บทที่ 2

ทฤษฎี

Chen และคณะ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการแยกฮีโมโกลบินและ อัลบูมิน โดยใช้พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิงแบบหนึ่งคอลัมน์ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าพาราปั๊มซึ่งใช้ค่าพีเอช เป็นแรงผลักดันสามารถให้ให้ผลในการแยกได้เป็นอย่างดี

Chen และคณะ ได้ศึกษาทั้งทางด้านทฤษฎีและการทดลอง เกี่ยวกับพีเอช พาราเมตริก แบบหลายคอลัมน์ สำหรับการแยกโปรตีน โดยมีการเปลี่ยนลักษณะการจัดวางชุดทดลองในลักษณะต่างๆ ข้อมูลจากการทดลองได้นำมาเปรียบเทียบกับผลที่ได้จากการคำนวณตามทฤษฎีการสมดุล ผลการทดลองจะนำมาวาดแผนภาพอย่างง่าย เพื่อแสดงการเกิดการแยกในแต่ละวงรอบ ความสามารถในการแยกของพาราปั๊มปิง แบบสองคอลัมน์ได้ถูกแสดงให้เห็นโดยการทดลองโดยใช้ระบบของฮีโมโกลบิน-อัลบูมิน-CM Sepharose-DEAE Sepharose ข้อมูลที่ได้สอดคล้องกับทฤษฎีเป็นอย่างดี

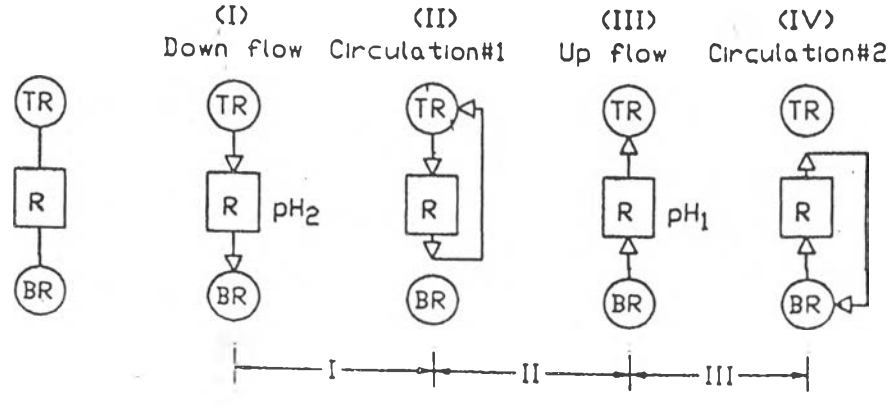
กระบวนการที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้ สามารถใช้ในการเลือกให้โปรตีนที่ต้องการเคลื่อนไปสู่ปลายข้างหนึ่งของคอลัมน์โครมาโตกราฟี ยิ่งไปกว่านั้น กระบวนการนี้ยังสามารถให้ประสิทธิภาพในการแยกสูง โดยไม่จำเป็นต้องล้างตัวแลกเปลี่ยนประจุ

2.1 ระบบหนึ่งคอลัมน์

โดยทั่วไปโปรตีนมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งประจุบวกและประจุลบ จึงสามารถถูกยึดไว้ได้ด้วยทั้งตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกหรือประจุลบ ค่าประจุสุทธิของโปรตีนจะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ที่พีเอชต่ำค่าประจุสุทธิจะเป็นบวก และโปรตีนจะถูกยึดไว้โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกในขณะที่เมื่อ ค่าพีเอชสูง โปรตีนจะมีประจุสิทธิเป็นลบ และจะถูกยึดไว้โดยตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ

ค่าพีเอช ที่ทำให้ประจุสุทธิเป็นศูนย์เรียกว่า "จุดไอโซอิเลคตริก" สมบัตินี้เองซึ่งเป็นพื้นฐานสำหรับกระบวนการแยกสารผสมโปรตีนโดยใช้พาราเมตริคปั๊มปิง เมื่อพิจารณาการแยกโปรตีน A ออกจากสารผสม โดยโปรตีนนี้มีจุดไอโซอิเล็คตริกที่ I_A และ $P_2<I_A<P_1$ ดังนั้น A จะมีประจุสุทธิเป็นลบที่พีเอช P_1 และจะมีประจุสุทธิเป็นบวกที่ พีเอช P_2 ทำให้โปรตีน A จะถูกยึดไว้ด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก R ที่จุด P_2 และจะถูกปล่อยออกที่จุด P_1 ดังนั้นพาราเมตริกปั๊มที่ทำการทดลองโดยใช้ค่าพีเอช P_1 และ P_2 จะสามารถแยกโปรตีน A ออกจากปลายข้างที่มีพีเอชต่ำของคอลัมน์ ไปสู่ปลายด้านที่มีค่าพีเอช สูง ปรากฏการณ์จะกลับกัน เมื่อเปลี่ยนตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก

ในระบบแรกที่ได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 ประกอบไปด้วยคอลัมน์ที่บรรจุไว้ด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุ และมีถังพักติดอยู่ที่ปลายทั้งสองข้างของคอลัมน์ โดยมีปริมาตรที่ถังบนและถังล่างเท่ากับ V_t และ V_b ตามลำดับ เริ่มแรกสารผสมจะถูกเติมลงในช่องว่างของคอลัมน์ และถังพักด้านบน โดยถังพักด้านบนจะถูกควบคุมค่าพีเอชที่ P_2 โดยเครื่องไตเตรตแบบอัตโนมัติ เครื่องไตเตรตอีกเครื่องหนึ่งจะใช้สำหรับควบคุมค่าพีเอช P_1 ที่ถังพักด้านล่าง ค่าความสามารถของบัฟเฟอร์ในสารละลายสำหรับถังพักด้านบนและด้านล่างมีค่าเป็น IS_2 และ IS_1 ตามลำดับ โดยการใช้ ฮอลโลไฟเบอร์ไดอะไลเซอร์



รูปที่ 2.1กระบวนการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิงแบบ1 คอลัมน์

ในหนึ่งวงรอบของระบบการทำงานจะประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.สารผสมที่มีค่าพีเอชต่ำ (P_2) จากถังพักด้านบนจะไหลเข้าสู่ปลายด้านบนของคอลัมน์ ในขณะที่สารผสมจะถูกขับออกจากปลายอีกข้างหนึ่งลงสู่ถังพักด้านล่าง ปริมาตรของสารผสมที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของลูกสูบ (Qt_I) จะถูกกำหนดให้พอดีกับปริมาตรของช่องว่างในคอลัมน์ (V_e)

2. สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน และคอลัมน์ เพื่อให้ ค่าพีเอช คงที่อยู่ที่ P_2 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้ ความเข้มข้นในถังพักด้านบนและคอลัมน์จะเท่ากัน

