



รายงานผลโครงการวิจัย

การศึกษาผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีน
ที่มีต่อกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้ สำหรับการประยุกต์ใช้
ในการพัฒนาวัสดุชีวภาพทางการแพทย์

Size- and Concentration- Dependence on Reversible Process of
Protein Adsorption for Biomaterial Application

โดย

ดร.นริศร์ บาลทิพย์

สาขาวิชาฟิสิกส์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
(เงินงบประมาณประจำปี 2554 หมวดเงินอุดหนุน)

บทคัดย่อ

การทดสอบหาปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับบริเวณพื้นผิววัสดุตัวอย่างจากสารละลายโปรตีน 5 ชนิด (Human Serum Albumin, IgG, Fibrinogen, Lysozyme, Alpha-Macglobulin) ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน หลังจากการชะล้างพบว่า ความเข้มข้นของโปรตีนมีผลต่อปริมาณ Bound Protein บนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง โดยมีความสัมพันธ์แบบเชิงเส้นในช่วงแรกและค่อยๆ คงที่ในช่วงถัดมา และพบว่าขนาดของโปรตีนไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นต่อปริมาณ Bound Protein บนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง แต่สามารถนำผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า Fibrinogen มีปฏิสัมพันธ์ในการดูดซับบริเวณพื้นผิววัสดุสูงที่สุดเมื่อเทียบกับโปรตีนชนิดอื่น โดย Alpha Macglobulin มีปฏิสัมพันธ์ในการดูดซับต่ำที่สุด และจากการวิจัยยังพบเพิ่มเติมว่ากระบวนการดูดซับของโปรตีนเป็นแบบผันกลับได้ (reversible process) และมีการจัดเรียงตัวของโมเลกุลของโปรตีนบนพื้นผิววัสดุทั้งแบบชั้นเดียว (monolayer) และหลายชั้น (multilayer)

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	ข
สารบัญรูป	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญกราฟ	ฉ
1. บทนำ	
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย	4
1.5 สมมติฐานของโครงการวิจัย	4
2. ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การดูดซับ/การคายการดูดซับ	6
2.2 การทดสอบการหาปริมาณโมเลกุลที่ถูกดูดซับจากค่าผลต่างของความเข้มข้นของสารละลายก่อนและหลังจากมีการดูดซับ	7
2.3 การดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ และรูปแบบการดูดซับแบบชั้นเดียวและหลายชั้น	7
2.4 ต้นแบบของพื้นผิวที่มีต่อการพิจารณาการดูดซับของโปรตีน	8
3. วิธีดำเนินการวิจัย	10
4. ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	16
5. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปและอภิปรายผล	60
5.2 ข้อเสนอแนะ	61
เอกสารอ้างอิง	62
เอกสารแนบการเผยแพร่ผลงาน	65

สารบัญรูป

รูป

หน้า

รูปที่ 1 Gibb's Dividing Surface

8

รูปที่ 2 The Surface Phase

9

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (HSA) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง	16
ตารางที่ 2 แสดงการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายโปรตีน HSA กับ OS	18
ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (IgG) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง	20
ตารางที่ 4 แสดงการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายโปรตีน IgG กับ OS	22
ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (Fib) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง	24
ตารางที่ 6 แสดงการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายโปรตีน Fib กับ OS	26
ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (Lys) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง	28
ตารางที่ 8 แสดงการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ ของสารละลายโปรตีน Lys กับ OS	30
ตารางที่ 9 แสดงค่าความเข้มข้นอิมิตัวของโปรตีนแต่ละชนิด	31

สารบัญกราฟ

กราฟ	หน้า
กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน HSA	17
กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (HSA) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน	19
กราฟที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน IgG	21
กราฟที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (IgG) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน	23
กราฟที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Fib	25
กราฟที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Fib) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน	27
กราฟที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Lys	29
กราฟที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Lys) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน	31
กราฟที่ 9 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml	32
กราฟที่ 10 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.1 mg/ml	33

สารบัญกราฟ

กราฟ	หน้า
กราฟที่ 11 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.9 mg/ml	33
กราฟที่ 12 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87 mg/ml	34
กราฟที่ 13 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml	34
กราฟที่ 14 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml	35
กราฟที่ 15 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ HSA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)	36
กราฟที่ 16 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml	37

สารบัญกราฟ

กราฟ

หน้า

- กราฟที่ 17 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.1 mg/ml 37
- กราฟที่ 18 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.9 mg/ml 38
- กราฟที่ 19 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87 mg/ml 38
- กราฟที่ 20 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml 39
- กราฟที่ 21 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml 40
- กราฟที่ 22 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ IgG ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml) 41

สารบัญกราฟ

กราฟ

หน้า

- กราฟที่ 29 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ Fib ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml) 45
- กราฟที่ 30 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml 46
- กราฟที่ 31 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.1 mg/ml 46
- กราฟที่ 32 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.9 mg/ml 47
- กราฟที่ 33 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87 mg/ml 47
- กราฟที่ 34 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml 48

สารบัญกราฟ

กราฟ

หน้า

- กราฟที่ 35 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml 48
- กราฟที่ 36 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ Lys ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml) 49
- กราฟที่ 37 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml 50
- กราฟที่ 38 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.1 mg/ml 50
- กราฟที่ 39 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.9 mg/ml 51
- กราฟที่ 40 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87 mg/ml 51

สารบัญกราฟ

กราฟ	หน้า
กราฟที่ 41 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml	52
กราฟที่ 42 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่2) ครั้งที่2 (แท่งที่3) และครั้งที่3 (แท่งที่4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml	52
กราฟที่ 43 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ α -mac ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)	53
กราฟที่ 44 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ HSA	54
กราฟที่ 45 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ IgG	54
กราฟที่ 46 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ Fib	55
กราฟที่ 47 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ Lys	55
กราฟที่ 48 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของ α -mac	56
กราฟที่ 49 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนแต่ละชนิด	56

สารบัญกราฟ

กราฟ	หน้า
กราฟที่ 50 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml	57
กราฟที่ 51 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 8.1 mg/ml	57
กราฟที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.9 mg/ml	58
กราฟที่ 53 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 3.87 mg/ml	58
กราฟที่ 54 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.06 mg/ml	59
กราฟที่ 55 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.98 mg/ml	59

บทที่ 1 บทนำ

ในบทนี้จะกล่าวถึงที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย วัตถุประสงค์การวิจัย ขอบเขตของโครงการวิจัยและสมมติฐานของโครงการวิจัยนี้

