1 = y^1{}_B \qquad \text{.....3.13}$$

นิยามให้

$$A = \bar{v}k + v \qquad \text{.....3.14}$$

จัดรูปสมการข้างต้นให้อยู่ในระบบเมตริกซ์จะได้ดังนี้

$$\begin{bmatrix} v & \bar{v}k & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & v & \bar{v}k & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & v & \bar{v}k & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & & \\ 0 & 0 & 0 & 0 & v & \bar{v}k & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & v & \bar{v}k \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & v \end{bmatrix} \begin{bmatrix} y^0{}_T \\ y^0{}_N \\ y^0{}_{N-1} \\ \vdots \\ y^0{}_3 \\ y^0{}_2 \\ y^0{}_1 \end{bmatrix} = A \begin{bmatrix} y^1{}_N \\ y^1{}_{N-1} \\ y^1{}_{N-2} \\ \vdots \\ y^1{}_2 \\ y^1{}_1 \\ y^1{}_B \end{bmatrix}$$

$$Py_j^{\,i-1} = Ay_j^{\,i} \qquad \text{.....3.15}$$

โดย P และ A เป็นเมตริกซ์ค่าคงที่

ส่วนในการป้อนสารโปรตีนให้ไหลกลับขึ้นทางด้านบน ก็สามารถเขียนสมการได้ในลักษณะเดียวกัน คือ

$$\bar{v}ky^0{}_1 + vy^0{}_B = \bar{v}ky^1{}_1 + vy^1{}_1$$
$$\bar{v}ky^0{}_2 + vy^0{}_1 = \bar{v}ky^1{}_2 + vy^1{}_2$$
$$\vdots$$
$$\bar{v}ky^0{}_{N-1} + vy^0{}_{N-2} = \bar{v}ky^1{}_{N-1} + vy^1{}_{N-1}$$
$$\bar{v}ky^0{}_N + vy^0{}_{N-1} = \bar{v}ky^1{}_N + vy^1{}_N$$
$$y^0{}_N = y^1{}_T \qquad \text{.....3.16}$$