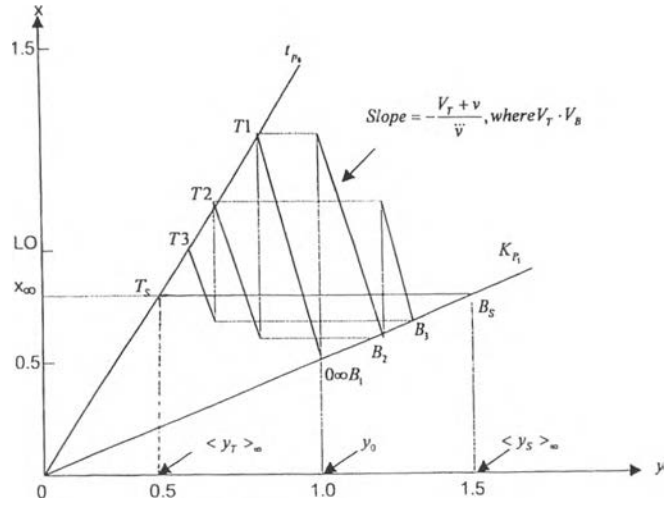
3. สารผสมที่มีค่าพีเอชสูง (P_1) จากถังพักด้านล่างจะไหลเข้าสู่ปลายด้านล่างของคอลัมน์ ในขณะที่สารผสมจะถูกขับออกจากปลายอีกข้างหนึ่งเข้าสู่ถังพักด้านบน ปริมาตรของสารผสมที่เกิดจากการเคลื่อนที่ของลูกสูบ (Qt_{III}) จะถูกกำหนดให้พอดีกับปริมาตรของช่องว่างในคอลัมน์ (V_e)

4. สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านล่าง และคอลัมน์ เพื่อให้ค่าพีเอช กลับมาคงที่อยู่ที่ P_1 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้ ความเข้มข้นในถังพักด้านล่างและคอลัมน์จะเท่ากัน

ในภาวะสมดุล ความเข้มข้นของโปรตีนในถังพัก กับความเข้มข้นบนตัวแลกเปลี่ยนประจุแสดงไว้ในสมการต่อไปนี้

$$X_\infty = k_{p1} \langle y_B \rangle_\infty = k_{p2} \langle y_T \rangle_\infty$$

จะสังเกตได้ว่าอัตราการไหลภายในคอลัมน์ จะเท่ากันกับอัตราการเคลื่อนที่ของลูกสูบในถังพัก (Q) ระยะเวลาที่ใช้ในการหมุนเวียนภายในคอลัมน์ t_{II} หรือ t_{IV} สามารถหาได้จากการทดลอง โดยจะขึ้นอยู่กับค่า V_e, V_b (หรือ V_I), และค่าพีเอชของทั้งคอลัมน์และถังพัก



รูปที่ 2.2 ผลการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอซ พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 1 คอลัมน์

ผลการทดลองได้ถูกแสดงไว้ในรูปที่ 2 ตามสมมุติฐานดังนี้

1. สมดุลระหว่างสารผสมและตัวแลกเปลี่ยนประจุในคอลัมน์เป็นฟังก์ชันเชิงเส้น ตามสมการ

$$x = ky$$

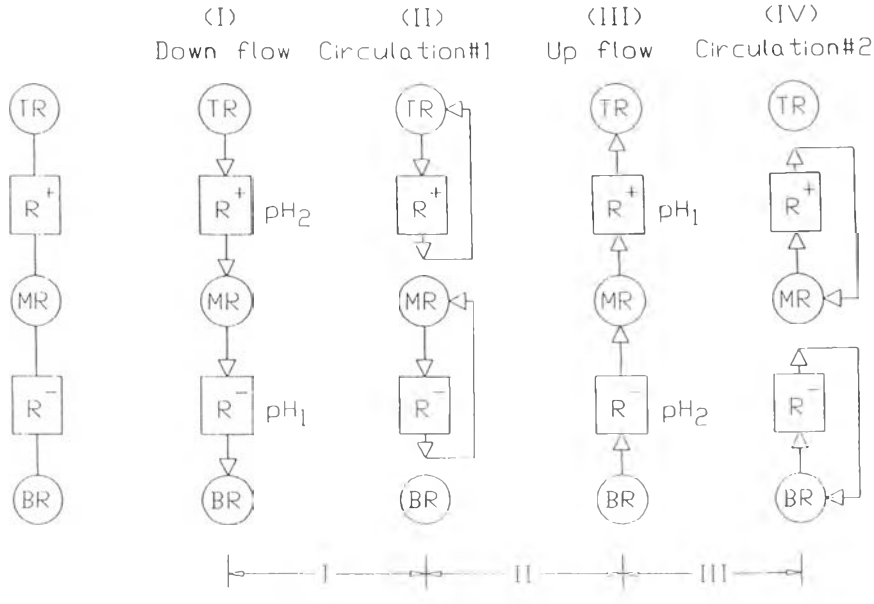
2. ระยะเวลาในการหมุนเวียน t_{II} หรือ t_{IV} เพียงพอที่จะทำให้เกิดการสมดุล เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนที่ 2 และ 4 ตามลำดับ

2.2 ระบบสองคอลัมน์

วิธีการทดลองแบบสองคอลัมน์ประกอบด้วยทั้งหมด 4 วิธี ได้แสดงไว้ในรูปที่ 3, 5, 7 และ 9 ในทุกๆ วิธี ประกอบด้วย 2 คอลัมน์ โดยในคอลัมน์หนึ่งจะบรรจุ ไว้ด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^-) และอีกคอลัมน์จะบรรจุไว้ด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^+) อัตราการไหลภายในคอลัมน์จะเท่ากับอัตราการเคลื่อนที่ของลูกสูบในถังพัก (Q) ทั้งด้านบนและด้านล่าง การทดลองนี้ จะเป็นการแยกสารผสมระหว่างโปรตีน A และ B ซึ่งมีจุดไอโซอิเล็กตริก เท่ากับ I_A และ I_B ตามลำดับ โดยที่ $P_3<I_B<P_2<I_A<P_1$ ซึ่ง P_1, P_2 และ P_3 คือค่าพีเอช ในแต่ละถังพัก ดังนั้น ทั้งโปรตีน A และโปรตีน B จะมีประจุเป็นลบที่ P_1 และมีประจุเป็นบวกที่ P_3 และเมื่อค่าพีเอชเป็น P_2 โปรตีน A จะมีประจุบวก ส่วนโปรตีน B จะมีประจุเป็นลบ เพราะฉะนั้นโปรตีน A จะถูกยึดไว้ด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกที่ P_2 หรือ P_3 และถูกปล่อยออกที่ P_1 ในขณะที่โปรตีน B จะถูกยึดไว้ด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกที่ P_3 และถูกปล่อยออกที่ P_2 หรือ P_1 ปรากฏการณ์จะกลับกัน เมื่อเปลี่ยนตัวแลกเปลี่ยนประจุเป็นตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ ความเข้มข้นในถังพักที่สภาวะสมดุล แสดงไว้ในรูปที่ 4, 6, 8 และ 10 เพื่อลดความซับซ้อนของการศึกษา จึงตั้งสมมุติฐานให้ $k_{p2}^- = k_{p3}^-$ และ $k_{p2}^+ = k_{p3}^+$ สำหรับโปรตีน A และ $k_{p1}^- = k_{p2}^-$ และ $k_{p1}^+ = k_{p2}^+$ สำหรับโปรตีน B วิธีการทดลองทั้ง 4 ได้ถูกอธิบายไว้ดังต่อไปนี้