1.1 ที่มาของปัญหา

1.1.1 ความจำเป็นทางด้านการแพทย์และการรักษาพยาบาล

เป็นสิ่งที่ปฏิเสธไม่ได้ในปัจจุบันว่า วัสดุชีวภาพสมัยใหม่ (Advanced Biomaterials) หรือวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในทางการแพทย์ (Medical Device) ที่มีการปรับปรุงและพัฒนาให้สามารถทำงานและปรับสภาพเข้ากันได้เมื่อนำไปใช้แทนที่หรือนำไปใช้ในการรักษาที่เกี่ยวข้องกับระบบของสิ่งมีชีวิต (Biocompatibility) เป็นสิ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

จากการรายงานขององค์การอนามัยโลกถึงสถานการณ์โรคหัวใจพบว่าในปี 2548 มีผู้เสียชีวิตจากโรคนี้ทั่วโลก 17.5 ล้านคน ในขณะที่ปี 2546 มีผู้เสียชีวิตด้วยโรคนี้ 16.7 ล้านคน สำหรับสถานการณ์ในประเทศไทยนั้นพบว่า มีผู้เสียชีวิตจากโรคหัวใจนี้ไม่ต่ำกว่าปีละ 10,000 คนและมีอีกกว่า 39 ล้านคนที่กำลังมีโอกาสเสี่ยงต่อโรคร้ายนี้ (ข้อมูลจากมูลนิธิโรคหัวใจแห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์) ทั้งนี้ผู้ป่วยส่วนใหญ่ในประเทศต่างๆ ทั่วโลกมีความจำเป็นและต้องการที่จะต้องใช้หรือเปลี่ยนถ่ายลิ้นหัวใจด้วยกันทั้งสิ้น ตัวอย่างเช่น ในประเทศสหรัฐอเมริกา ตามรายงานของ The Centers for Disease Control, 700,142 คนตายด้วยโรคหัวใจ และอีก 23 ล้านคนที่ถูกวินิจฉัยว่ามีปัญหาเกี่ยวกับระบบหัวใจ^{1,2} ในปี 2548, ค่าใช้จ่ายในการจัดซื้อวัสดุอุปกรณ์ที่จำเป็นในการรักษาเกี่ยวกับโรคหัวใจเฉพาะภายในประเทศสหรัฐอเมริกาคิดเป็นมูลค่าโดย ประมาณ US\$14.7 billion ซึ่งเห็นได้อย่างชัดเจนว่าความต้องการของวัสดุทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องในการรักษาเกี่ยวกับระบบโรคหัวใจเป็นสิ่งสำคัญ และกำลังเพิ่มปริมาณมากขึ้น จากข้อมูลดังกล่าวนี้เองจึงเป็นส่วนหนึ่งที่สนับสนุนให้ทั้งทางภาครัฐและภาคอุตสาหกรรมทั่วโลกมีความจำเป็นที่จะต้องมีการพัฒนาและปรับปรุงวัสดุทางการแพทย์ต่างๆ ที่จำเป็นในการนี้ อย่างจริงจังและต่อเนื่องไม่เพียงแต่การปรับเปลี่ยน หรือพัฒนาในส่วนองประกอบของวัสดุที่ใช้ในการผลิตเท่านั้นแต่ยังต้องคำนึงถึง biocompatibility ของวัสดุที่นำมาใช้เป็นองค์ประกอบสำคัญในการผลิตอีกด้วย

Biocompatibility ถูกควบคุมโดยการตอบสนองทางชีวภาพของระบบสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุ³⁻⁶ โดยมีสมมติฐานหลักที่ถูกกำหนดขึ้นเป็นหลักพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาองค์ความรู้ในสาขา Biomaterials-Surface-Science มานานกว่าหลายศตวรรษในส่วนของการวิจัยเกี่ยวกับวัสดุทางชีวภาพ ซึ่งกล่าวไว้ว่า Protein Adsorption เป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการการตอบสนองจากระบบสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุเทียม⁷ ดังนั้น Biocompatibility จึงมีส่วนสัมพันธ์หรือเกี่ยวข้องโดยตรงกับกระบวนการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) นั่นเอง โดยข้อมูลตัวอย่างซึ่งสามารถนำมาสนับสนุนสมมติฐานข้างต้นมีทั้งที่เป็นหลักฐานทางการแพทย์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการตอบสนองของระบบสิ่งมีชีวิตต่อวัสดุเทียม และข้อมูลการวิจัยอื่นๆ มากมายในอดีตที่ผ่านมาซึ่งกล่าวได้ว่าเป็นอุปสรรคหรือปัญหาในการพัฒนาในส่วนของตัวเอง

วัสดุเทียม อาทิเช่น การเกิดการแข็งตัวของเลือด (Blood Coagulation) และ การเชื่อมต่อหรือประสานกันของเซลล์ (Cell Adhesion) เป็นต้น⁹ ปัญหาดังกล่าวข้างต้นนี้ล้วนเป็นปรากฏการณ์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับ กระบวนการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) ทั้งสิ้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่จะพัฒนาและปรับปรุงในส่วนของ Biocompatibility ให้ดียิ่งๆ ขึ้นไปนั้น จะต้องอาศัยองค์ความรู้และความเข้าใจที่ดีในส่วนของความเข้าใจพื้นฐานเกี่ยวกับ Protein Adsorption

1.1.2 ปัญหาที่ยังไม่ได้รับการแก้ไข

การวิจัยทางด้านฟิสิกส์ชีวภาพเกี่ยวกับ Protein Adsorption Process ทั้งในลักษณะเชิงทฤษฎีและเชิงการทดลองได้ถูกศึกษามายาวนานเป็นเวลาหลายปี โดยคาดว่าเริ่มต้นขึ้นในปี คศ. 1929 โดย Johlin ซึ่งได้ค้นพบความสัมพันธ์โดยตรงระหว่าง Blood Coagulation และ Protein Adsorption⁹⁻¹¹ ต่อเนื่องด้วยการศึกษาถึงความระส่ำระสน់ของการตอบสนองทางชีวภาพดังกล่าวอย่างเป็นระบบโดย Lyman และ Brash ในปี คศ. 1965-1975¹²⁻¹⁵ และอีกหลายผลงานของนักวิทยาศาสตร์หลายๆ ท่านในยุคนั้น จนกระทั่งปัจจุบันซึ่งยังมีการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการพัฒนาปรับปรุงระบบ เทคนิคและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้และจำเป็นในการตรวจสอบ (Analytical Techniques) กระบวนการข้างต้นอีกด้วย ยกตัวอย่างเช่น Atomic Force Microscopy (AFM), Ellipsometry, Internal Reflection Spectroscopy, Surface Plasmon Resonance, และ Tensiometry¹⁶.