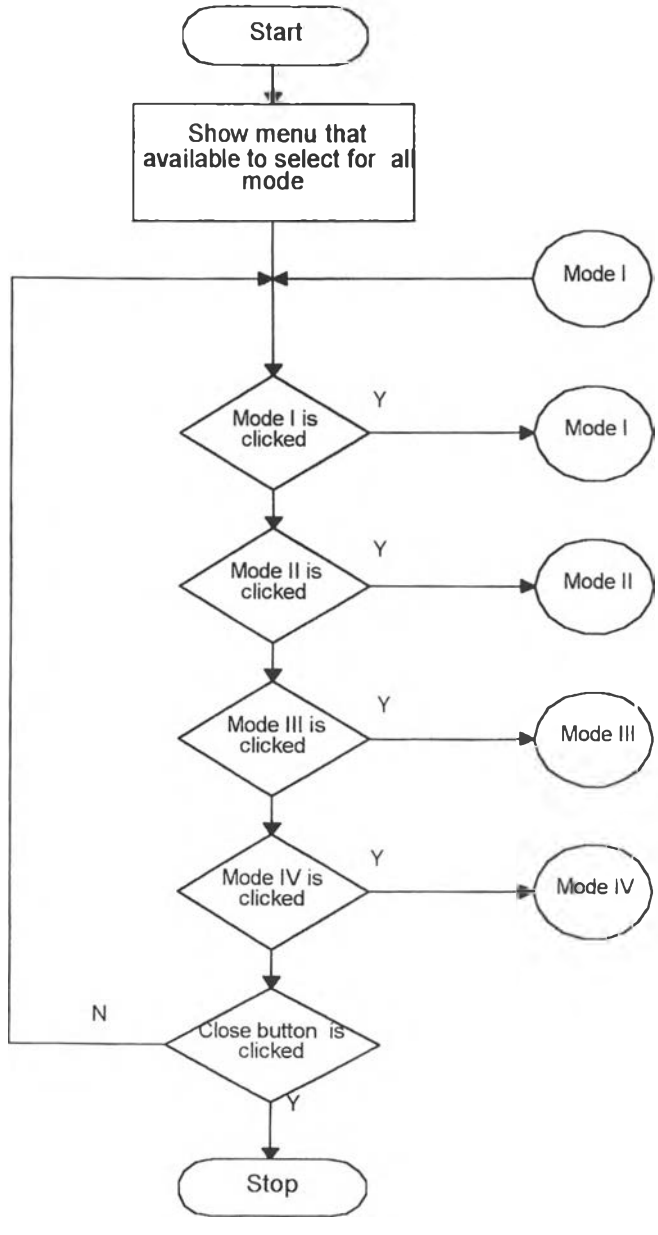
I 19080 60X

จัดรูปให้อยู่ในระบบเมตริกซ์จะได้

$$\begin{bmatrix} \nu & \bar{\nu}k & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \nu & \bar{\nu}k & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & \nu & \bar{\nu}k & 0 & 0 & 0 \\ & & & & & & \\ 0 & 0 & 0 & 0 & \nu & \bar{\nu}k & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & \nu & \bar{\nu}k \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & A \end{bmatrix} \begin{bmatrix} y^0{}_B \\ y^0{}_1 \\ y^0{}_2 \\ \\ y^0{}_{N-2} \\ y^0{}_{N-1} \\ y^0{}_N \end{bmatrix} = A \begin{bmatrix} y^1{}_1 \\ y^1{}_2 \\ y^1{}_3 \\ \\ y^1{}_{N-1} \\ y^1{}_N \\ y^1{}_T \end{bmatrix}$$

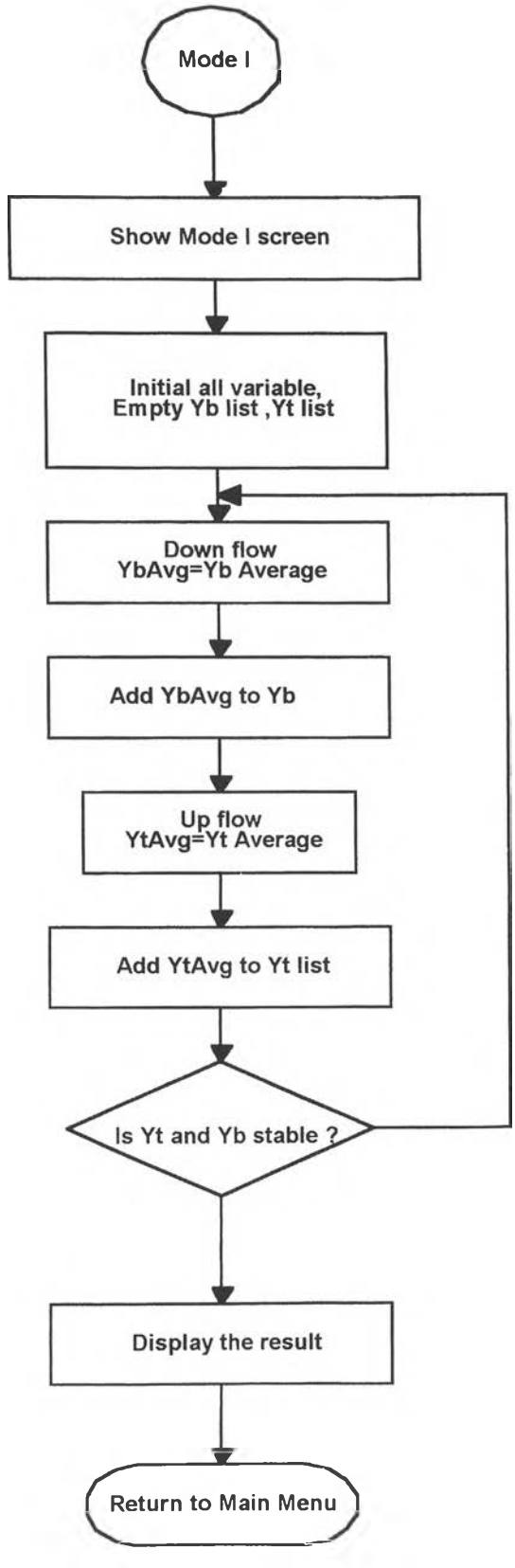
$$Py_j^{t-1} = Ay_j^t \qquad \text{.....3.17}$$