2.2.1 รูปแบบการทดลองที่ 1

ระบบนี้ประกอบไปด้วยถังพักทั้งหมด 3 ถัง ดังแสดงไว้ในรูปที่ 3 ค่าพีเอชที่ถังพักด้านบนและล่างถูกควบคุมไว้ที่ P_1 และสำหรับถังพักตรงกลางถูกควบคุมไว้ที่ P_2 เริ่มแรกสารละลายความเข้มข้น y_0 จะถูกเติมเข้าสู่ถังพักด้านบน, ด้านล่าง, ตรงกลาง และคอลัมน์ทั้งสอง ซึ่งประกอบไปด้วยตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบตามลำดับ ในหนึ่งวงรอบของระบบการทำงานจะประกอบไปด้วยขั้นตอน 4 ขั้นตอนดังต่อไปนี้



รูปที่ 2.3 กระบวนการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่1

1.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านบน (*TR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+), ถังพักตรงกลาง (*MR*) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) ลงสู่ถังพักด้านล่าง (*BR*) เป็นเวลา t_I

2.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และระหว่าง ถังพักตรงกลาง กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ เป็นเวลา t_{II}

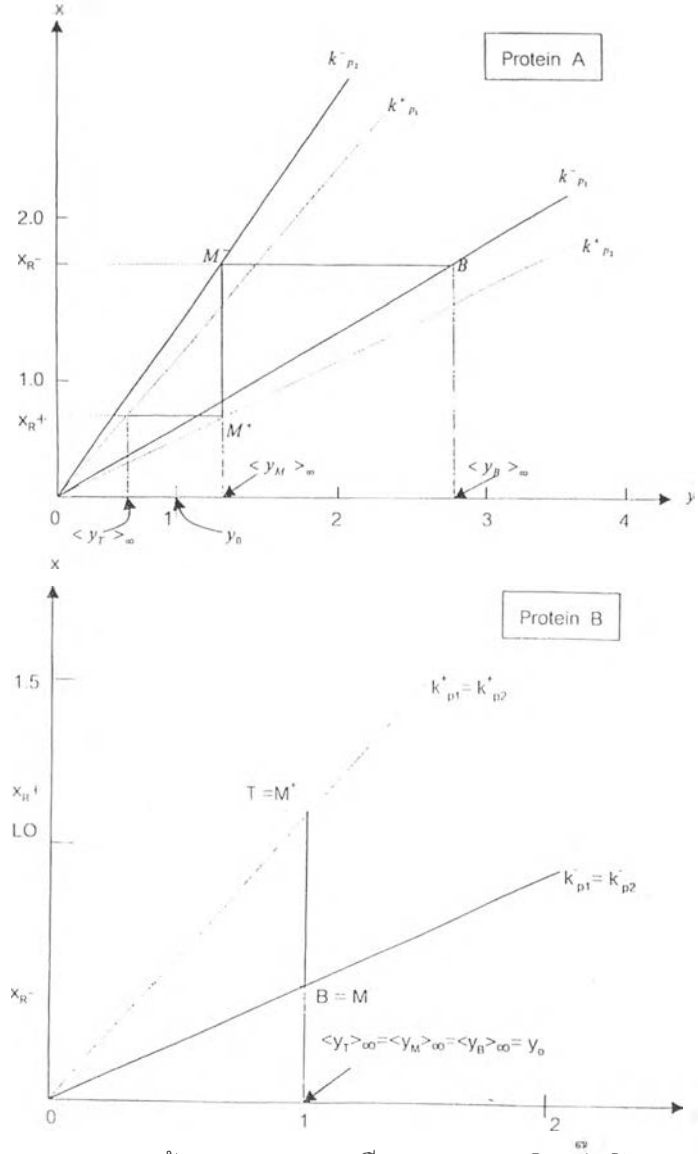
3.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านล่าง ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ ,ถังพักตรงกลาง และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก เข้าสู่ถังพักด้านบน เป็นเวลา t_{III}

4.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักตรงกลาง กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก และระหว่าง ถังพักด้านล่าง กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ

กราฟแสดงความเข้มข้น (รูปที่ 4) สามารถสร้างขึ้นได้ โดยใช้วิธีการสร้างกราฟเหมือนกับแบบหนึ่งคอลัมน์ หลังจากผ่านขั้นตอนทั้ง 4 เป็นจำนวนหลายๆ รอบ โปรตีน A บนตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ จะมีความเข้มข้นเข้าสู่ค่า X_{R+} และ X_{R-} ตามลำดับ กราฟที่ได้จะมีลักษณะเป็นรูปขั้นบันได 2 ขั้น ดังแสดงไว้ในรูปที่ 4 ในภาวะสมดุล ความเข้มข้นของโปรตีนในถังพักตรงกลางจะอยู่ในสภาพสมดุลกับความเข้มข้นบนตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบที่ P_2 ดังแสดงไว้ในสมการต่อไปนี้

$$X_{R+} = k^{+}_{p1} \langle y_T \rangle_\infty = k^{+}_{p2} \langle y_M \rangle_\infty$$

และ $$X_{R-} = k^{-}_{p1} \langle y_B \rangle_\infty = k^{-}_{p2} \langle y_M \rangle_\infty$$