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาเพื่อพยายามที่จะทำความเข้าใจพื้นฐานในส่วนของระบบและกระบวนการการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) รวมทั้งการปรับปรุงพัฒนากระบวนการทดสอบข้างต้นในอดีตที่ผ่านมา นั้น ยังไม่สามารถทำความเข้าใจพื้นฐานดังกล่าวมีความถูกต้องครบถ้วนและชัดเจนมากนัก Protein Adsorption Process ยังคงเป็นปัญหาสำคัญและยังคงเป็นหัวข้อที่มีการถกเถียงกันอยู่อย่างต่อเนื่องในวงการของนักฟิสิกส์ชีวภาพ หรือ ในกลุ่มของผู้วิจัยทางด้าน Biomaterials¹⁷

ถึงแม้จะมีความพยายามที่จะศึกษาและเรียนรู้อย่างจริงจังในส่วนของ Protein Adsorption Process ของนักวิทยาศาสตร์หลายๆ แขนง แต่ผลลัพธ์กลับยังไม่สามารถบรรลุถึงผลสัมฤทธิ์เท่าใดนัก ด้วยเหตุนี้เองทำให้หัวข้อ หรือความสำคัญบางส่วนในการวิจัยซึ่งมีผลอย่างมากต่อความเข้าใจในส่วนของ Protein Adsorption ถูกละทิ้งโดยไม่ได้ทำการศึกษาอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามก็ยังมีนักวิทยาศาสตร์บางกลุ่มที่ยังตั้งใจที่จะศึกษาในส่วนขององค์ความรู้พื้นฐานนี้ต่อไป โดยยึดหลักการที่ว่าหากไม่มีความรู้พื้นฐานที่ถูกต้อง ก็จะไม่สามารถอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องและจะไม่สามารถทำการพัฒนาและปรับปรุง Biomaterials ในทิศทางที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพมากที่สุดได้ ด้วยเหตุนี้เอง นักวิทยาศาสตร์ดังกล่าวจึงพยายามที่จะทำการศึกษาทั้งในเชิงทดลองและทฤษฎี อีกทั้งยังพยายามที่จะนำผลการศึกษาเรียนรู้ดังกล่าวที่ได้ไปศึกษา ปรับปรุงและพัฒนากระบวนการวิจัยเพิ่มเติมด้วยการสร้างเป็นโมเดลตัวอย่างแล้วอาศัยระบบคอมพิวเตอร์ช่วยในการเรียนรู้อีกทางหนึ่ง

อย่างไรก็ตาม ปัญหาสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) ที่ยังคงต้องได้รับการศึกษาและวิจัยอย่างต่อเนื่องนั้น สามารถแบ่งออกได้เป็นประเด็นต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. อะไรคือความสัมพันธ์อย่างแท้จริงระหว่างคุณสมบัติทางพื้นผิวของวัสดุ (Surface Chemistry/ Energy) กับการดูดซับอย่างเฉพาะเจาะจงของโปรตีน (Specificity of Protein Adsorption)

ปัญหา: ยังไม่มีหลักเกณฑ์ที่แน่นอนในการพัฒนา การผลิตหรือการออกแบบวัสดุชีวภาพที่มีความเหมาะสมต่อการใช้ในเฉพาะด้านต่างๆ โดยวัสดุชีวภาพต่างๆ ที่ใช้งานในปัจจุบัน ถูกผลิตขึ้นมาจากพื้นฐานของการลองผิดลองถูก

2. การดูดซับของโปรตีนแต่ละชนิดอย่างเฉพาะเจาะจง (Selectivity of Protein Adsorption) ที่บริเวณพื้นผิวของวัสดุชีวภาพจากสารละลายผสม ตัวอย่างเช่น จากโปรตีนในเลือด มีกระบวนการเป็นอย่างไร

ปัญหา: ในปัจจุบันยังไม่สามารถที่จะทำนายหรือบ่งบอกส่วนผสมหรือองค์ประกอบที่แท้จริงของโปรตีนแต่ละชนิดจากสิ่งมีชีวิตที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวของวัสดุชีวภาพได้ อีกทั้งยังไม่สามารถอธิบายลักษณะการดูดซับของโปรตีน ไม่ว่าจะเป็นการดูดซับแบบผันกลับได้/ผันกลับไม่ได้ (Reversibility/Irreversibility) หรือ การดูดซับของโปรตีนโดยการสร้างชั้นของการดูดซับแบบชั้นเดียว/หลายชั้น (Monolayer/Multilayer Adsorption) ซึ่งล้วนมีผลสำคัญต่อการพัฒนาวัสดุชีวภาพ ได้ เป็นต้น

3. อะไรคือเหตุผลหรือหลักการสำคัญที่จะสามารถอธิบายผลของโปรตีนที่ถูกดูดซับที่ผิวของวัสดุชีวภาพต่อการตอบสนองจากสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุ (Biological Response) นั้นๆ

ปัญหา : ยังไม่มีข้อมูลยืนยันที่แน่นอนที่สามารถบ่งบอกได้ว่าชนิดและความเข้มข้นของโปรตีนที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวของวัสดุชีวภาพมีผลต่อระบบการตอบสนองจากสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุอย่างไร มีลักษณะที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร

ตัวอย่างปัญหาตามประเด็นต่างๆ ข้างต้น ถือว่าเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่มีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการพัฒนาและผลิตวัสดุชีวภาพให้สามารถใช้งานได้ดีภายในระบบของสิ่งมีชีวิต การอธิบายด้วยความรู้พื้นฐานเดิมหรือด้วยผลการวิจัยเท่าที่ผ่านมา ถือว่ายังไม่เพียงพอและถูกต้องเท่าที่ควร ดังนั้นการทำการศึกษ วิจัย เพิ่มเติมอย่างต่อเนื่องและเร่งด่วน ถือว่ามีความสำคัญยิ่ง

จะเห็นได้ว่าการศึกษเกี่ยวกับการดูดซับของโปรตีนมิใช่เป็นเรื่องใหม่ของวงการวิทยาศาสตร์แต่ก็ยังไม่มียุทธศาสตร์ที่ชัดเจนที่สามารถนำไปใช้สรุปและอธิบายปรากฏการณ์ต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้ ดังนั้นหากมิได้มีการริเริ่มหรือดำเนินการวิจัยต่อเนื่องนับตั้งแต่บัดนี้ ความหวังที่จะมีวัสดุชีวภาพที่มีความเหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในแต่ละวัตถุประสงค์อย่างมีประสิทธิภาพก็จะยังคงไม่สามารถเป็นไปได้ในอนาคตอันใกล้

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะกระบวนการการดูดซับของโปรตีนแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ (Reversible/Irreversible Process) สู่วัสดุชีวภาพ
2. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์และผลของขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่มีต่อกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้สู่วัสดุชีวภาพ
3. เพื่อศึกษาถึงความสัมพันธ์และผลของความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้สู่วัสดุชีวภาพ
4. เพื่อนำผลการศึกษาข้างต้นไปใช้เป็นข้อมูลหรือสร้างเป็นองค์ความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพของวัสดุชีวภาพทางการแพทย์