เมื่อสามารถเขียนสมการได้ดังแสดงข้างต้น ก็นำสมการที่เขียนได้ไปใช้กับการทดลองในรูปแบบการทดลองต่างได้ โดยการเปลี่ยนถังพักที่จุดเริ่มต้นกับถังพักที่จุดปลายของคอลัมน์เท่านั้น รูปแบบสมการทั้งหมดยังคงเหมือนเดิม เพราะในการทำงานของกระบวนการพีเอซ พาราเมตริกปั๊มปิง นั้นต้องทำการทดลองกลับไปกลับมาซ้ำๆกัน ดังนั้นเพื่อการง่ายต่อการคำนวณ ผู้วิจัยจึงได้เขียนโปรแกรมคอมพิวเตอร์ขึ้นเพื่อช่วยในการคำนวณ เพิ่มความสะดวกและรวดเร็วซึ่งจะเขียนขึ้นโดยใช้ภาษาปาสคาล ตามขั้นตอนต่อไปนี้

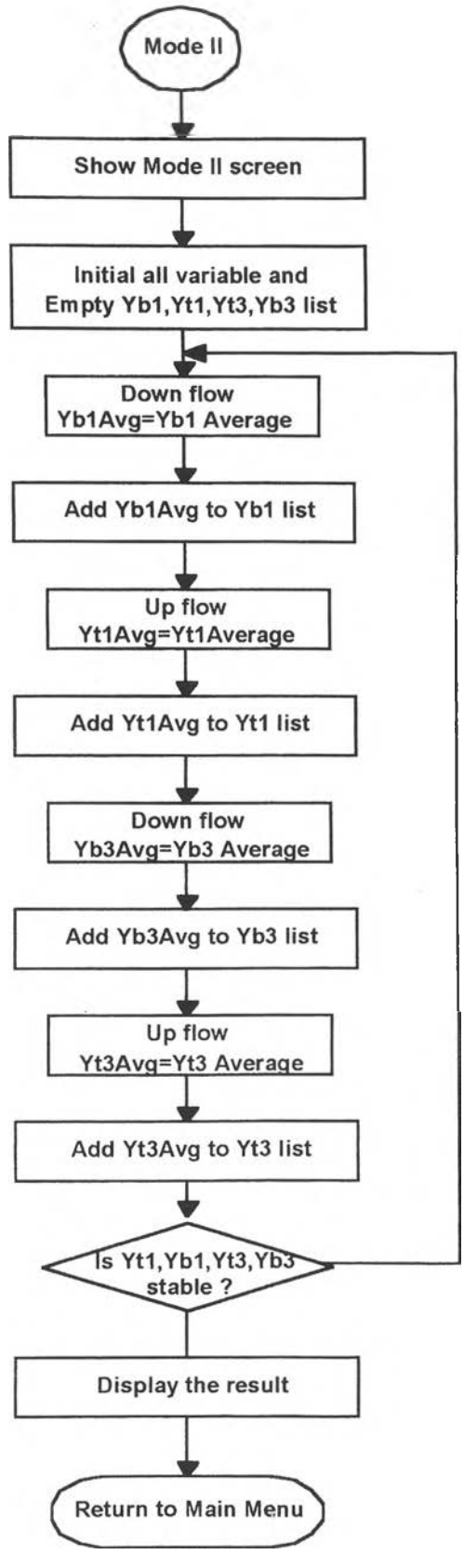


Flow chart for main menu (Main.pas)