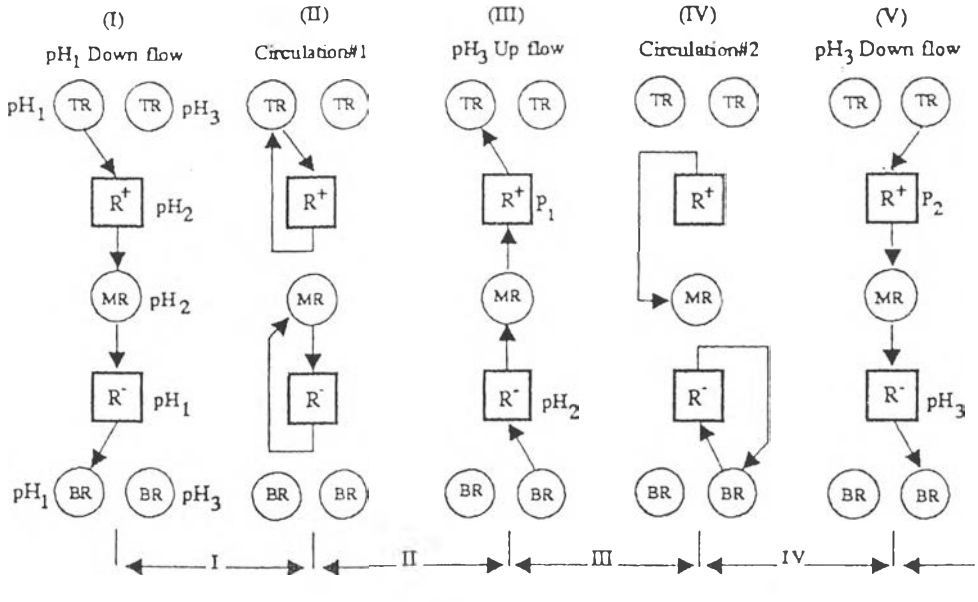


รูปที่ 2.4 ผลการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่1

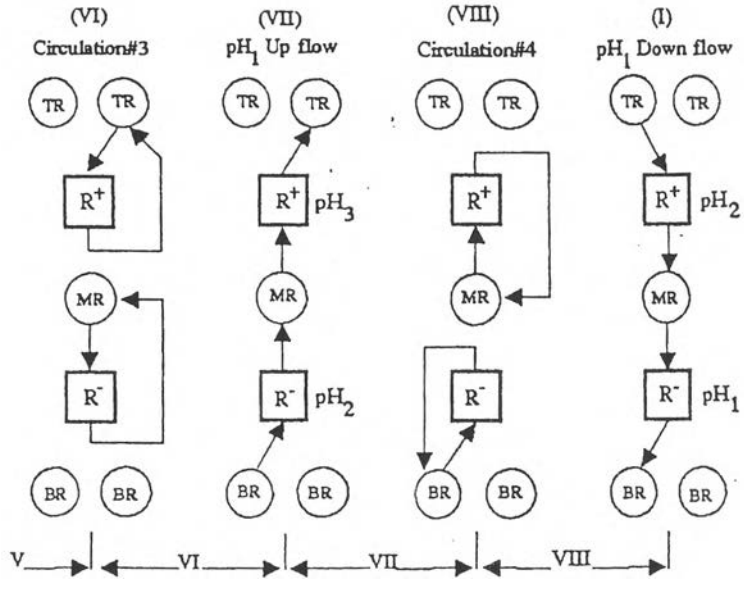
ในคอลัมน์ที่บรรจุ ตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก โปรตีน A จะเคลื่อนที่จากปลายที่มีพีเอชสูง (P_1) ไปสู่ปลายด้านที่มีพีเอชต่ำ (P_2) ในขณะที่ในคอลัมน์ที่บรรจุประจุลบ จะมีทิศทางการเคลื่อนที่ของโปรตีน A ในทางตรงกันข้าม ดังนั้นโปรตีน A จะถูกสะสมอยู่ที่ปลายด้านที่มีพีเอชสูงของคอลัมน์ที่บรรจุประจุลบ โดยการเปรียบเทียบกราฟในรูปที่ 2 และ 4 จะพบว่าความสามารถในแยก [$<y_B>_\infty$ / $<y_T>_\infty$] สำหรับระบบสองคอลัมน์มีประสิทธิภาพดีกว่าระบบหนึ่งคอลัมน์ รูปที่ 4 ด้านล่าง แสดงให้เห็นว่าโปรตีน Bไม่ได้ถูกแยกออก ดังนั้น [$<y_B>_\infty$ / $<y_T>_\infty$] = 1 เป็นที่น่าสังเกตว่าแม้โปรตีน B จะมีประจุสุทธิเหมือนกันที่จุด P_1 และ P_2 แต่อาจมีค่าคงที่สมดุลต่างกัน ทำให้อาจเกิดการแยกของโปรตีน B เกิดขึ้นได้วิธีนี้ใช้ได้สำหรับปัญหาเกี่ยวกับเอ็นริชเม็นท์เท่านั้น จุดประสงค์ก็คือต้องการจะได้ผลิตภัณฑ์ ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นของสารที่เติมลงไป

2.2.2 <u>รูปแบบการทดลองที่ 2</u>

ในระบบนี้จะใช้ถังพักจำนวน 5 ถัง ประกอบด้วย ถังพักด้านบน 2 ถัง ถังพักตรงกลาง 1 ถัง และถังพักด้านล่าง 2 ถัง โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ P_1, P_3, P_2, P_1 และ P_3 ตามลำดับ (รูปที่ 2.5)



รูปที่ 2.5 กระบวนการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่2



รูปที่ 2.5 กระบวนการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่2 (ต่อ)

ในหนึ่งวงรอบของระบบการทำงานจะประกอบไปด้วยขั้นตอน 8 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านบน ($TR{:}P_1$) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+), ถังพักตรงกลาง (*MR*) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) ลงสู่ถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_1$) เป็นเวลา t_I
2. สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน ($TR{:}P_1$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักตรงกลาง (*MR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{II}

3.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_3$) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-), ถังพักตรงกลาง (MR) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) เข้าสู่ถังพักด้านบน ($TR{:}P_1$) เป็นเวลา t_{III}

4.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักตรงกลาง (MR) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_3$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{IV}

5.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านบน ($TR{:}P_3$) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+), ถังพักตรงกลาง (MR) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) ลงสู่ถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_3$) เป็นเวลา t_V

6.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน ($TR{:}P_3$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักตรงกลาง (MR) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{VI}

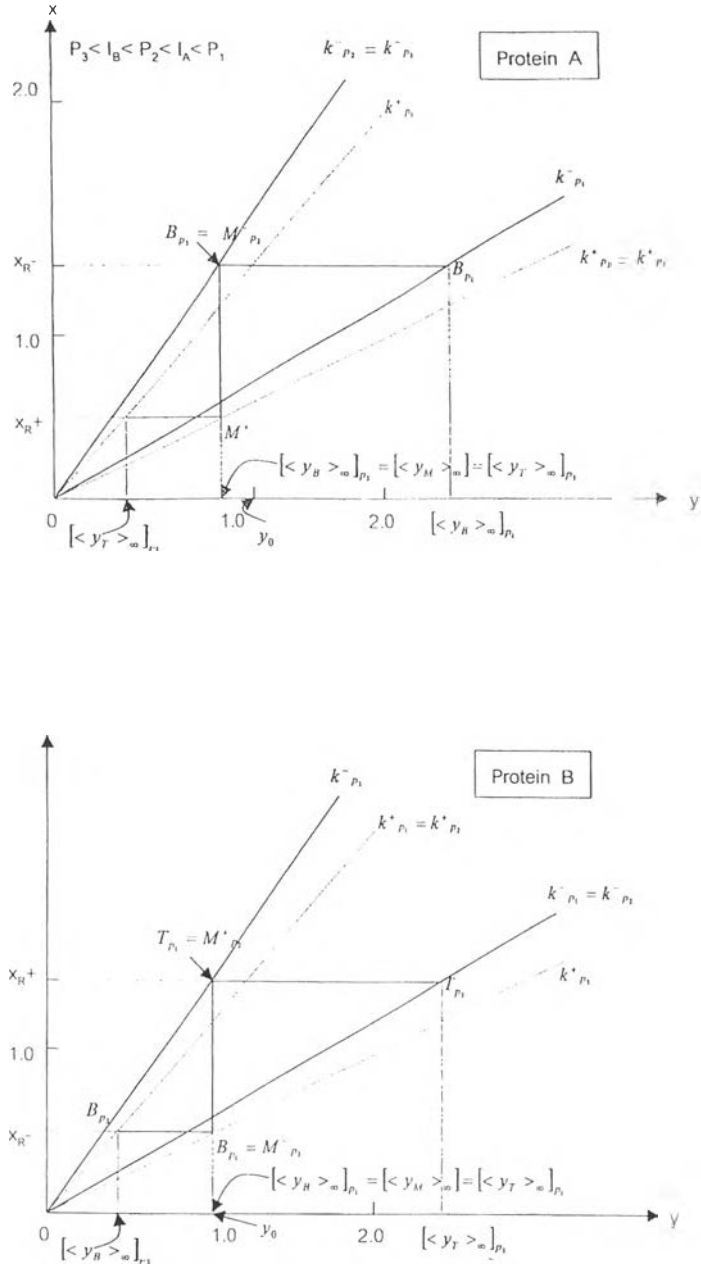
7.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_1$) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-), ถังพักตรงกลาง (MR) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) เข้าสู่ถังพักด้านบน ($TR{:}P_3$) เป็นเวลา t_{VII}