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จุดมุ่งหมายของการเสนอโครงการวิจัยฉบับนี้ เพื่อพยายามที่จะตอบโจทย์และอธิบายประเด็นปัญหา ที่ 2 ที่กล่าวไว้ข้างต้นเป็นหลัก ซึ่งจะมีส่วนสำคัญและจำเป็นต่อการอธิบายประเด็นปัญหาที่ 1 และ 3 ความตั้งใจและมุ่งมั่นของการทำวิจัยในโครงการนี้ได้รับอิทธิพลและแรงบันดาลใจมากจากผลการทดลองที่ต่อเนื่องมาจากการทำโครงการวิจัยระดับปริญญาเอกของผู้เสนอขอ ซึ่งผลงานวิจัยดังกล่าวที่อ้างถึงนี้ได้ถูกตีพิมพ์และถูกตอบรับการเผยแพร่แล้วในวารสารนานาชาติ¹⁸⁻²⁰ ผู้เสนอโครงการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลของการวิจัยในครั้งนี้ จะสามารถนำมาอธิบายหรือสร้างเป็นความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับกระบวนการดูดซับของโปรตีนสู่วัสดุชีวภาพได้ ซึ่งสามารถที่จะนำไปใช้หรือมีส่วนช่วยในการออกแบบและปรับปรุงวัสดุชีวภาพ ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อการประยุกต์ใช้งานในแต่ละด้านกับระบบสิ่งมีชีวิตได้ไม่มากนักน้อย และอีกทั้งยังหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลของการวิจัยจะสามารถถูกนำไปเผยแพร่ ตีพิมพ์ หรือนำเสนอในงานประชุมวิชาการต่างๆ เพื่อเป็นการถ่ายทอดทั้งทางด้านความรู้และทางด้านผลงานวิจัยใหม่ที่ค้นพบ สู่บุคคลอื่นผู้สนใจได้

1.4 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาหาความสัมพันธ์และตรวจสอบผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีน ที่มีต่อการดูดซับแบบผันกลับได้ต่อวัสดุตัวอย่าง โดยทำการทดลองเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนที่ดูดซับอยู่ที่ผิวของวัสดุตัวอย่างก่อนและหลังจากกระบวนการชะล้าง (Rinsing) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

สารละลายของโปรตีนตัวอย่างจำนวน 4 ชนิดที่มีขนาดแตกต่างกันตามระดับของมวลโมเลกุล (Molecular Weight) ระหว่าง 10-1000 kDa ถูกนำมาทดสอบหาปริมาณการดูดซับโดยใช้วิธีการคำนวณหาการเปลี่ยนแปลงค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนก่อนและหลังจากนำมาทำการดูดซับโดยวัสดุตัวอย่าง (Solution Depletion Methode) โดยอาศัยเครื่องมือที่เรียกว่าเครื่องมือตรวจวัดความ

เข้มข้นระดับนาโน (Nano Drop) เป็นเครื่องทดสอบ โดยปริมาณความเข้มข้นที่ลดลงของสารละลายสามารถนำไปคำนวณย้อนกลับเพื่อหาปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับไว้ที่วัสดุตัวอย่างได้

โปรตีนตัวอย่างที่สนใจประกอบด้วย Lysozyme (Lys), Human Serum Albumin (HSA), Human IgG (IgG), และ Fibrinogen (Fib) โปรตีนดังกล่าวล้วนเป็นโปรตีนที่พบได้ทั่วไปในระบบของสิ่งมีชีวิต และอีกทั้งยังเป็นโปรตีนที่มีส่วนสำคัญและเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางชีวภาพ (Biological Responses) จากระบบของสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุชีวภาพอีกด้วย

Octyl Sepharose, ซึ่งมีความเป็น Hydrophobicity (สมบัติหนึ่งของวัสดุที่นิยมนำมาพัฒนาและใช้เป็นวัสดุชีวภาพทางการแพทย์) ถูกนำมาใช้เป็นวัสดุตัวอย่างในโครงการการวิจัยในครั้งนี้

1.5 สมมติฐานของโครงการวิจัย

1. การดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) เป็นกระบวนการแบบผันกลับได้ (Reversible Process) และโปรตีนที่ถูกดูดซับสามารถจัดเรียงตัวเป็นแบบชั้นเดียวหรือหลายชั้นบนพื้นผิววัสดุได้ (Mono-layer/Multi-Layer Adsorption)

2. ขนาดโมเลกุลของโปรตีนมีผลต่อปริมาณโปรตีน (Bound Protein) ในกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้

3. ความเข้มข้นของโปรตีนมีผลต่อปริมาณโปรตีน (Bound Protein) ในกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้

บทที่ 2 ทฤษฎีและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ในบทนี้จะกล่าวถึงทฤษฎีเบื้องต้นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการดูดซับและการคายการดูดซับของโปรตีน การทดสอบหาปริมาณการดูดซับของโปรตีนด้วยวิธี Solution Depletion การดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ การดูดซับแบบชั้นเดียวและหลายชั้น และต้นแบบของพื้นผิวที่มีผลต่อปริมาณการดูดซับของโปรตีน

การดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption) ถือว่าเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่งปัญหาหนึ่งในวงการหรือสาขาวิชาของ Biomaterials Surface Science^{17, 25} โดยอยู่บนพื้นฐานของสมมติฐานที่กล่าวว่าการดูดซับของโปรตีนเป็นกระบวนการแรกที่จะมีส่วนในการบ่งบอก หรือชี้วัดกระบวนการตอบสนองจากสิ่งมีชีวิตสู่วัสดุชีวภาพที่ถูกนำไปใช้ในการรักษาทางด้านการแพทย์ในระบบของสิ่งมีชีวิต โปรตีนที่ถูกดูดซับมักถูกกล่าวหาว่าไม่สามารถที่จะหลุดหรือถูกคายออกมาจากระบบได้เมื่อถูกดูดซับแล้ว (Irreversibly adsorb) อีกทั้งยังถูกกล่าวหาว่าจะมีการเรียงตัวเป็นแบบชั้นเดียว (Mono-Layer Adsorption) เท่านั้น^{21 (and citations therein)} อย่างไรก็ตามการกล่าวว่าการดูดซับของโปรตีนเป็นแบบผันกลับไม่ได้ ยังเป็นปัญหาที่ถกเถียงกันอยู่อย่างต่อเนื่องตั้งแต่ในอดีตมาจนถึงปัจจุบัน²⁵ เช่นเดียวกันกับการถกเถียงกันในส่วนของการดูดซับของโปรตีนแบบชั้นเดียวและหลายชั้น (Mono-/Multi-Layer Adsorption)^{17-20, 26-31}