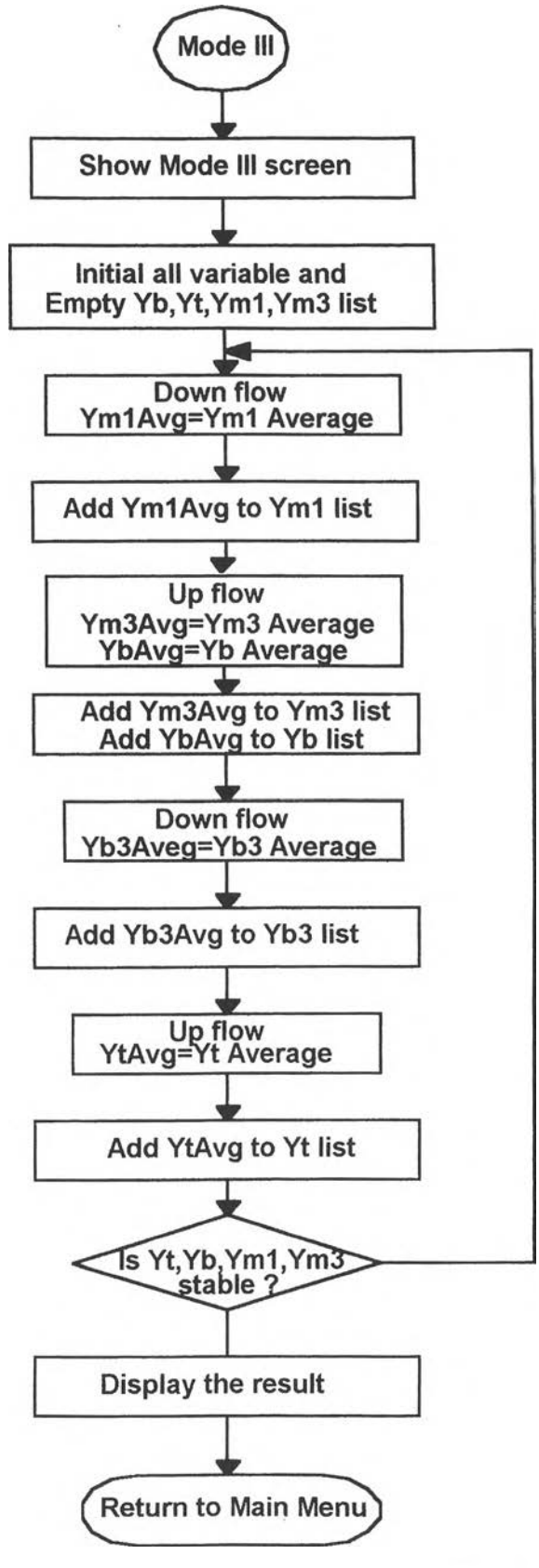
รูปที่ 3.2 แผนภาพแสดงวิธีการทำงานของโปรแกรมคำนวณหาค่าความเข้มข้น



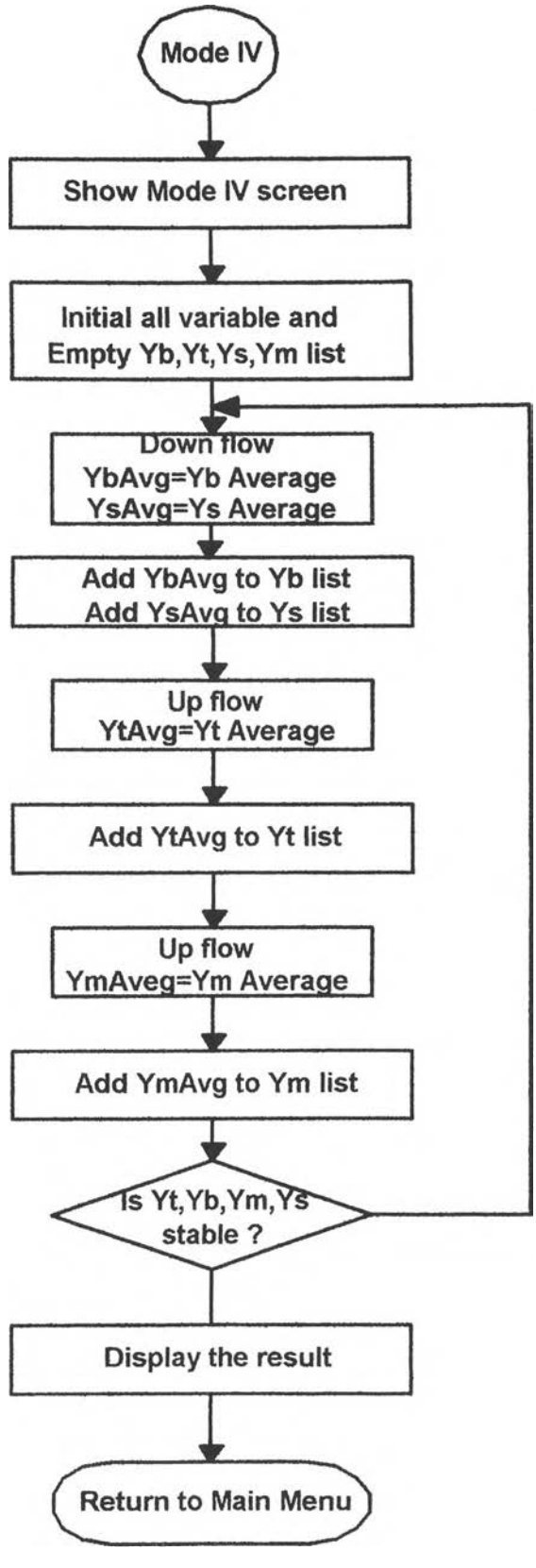
Flow chart for Mode I



Flow chart for Mode II



Flow chart for Mode III



Flow chart for Mode IV