8.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักตรงกลาง (MR) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_1$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{VIII}

ความเข้มข้นของโปรตีนในถังพักที่ภาวะสมดุล ($n \rightarrow \infty$) ได้แสดงไว้ในรูปที่ 2.6

$$X_{R+} = k^{+}_{p1}\,[\langle y_T \rangle_\infty]_{P1} = k^{+}_{p3}[\langle y_T \rangle_\infty]_{P3} = k^{+}_{p2}\,[\langle y_M \rangle_\infty]$$

และ $$X_{R-} = k^{-}_{p1}\,[\langle y_B \rangle_\infty]_{P1} = k^{-}_{p3}[\langle y_B \rangle_\infty]_{P3} = k^{-}_{p2}\,[\langle y_M \rangle_\infty]$$

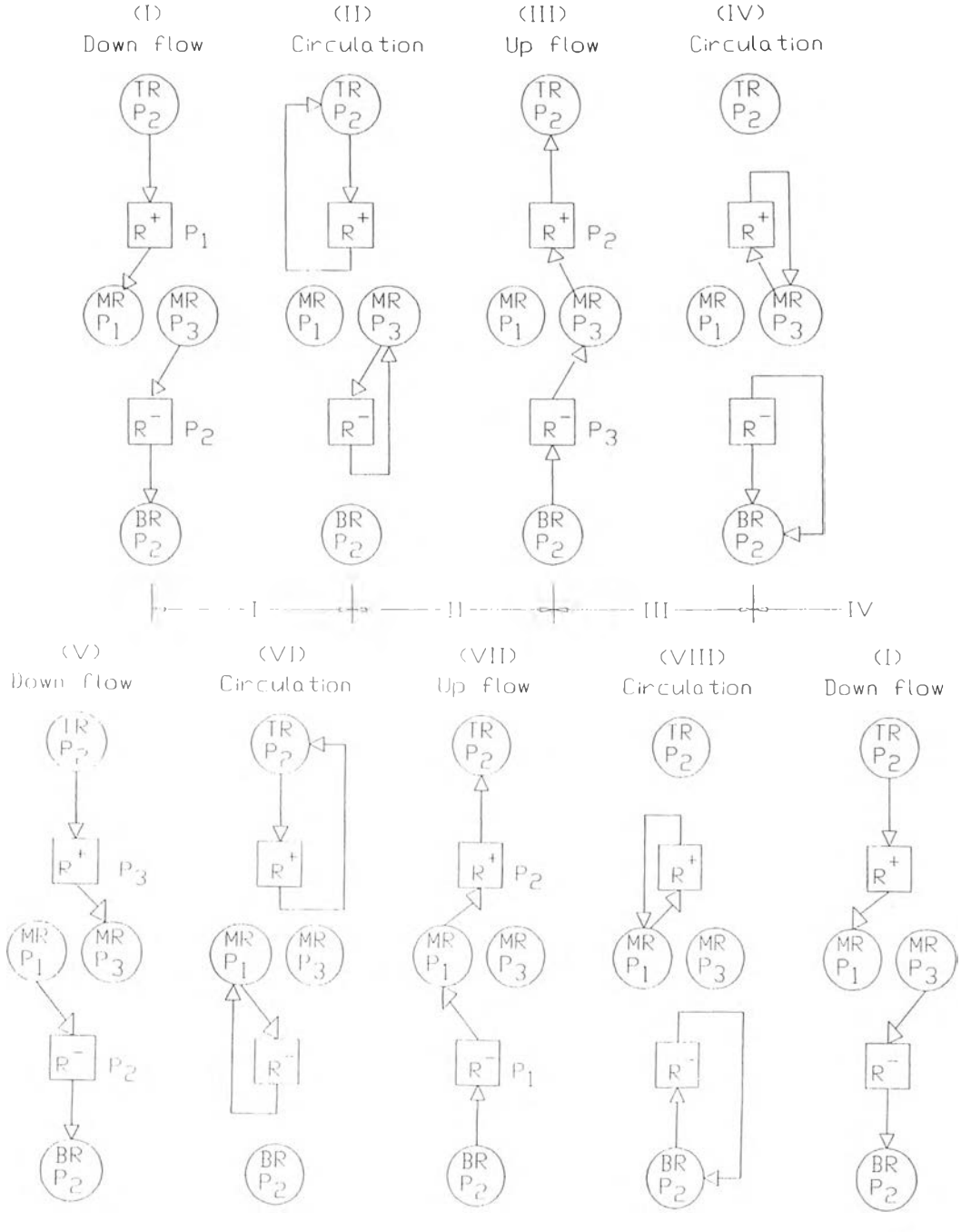


รูปที่ 2.6 ผลการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่2

โดยการเชื่อมจุด T_{P1}, T_{P3}, M^{+}_{P2}, M^{-}_{P2}, B_{P3} และ B_{P1} จะได้แผนภาพรูปขั้นบันไดสองขั้น ทั้งโปรตีน A และ B อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของโปรตีน A ที่ถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_1$) $[\langle y_B \rangle_{\infty}]_{P1}$ จะสูงกว่าความเข้มข้นของโปรตีน A ที่ถังพักด้านบน ($TR{:}P_1$) $[\langle y_T \rangle_{\infty}]_{P1}$ มาก ในขณะที่ความเข้มข้นของโปรตีน B ในถังพักด้านบน ($TR{:}P_3$) $[\langle y_T \rangle_{\infty}]_{P3}$ จะสูงกว่าความเข้มของโปรตีน B ที่ถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_3$) $[\langle y_B \rangle_{\infty}]_{P3}$ ปรากฏการณ์การแยก สามารถอธิบายได้ ดังนี้ คือที่ระดับพีเอช P_1 กับ P_2 และ P_2 กับ P_3 ช่วงระหว่างจุดไอโซอิเล็กตริคของโปรตีน A และ B คือ $P_2<I_A<P_1$ และ $P_3<I_B<P_2$ ตามลำดับ ในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) โปรตีน A จะเคลื่อนที่ไปยังถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_1$) และโปรตีน B จะเคลื่อนที่ไปยังถังพักตรงกลาง (MR) ในขณะที่ในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) โปรตีน A จะเคลื่อนที่ไปยังถังพักตรงกลาง (MR) และโปรตีน B จะเคลื่อนที่ไปยังถังพักด้านบน ($TR{:}P_3$) หรืออาจอธิบายได้ว่า โปรตีน A และ B เคลื่อนที่สวนทางกันระหว่างถังพักด้านล่าง ($BR{:}P_1$) กับถังพักด้านบน($TR{:}P_3$)