ผลการศึกษาการดูดซับของโปรตีนด้วยวิธีการทดสอบการเปลี่ยนแปลงที่ลดลงของค่าความตึงผิว โดย Krishnan et al. (2003)³² สนับสนุนว่าการดูดซับแบบหลายชั้นของโปรตีนสู่ผิววัสดุและการดูดซับแบบผันกลับได้ เป็นกระบวนการที่สามารถเป็นไปได้ซึ่งให้ผลในลักษณะเดียวกันกับผลการศึกษาโดย Leibner et al. (2009)²⁰ ด้วยวิธี Solution Depletion โดยสารรังสี (Radiometry)

อย่างไรก็ตามปัญหาดังกล่าวข้างต้นก็ยังเป็นข้อถกเถียงกันอยู่ไม่จบสิ้น และยังไม่มีผู้ใดที่ได้ทำการศึกษาถึงผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับแบบผันกลับได้ และการดูดซับแบบหลายชั้น อย่างจริงจัง ดังนั้นจึงถือเป็นโอกาสอันดีที่ผู้เสนอโครงการวิจัยนี้จะได้ทำการศึกษาและเสนอผลการศึกษาที่คาดว่าจะพบและมีประโยชน์ แก่บุคคลผู้สนใจในโอกาสต่อไป

2.1 การดูดซับ/การคายการดูดซับ (Adsorption/Desorption)^{1, 21}

การดูดซับ (Adsorption) คือกระบวนการที่โมเลกุลใดๆ เคลื่อนที่ไปยึดติดอยู่กับผิวของวัสดุ โดยที่กระบวนการดูดซับจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ ร่วมกันยกตัวอย่างเช่น จำนวนโมเลกุลที่จะเคลื่อนที่ไปยังผิวของวัสดุ, ปริมาณเนื้อที่ของวัสดุที่เป็นตัวดูดซับ, และอุณหภูมิเป็นต้น โมเลกุลถูกนำหรือเคลื่อนที่ไปยังผิวของวัสดุได้หลายวิธี ไม่ว่าจะเป็น การแพร่, การไหล, หรือ การเคลื่อนที่เนื่องจากการพาความร้อน โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ดังกล่าวและมีผลต่อปริมาณของจำนวนโมเลกุลที่ถูกดูดซับบริเวณผิวของวัสดุประกอบไปด้วยหลายปัจจัยคือ ความเข้มข้นของโมเลกุลในระบบที่ศึกษา, ความเร็วของโมเลกุล, และขนาดของโมเลกุล

ในกรณีการดูดซับของโปรตีนที่ผิวของวัสดุ โปรตีนจะปฏิสัมพันธ์กับพื้นผิวด้วยแรงระหว่างโมเลกุล (Intermolecular Force) อาทิเช่น Ionic Bonding, Hydrophobic Interaction, และ Charge-

transfer interaction ซึ่งความแรงของแรงภายในดังกล่าวนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดและขนาดของโปรตีน และชนิดของพื้นผิวที่ทำการดูดซับเป็นหลัก

การคายการดูดซับ (Desorption) เป็นกระบวนการตรงกันข้ามกับการดูดซับ โมเลกุลซึ่งถูกดูดซับหรือยึดเกาะอยู่ที่บริเวณผิววัสดุเกิดการแยกตัวออกจากผิววัสดุนั้นแล้วเคลื่อนที่กลับไปยังส่วนของสารละลาย (Bulk Phase) การคายการดูดซับของโปรตีน ถูกเชื่อกันเรื่อยมาว่าเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นอย่างช้าๆ หรือเป็นกระบวนการที่ไม่สามารถเกิดขึ้นได้เองโดยง่ายหากแต่มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านเคมี ไม่ว่าจะเป็น Ionic Strength, pH, หรือ การใช้สารเคมีจำพวกสารซักฟอกในการชะล้าง อย่างไรก็ตาม โปรตีนที่ถูกดูดซับสามารถที่จะถูกโปรตีนโมเลกุลอื่นไม่ว่าจะเป็นโปรตีนชนิดเดียวกัน หรือต่างชนิดกัน แทนที่ตรงบริเวณที่ถูกดูดซับได้ โดยอิทธิพลของ Vroman Effect²²

2.2 การทดสอบหาปริมาณโมเลกุลที่ถูกดูดซับจากค่าผลต่างของความเข้มข้นของสารละลายก่อนและหลังจากมีการดูดซับ (Solution Depletion Method)^{1, 23}

เป็นการศึกษาถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงการดูดซับของโปรตีนสู่วัสดุทดสอบวิธีหนึ่ง ที่ไม่ยุ่งยากและซับซ้อน อีกทั้งยังเป็นวิธีที่ไม่มีผลกระทบจากสารเคมีหรือปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องต่อผลการทดสอบหลักการของวิธีการนี้คือ การนำสารละลายที่รู้ค่าความเข้มข้นที่แน่นอนมาผสมรวมกับพื้นผิวที่ต้องการศึกษาเป็นระยะเวลาหนึ่ง แล้วทำการทดสอบค่าความเข้มข้นของสารละลายอีกครั้ง หากมีการดูดซับของโมเลกุลที่บริเวณพื้นผิวของวัสดุทดสอบ ค่าความเข้มข้นของสารละลายจะมีค่าลดลง โดยปริมาณความแตกต่างของค่าความเข้มข้นของสารละลายก่อนและหลังจากผสมรวมกันกับพื้นผิว หรือตัวดูดซับก็คือปริมาณความเข้มข้นของโมเลกุลที่ถูกดูดซับอยู่ที่บริเวณผิวของวัสดุทดสอบในหน่วยของมวลต่อปริมาตรของสารละลายที่ใช้ในการทดสอบนั่นเอง

2.3 การดูดซับแบบผันกลับได้และผันกลับไม่ได้ (Reversible/Irreversible Adsorption) และรูปแบบการดูดซับแบบชั้นเดียวและหลายชั้น (Mono-Layer/Multi-Layer Adsorption Model)^{1, 23}