2.2.3 <u>รูปแบบการทดลองที่ 3</u>

ในระบบนี้จะใช้ถังพักจำนวน 4 ถัง ประกอบด้วย ถังพักด้านบน 1 ถัง ถังพักตรงกลาง 2 ถัง และถังพักด้านล่าง 1 ถัง โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ P_2, P_1, P_3 และ P_2 ตามลำดับ (รูปที่ 2.7)



รูปที่ 2.7 กระบวนการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่3

ในหนึ่งวงรอบของระบบการทำงานจะประกอบไปด้วยขั้นตอน 8 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านบน (*TR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+), ถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_1$) และในเวลาเดียวกันจากถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_3$) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) ลงสู่ถังพักด้านล่าง (*BR*) เป็นเวลา t_I

2.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน (*TR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_3$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{II}

3.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านล่าง (*BR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-), ถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_3$) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) เข้าสู่ถังพักด้านบน (*TR*) เป็นเวลา t_{III}

4.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_3$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักด้านล่าง (*BR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{IV}

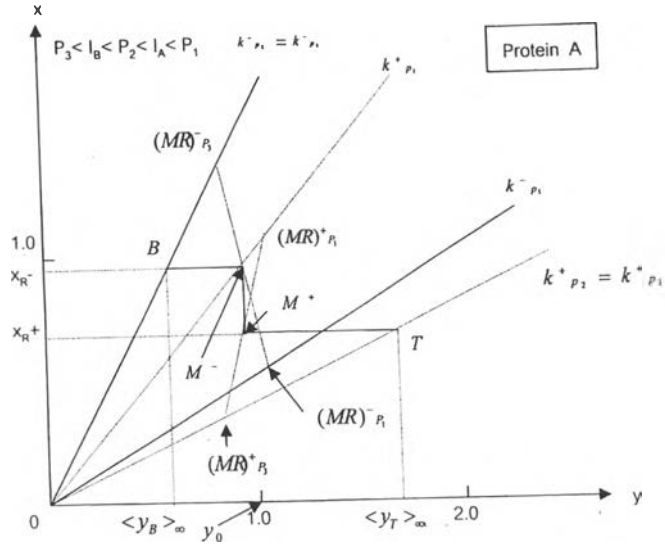
5.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านบน (*TR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+), ถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_3$) และในเวลาเดียวกันจากถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_1$) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) ลงสู่ถังพักด้านล่าง (*BR*) เป็นเวลา t_V

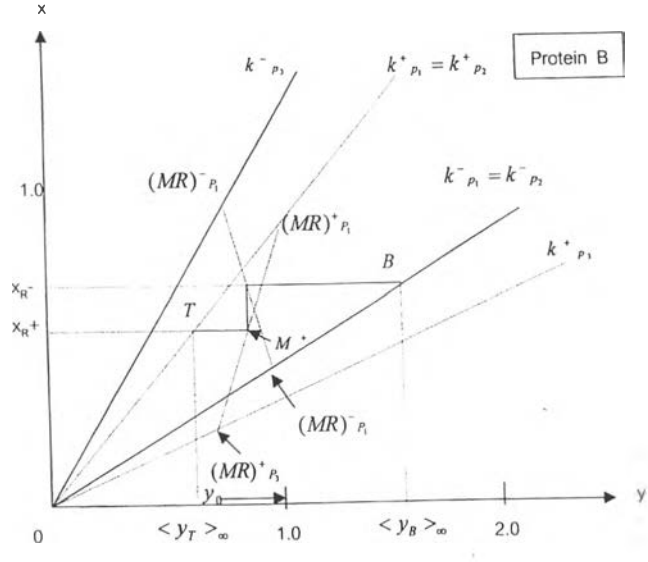
6.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน (*TR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_1$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{VI}

7.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านล่าง (*BR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-), ถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_1$) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) เข้าสู่ถังพักด้านบน (*TR*) เป็นเวลา t_{VII}

8.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักตรงกลาง ($MR{:}P_1$) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักด้านล่าง (*BR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{VIII}

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย





รูปที่ 2.8 ผลการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่3

รูปที่ 2.8 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนในถังพักที่ภาวะสมดุล ซึ่งมีความเข้มข้นเฉลี่ยของถังพักตรงกลาง [$MR{:}P_1$ และ $MR{:}P_3$] อยู่ในสภาพสมดุล กับความเข้มข้นบนตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ ดังแสดงไว้ในสมการต่อไปนี้

$$X_{R+} = k^{+}_{p2} \langle y_T \rangle_\infty = k^{+} \langle y_{M+} \rangle_\infty$$

$$X_{R-} = k_{p2} \langle y_B \rangle_\infty = k^{-} \langle y_{M-} \rangle_\infty$$

และ $\langle y_{M+} \rangle_\infty = 0.5(y_{MR\,p1+} + y_{MR\,p3+})$ = $\langle y_{M-} \rangle_\infty = 0.5(y_{MR\,p1-} + y_{MR\,p3-})$

โดยที่ $y_{MR\,p1+}$ และ $y_{MR\,p3+}$ คือ ค่าความเข้มข้นของสารผสม ที่ภาวะสมดุล ระหว่างคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) กับถังพักตรงกลาง $MR{:}P_1$และ $MR{:}P_3$

$y_{MR\,p1-}$ และ $y_{MR\,p3-}$ คือ ค่าความเข้มข้นของสารผสมที่ภาวะสมดุล ระหว่างคอลัมน์ที่บรรจุ ตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) กับถังพักตรงกลาง $MR{:}P_1$ และ $MR{:}P_3$

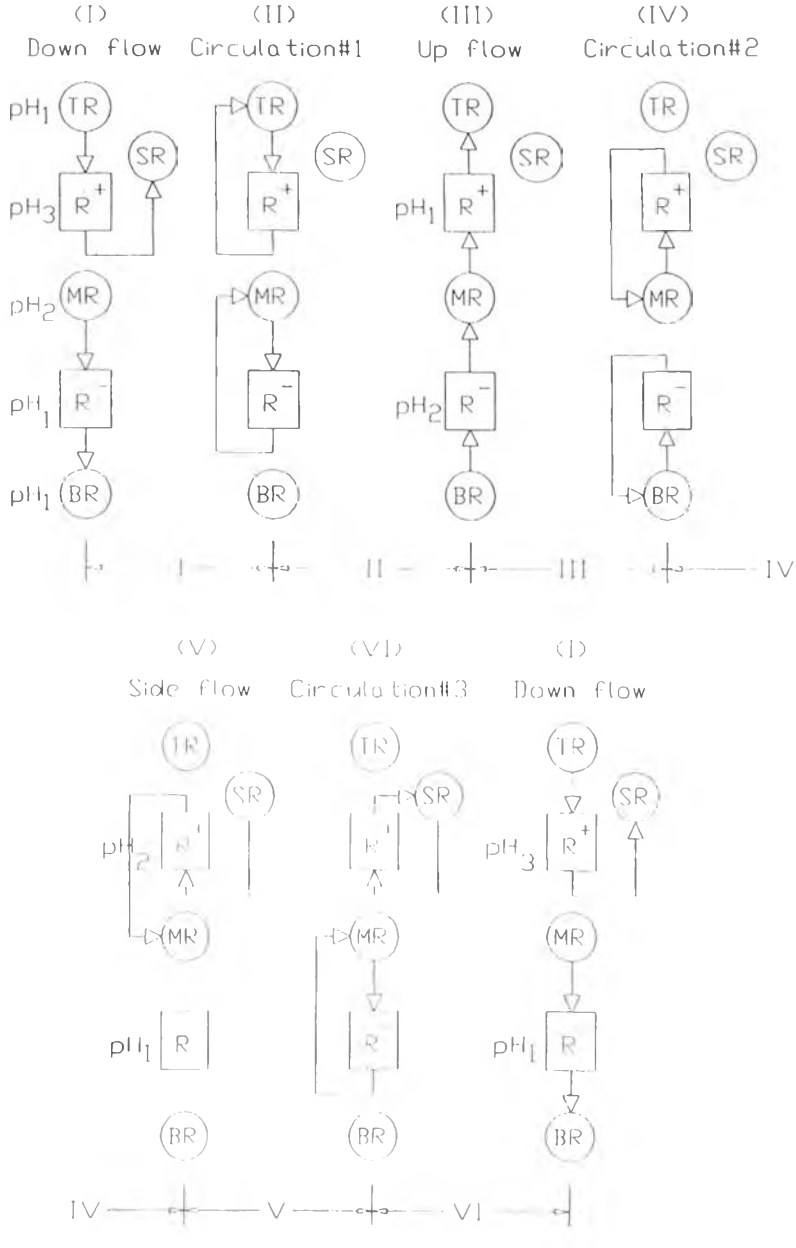
ผลที่แสดงในรูปที่ 8 คล้ายคลึงกับที่ได้จากการทดลองในวิธีที่ 2 คือ โปรตีน A และ B จะเคลื่อนที่สวนทางกัน แต่ในกรณีนี้โปรตีน A จะเคลื่อนที่ขึ้นไปสู่ถังพักด้านบน ที่พีเอช เท่ากับ P_2 ในขณะที่โปรตีน B เคลื่อนที่ลงไปสู่ถังพักด้านล่าง (BR) ที่พีเอชเท่ากับ P_2 และจากการเปรียบเทียบระหว่างรูปที่ 6 กับรูปที่ 8 แสดงให้เห็นอย่างเด่นชัดว่าวิธีการที่ 2 มีประสิทธิภาพที่ดีกว่าวิธีการที่ 3 กล่าวคือ

สำหรับโปรตีน A $$\left\{\frac{[\langle y_B \rangle_\infty]_{P_1}}{[\langle y_T \rangle_\infty]_{P_1}}\right\}_{\text{Mode 2}} > \left[\frac{\langle y_T \rangle_\infty}{\langle y_B \rangle_\infty}\right]_{\text{Mode 3}}$$

สำหรับโปรตีน B $$\left\{\frac{[\langle y_T \rangle_\infty]_{P_3}}{[\langle y_B \rangle_\infty]_{P_3}}\right\}_{\text{Mode 2}} > \left[\frac{\langle y_B \rangle_\infty}{\langle y_T \rangle_\infty}\right]_{\text{Mode 3}}$$

2.2.4 รูปแบบการทดลองที่ 4

ในระบบนี้จะใช้ถังพักจำนวน 4 ถัง ประกอบด้วย ถังพักด้านบน 1 ถัง ถังพักตรงกลาง 1 ถัง ถังพักด้านข้าง 1 ถัง และถังพักด้านล่าง 1 ถัง โดยมีค่าพีเอชเท่ากับ P_1, P_2, P_3 และ P_1 ตามลำดับ (รูปที่ 2.9)



รูปที่ 2.9 กระบวนการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่4

ในหนึ่งวงรอบของระบบการทำงานจะประกอบไปด้วยขั้นตอน 6 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านบน (*TR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+), ถังพักด้านข้าง (*SR*) และในเวลาเดียวกันจากถังพักตรงกลาง (*MR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) ลงสู่ถังพักด้านล่าง (*BR*) เป็นเวลา t_I

2.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านบน (*TR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักตรงกลาง (*MR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{II}

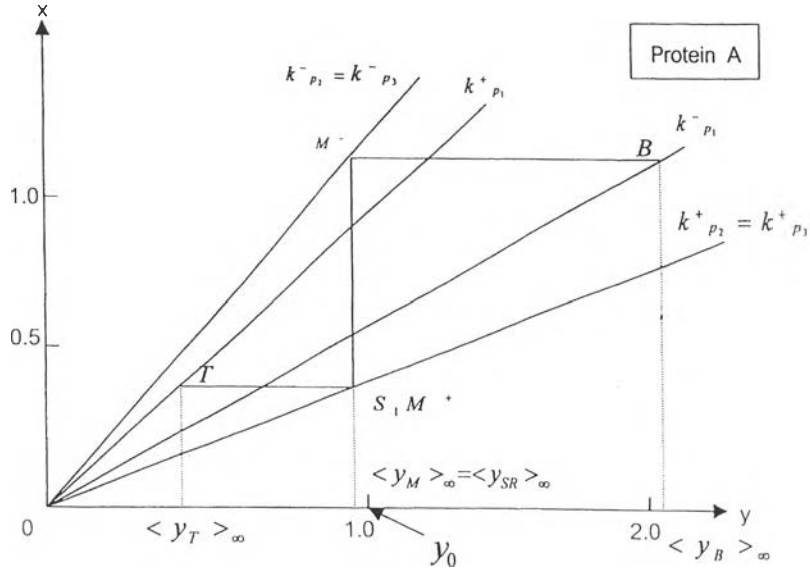
3.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านล่าง (*BR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-), ถังพักตรงกลาง (*MR*) และคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) เข้าสู่ถังพักด้านบน (*TR*) เป็นเวลา t_{III}

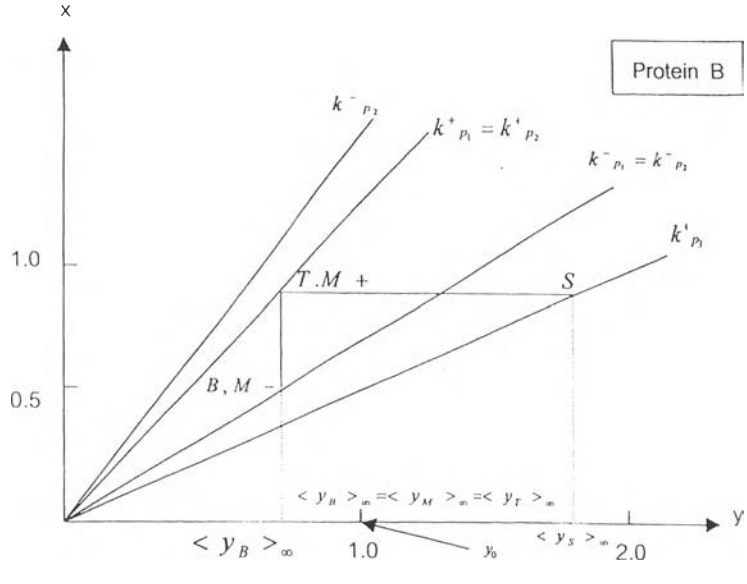
4.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักตรงกลาง (*MR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) และระหว่าง ถังพักด้านล่าง (*BR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) เป็นเวลา t_{IV}