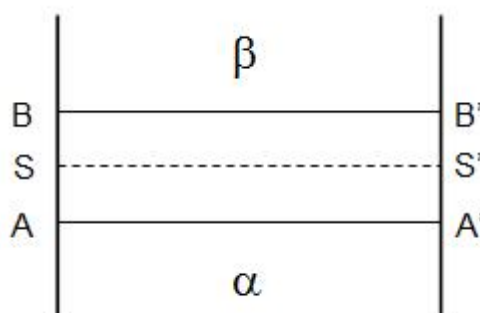
การดูดซับของโปรตีนไปยังผิวของวัสดุถูกอธิบายว่าเป็นกระบวนการที่ผันกลับเองไม่ได้ (Irreversible Process) ทั้งนี้เนื่องจาก การดูดซับของโปรตีนที่ผิวของวัสดุเกิดจากแรงภายในที่แข็งแรงระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับผิวของวัสดุ ข้อสรุปดังกล่าวได้รับอิทธิพลหรือถูกขยายผลมาจากหลักการดูดซับของ Langmuir ผนวกกับหลักการที่กล่าวว่าการดูดซับของโปรตีนบนผิววัสดุใดๆ จะเป็นการดูดซับแบบชั้นเดียว (Mono-Layer Adsorption) ดังนั้นโมเลกุลที่ถูกดูดซับจะมีปฏิสัมพันธ์โดยตรงกับผิวของวัสดุ และแรงที่ทำให้โมเลกุลถูกยึดติดกับผิวของวัสดุนั้นจะมีความแข็งแรง อย่างไรก็ตามในภายหลังกระบวนการดูดซับแบบผันกลับได้ (Reversible Process) และรูปแบบการดูดซับแบบหลายชั้น (Multi-Layer Adsorption) ซึ่งมีลักษณะตรงกันข้ามกับการดูดซับแบบผันกลับไม่ได้และการดูดซับแบบชั้นเดียว ได้ถูกนำมาใช้ในการอธิบายเพิ่มเติมเกี่ยวกับการดูดซับของโปรตีนไปพร้อมๆ กับหลักการเดิมหลังจากที่มีการค้นพบว่า ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับที่ผิวของวัสดุมีค่าลดลงสำหรับโปรตีนบางชนิด เมื่อเวลาผ่านไป ซึ่ง

กระบวนการดังกล่าวนี้ได้นิยามการดูดซับของโปรตีนสู่ผิววัสดุไว้ว่า การดูดซับไม่จำเป็นต้องเป็นการดูดซับแบบชั้นเดียว โมเลกุลของโปรตีนสามารถจัดเรียงตัวกันหลายๆ ชั้นในสถานะของการถูกดูดซับได้ ซึ่งจากหลักการนี้เองทำให้สามารถขยายผลเพิ่มเติมได้ว่า โปรตีนที่เรียงตัวอยู่ในชั้นอื่นๆ ที่ไม่ได้ติดกับผิวของวัสดุสามารถที่จะถูกคายหรือหลุดออกจากในสถานะที่ถูกการดูดซับได้เนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างผิววัสดุและโปรตีน และแรงดึงดูดระหว่างโปรตีนและโปรตีนอาจมีค่าไม่แข็งแรงพอ ปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้เองถือได้ว่าเป็นหลักฐานหนึ่งที่ชี้ชัดให้เห็นว่า Protein Adsorption เป็นกระบวนการที่ผันกลับได้ (Reversible Process)

2.4 ต้นแบบของพื้นผิว (Surface or Interface/Interphase Model) ที่มีผลต่อการพิจารณาการดูดซับของโปรตีน (Protein Adsorption Paradigms)^{17, 24}

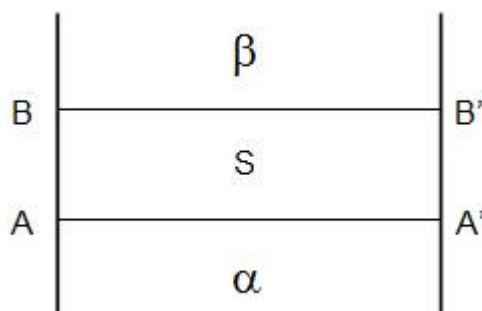
ต้นแบบหรือรูปแบบจำลองการดูดซับของโปรตีนสามารถจำแนกออกไปตามลักษณะของเฟสหรือพื้นผิวในการดูดซับโปรตีนได้ 2 ลักษณะใหญ่ๆ คือ เฟสการดูดซับแบบ 2 มิติ (Surface/Interface Model) และ เฟสการดูดซับแบบ 3 มิติ (Interphase Model)

Interface Model ถูกคิดค้นและนิยามโดย Gibbs ในปี ค.ศ. 1928 โดยกล่าวว่า บริเวณที่กั้นระหว่างเฟส 2 เฟส (ในที่นี้คือเฟสของสารละลายโปรตีนและเฟสของผิววัสดุดูดซับ) จะมีลักษณะเป็นเส้นแบ่งโดยที่ไม่มี ความหนา ไม่มีปริมาตร โดยสามารถแสดงได้ดังเส้น SS' ในรูปที่ 1 ซึ่งเป็นเส้นแบ่งกั้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ β และ α



รูปที่ 1 Gibbs Dividing Surface

Interphase Model ถูกคิดค้นและนิยามโดย Guggenheim ในปี ค.ศ. 1967 โดยกล่าวว่า บริเวณที่กั้นระหว่างเฟส 2 เฟส (ในที่นี้คือเฟสของสารละลายโปรตีนและเฟสของผิววัสดุดูดซับ) จะมีลักษณะเป็นเฟสอีกเฟสหนึ่งที่มีความหนา และมีปริมาตรค่าหนึ่ง โดยสามารถแสดงได้ดังเฟส S ในรูปที่ 2 ซึ่งเป็นบริเวณที่แบ่งกั้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ β และ α



รูปที่ 2 The Surface Phase

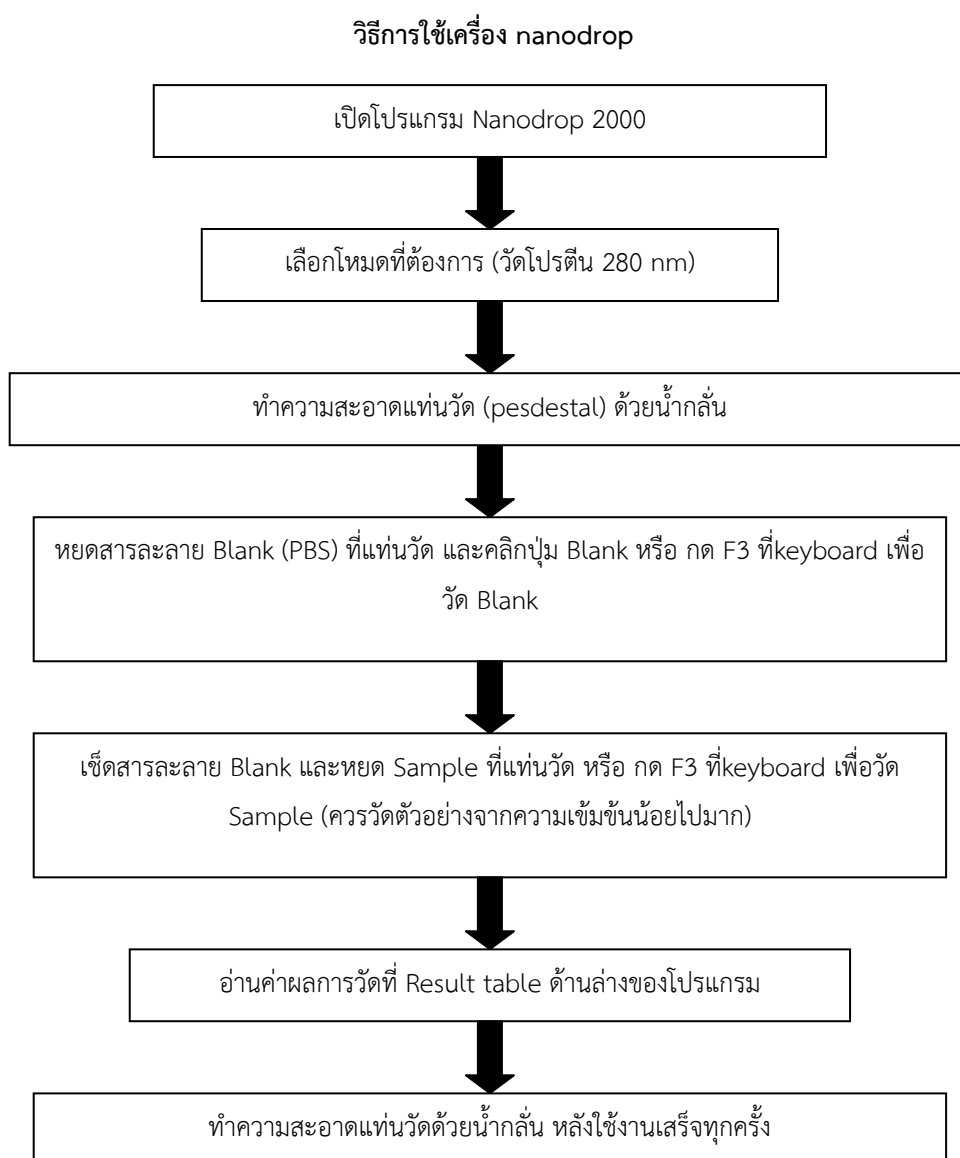
จากรูปแบบที่แตกต่างกันของต้นแบบเฟสทั้งสองข้างต้น หากผู้ศึกษาทางด้านการดูดซับของโมเลกุล เลือกใช้ต้นแบบหรือโมเดลของเฟสที่ต่างกัน จะทำให้การอธิบายปรากฏการณ์หรือระบบชนิดเดียวกันมีความแตกต่างกันได้ ซึ่งทั้งสองต้นแบบของเฟสข้างต้น ต่างก็มีข้อดี ข้อเสียที่แตกต่างกัน

Interface Model มักถูกนำไปใช้ในการอธิบายของนักวิทยาศาสตร์ที่เชื่อว่าการดูดซับของโมเลกุลเป็นแบบชั้นเดียว (Mono-Layer Adsorption) และไม่สามารถผันกลับได้ (Irreversible Process) ส่วน Interphase Model มักจะถูกนำไปใช้ในการอธิบายของปรากฏการณ์ที่เชื่อว่าระบบการดูดซับสามารถเป็นแบบหลายชั้น (Multi-Layer Adsorption) และสามารถผันกลับได้ (Reversible Process) ทั้งนี้ทางผู้เสนอโครงการวิจัยจะใช้ Interphase Model ในการอธิบายการดูดซับของโปรตีน เนื่องจากยังไม่มีนักวิทยาศาสตร์ท่านใดสามารถพิสูจน์ได้ว่า เส้นแบ่ง SS' ในรูปที่ 1 มีอยู่จริงในระบบ อีกทั้งยังเชื่อว่าบริเวณที่โปรตีนถูกดูดซับจะต้องเป็นบริเวณที่มีปริมาตรไม่น้อยไปกว่าปริมาตรของโปรตีนที่ถูกดูดซับ ดังนั้นบริเวณหรือพื้นผิวที่กั้นระหว่างเฟสสองเฟส (เฟสของสารละลายและเฟสของผิววัสดุ) จำเป็นต้องเป็นบริเวณที่มีปริมาตร

บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยนี้แบ่งเป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือส่วนการศึกษาผลของขนาดโปรตีนที่มีต่อการดูดซับแบบผันกลับได้และส่วนการศึกษาผลของความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับแบบผันกลับได้ ทั้งสองส่วนนี้มีส่วนของการทดลองที่มีความเหมือนกัน จึงอาจทำการทดลองควบคู่กันไปในส่วนได้ ลำดับการดำเนินการวิจัยสามารถแบ่งได้ดังนี้

1. ศึกษาหลักการและวิธีการใช้เครื่อง Nano Drop ให้ถูกต้องเพื่อจะได้ทำการทดลองได้อย่างถูกต้อง แม่นยำ และรวดเร็ว โดยมีลำดับการใช้งานของตัวเครื่องดังแผนภาพต่อไปนี้



ทั้งนี้

- ควรทำการ Re blank (หยดสารละลาย Blank และกดปุ่ม Re blank หรือกด F2 ที่ keyboard ทุก 30 นาที)
- ทำความสะอาดหัวด้วย PR1 เป็นประจำหรือเมื่อวัดค่าได้ไม่ถูกต้อง
- กระดาษที่ใช้เช็ดแท่นวัดต้องไม่ขาดง่าย หรือเป็นขุยเมื่อโดนน้ำ

2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมสำหรับการเลือกเงื่อนไขในการทดลอง อาทิเช่นความเข้มข้นที่เหมาะสมของโปรตีนแต่ละชนิดที่จะใช้ในแต่ละการทดลอง สถานะดังกล่าวที่ใช้กันทั่วไปในการทดสอบคือสถานะอิ่มตัวของพื้นผิวโดยโปรตีนแต่ละชนิด ซึ่งสถานะดังกล่าวนี้สามารถทำการทดลองหาได้จากการหาความเข้มข้นอิ่มตัว (Saturating Concentration) เมื่อทดสอบด้วยผิววัสดุตัวอย่างโดยมีค่าของพื้นที่ผิวรวมของวัสดุที่ใช้ในแต่ละครั้งคงที่ การหาความเข้มข้นอิ่มตัวดังกล่าว ทำได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนไปเรื่อยๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับบริเวณผิวของวัสดุ หากพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนต่อไป แล้วปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับไม่เปลี่ยนแปลง จะถือว่าความเข้มข้นของโปรตีน ณ จุดนั้นเป็นความเข้มข้นอิ่มตัว

ในการศึกษาในโครงการวิจัยนี้ ได้ใช้โปรตีนตัวอย่างจำนวน 5 ชนิดคือ

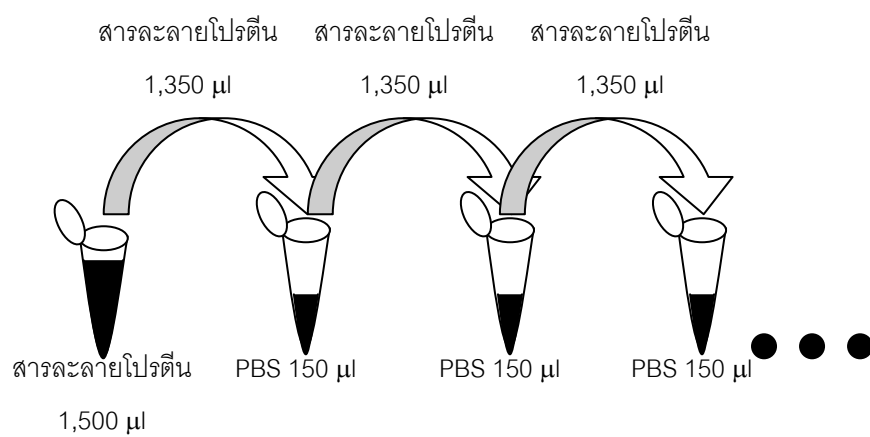
- Human Serum Albumin
- IgG
- Fibrinogen
- IgM
- Alpha Macroglobulin