5.ปั๊มสารผสมจากถังพักด้านข้าง (*SR*) ผ่านคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) ไปสู่ถังพักตรงกลาง (*MR*) เป็นเวลา t_V

6.สารผสมจะถูกทำให้เกิดการหมุนเวียนภายในถังพักด้านข้าง (*SR*) กับคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวก (R^+) เป็นเวลา t_{VI}

รูปที่ 2.10 แสดงความเข้มข้นของโปรตีนในถังพักที่ภาวะสมดุล โปรตีน A และ B จะสะสมอยู่ที่ถังพักด้านล่าง (*BR*) และถังพักด้านข้าง (*SR*) ตามลำดับ จะสังเกตุได้ว่า ในวิธีการนี้โปรตีน B จะไม่ถูกแยกในคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุลบ (R^-) จึงทำให้กราฟที่ได้ปรากฏเป็นขั้นบันไดเพียงขั้นเดียว

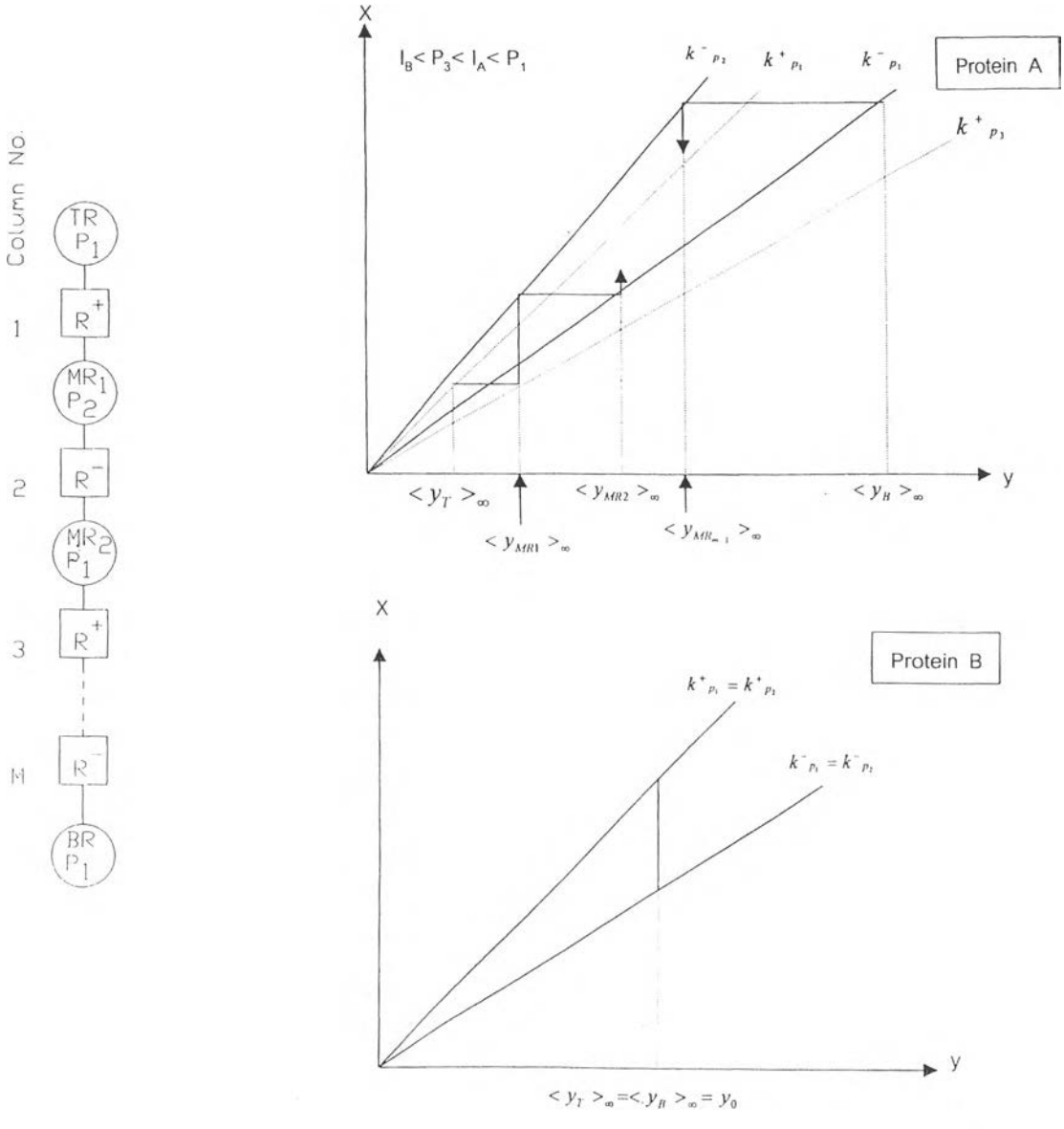




รูปที่ 2.10 ผลการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง แบบ 2 คอลัมน์ รูปแบบที่4

2.3 ระบบหลายคอลัมน์

ระบบสองคอลัมน์ตามแบบวิธีที่ 1 สามารถดัดแปลงให้เป็นระบบหลายคอลัมน์ได้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 11 ซึ่งประกอบไปด้วยชุดของคอลัมน์ทั้งหมด *M* คอลัมน์ โดยที่ *M* เป็นจำนวนคู่ โดยวางตำแหน่งของคอลัมน์ที่บรรจุตัวแลกเปลี่ยนประจุบวกและลบ สลับกัน ผลการทดลองสามารถแสดงได้ในรูปของกราฟ เช่นเดียวกับระบบหนึ่ง และสองคอลัมน์ที่ผ่านมา



รูปที่ 2.11 กระบวนการและ ผลการแยกสารผสม ด้วยกระบวนการ พีเอช พาราเมตริก ปั๊มปิง ระบบหลายคอลัมน์

ในระบบนี้ เป็นการนำระบบสองคอลัมน์ตามแบบวิธีที่ 1 มาทำให้ใช้ได้โดยทั่วไป ค่าพีเอช สำหรับถังพักบนและล่างจะถูกควบคุมไว้ที่ P_1 ส่วนค่าพีเอชสำหรับถังพักกลาง MR_1, MR_2, ..., MR_{M-1} จะถูกควบคุมไว้ที่ P_2, P_1, P_2, P_1, ..., P_2 ตามลำดับ สำหรับโปรตีน A ผลการทดลองที่ได้สามารถแสดงได้ในรูปของกราฟขั้นบันได M ขั้น และประสิทธิภาพในการแยกจะสูงขึ้น ($<y_B>\infty$ /$<y_T>\infty$) เมื่อจำนวนคอลัมน์เพิ่มขึ้น สรุปได้ว่า เมื่อให้ระบบพาราปั๊ม ทำงานที่ค่าพีเอช P_1 และ P_2 โดยที่ $P_2<I_A<P_1$ จะสามารถแยกเอาโปรตีน A จากถังพักด้านบน มาสะสมอยู่ในถังพักด้านล่าง โดยที่โปรตีน B จะไม่ถูกแยกด้วยวิธีการนี้