โดยใช้ PBS เป็นตัวทำละลาย และใช้ Octyl Sepharose เป็นวัสดุพื้นผิวตัวอย่าง ซึ่งสัดส่วนในการผสมระหว่างสารละลายโปรตีนและวัสดุพื้นผิวตัวอย่างคือ 100 ไมโครลิตรต่อ 10 ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยมีลำดับการดำเนินการตามแผนภาพต่อไปนี้

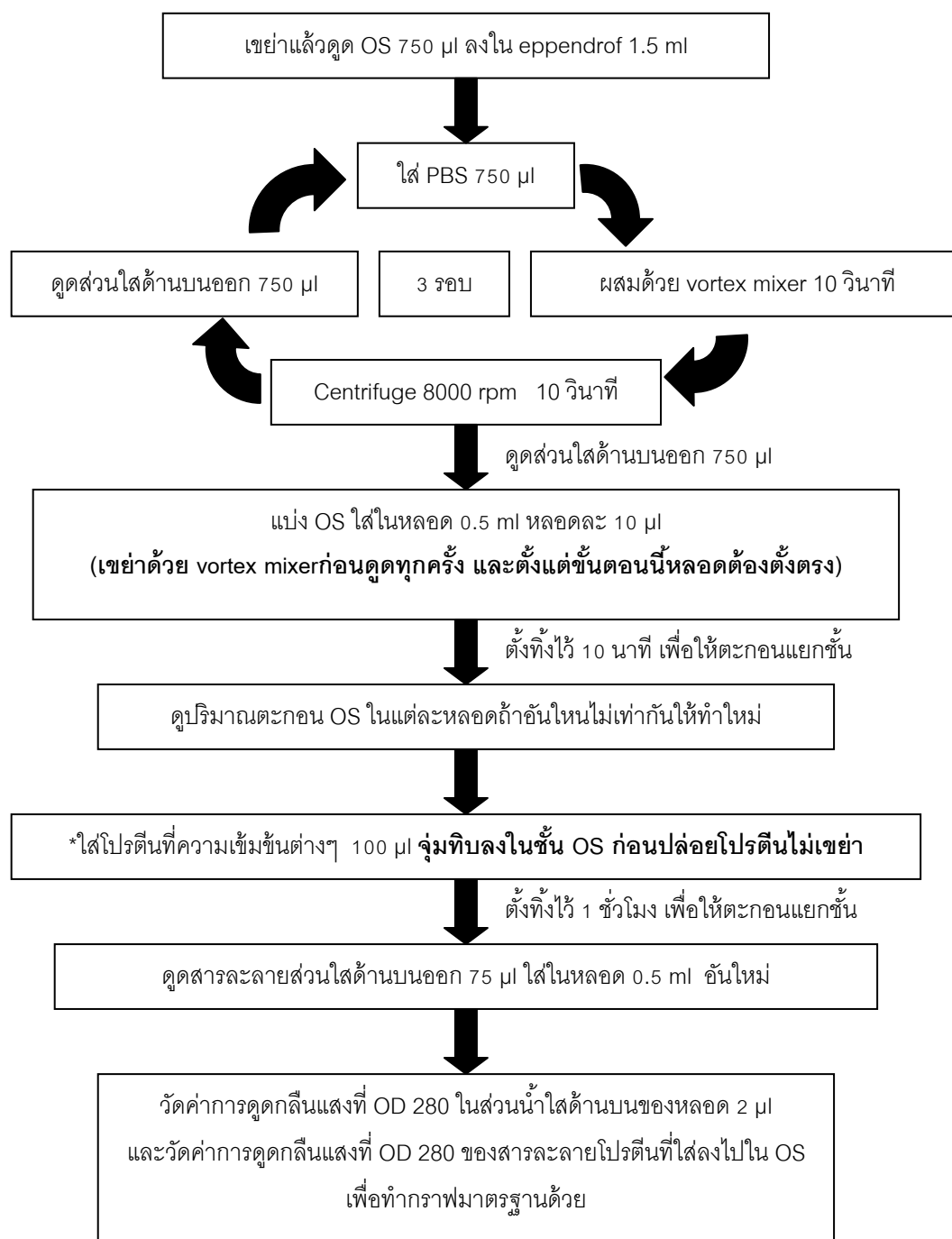
เตรียมสารละลายโปรตีนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ซังโปรตีน

ละลายด้วย PBS 1.5 ml



ขั้นตอนการทดลองหาความเข้มข้นอิมตัวของสารละลายโปรตีนแต่ละชนิด



3. ศึกษาผลของความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อกระบวนการดูดซับของโปรตีนแบบผันกลับได้ โดยอาศัยกระบวนการชะล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (Rinsing) โดยทำการศึกษาค้างหนึ่งโปรตีน โดยทำการทดลองที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-10 mg/ml ทั้งนี้ความเข้มข้นดังกล่าวจะต้องพิจารณาจากค่าความเข้มข้นของโปรตีนที่ต่ำกว่า Saturating Concentration ไปจนถึงความเข้มข้นที่สูงกว่า Saturating Concentration ปริมาณโปรตีนที่ถูกดูดซับอยู่บนผิวของวัสดุก่อนการชะล้างจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่บนผิวของวัสดุหลังการชะล้างในแต่ละครั้ง รวมทั้งสิ้นสามครั้ง

4. ทำการศึกษาซ้ำข้อ 3 ในลักษณะเดียวกัน แต่เปลี่ยนชนิดของโปรตีนที่ทำการศึกษาจนครบทั้งหมดทุกเงื่อนไขความเข้มข้น

5. ศึกษาผลของขนาดของโปรตีนที่มีต่อกระบวนการดูดซับของโปรตีนแบบผันกลับได้โดยอาศัยกระบวนการชะล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (Rinsing) โดยทำการศึกษาเช่นเดียวกับเงื่อนไขที่ศึกษาในข้อ 3 และ 4 ปริมาณโปรตีนแต่ละชนิดซึ่งถูกดูดซับอยู่บนผิวของวัสดุก่อนการชะล้างจะถูกนำมาเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่บนผิวของวัสดุหลังการชะล้างในแต่ละครั้งรวมกันทั้งสิ้นสามครั้ง

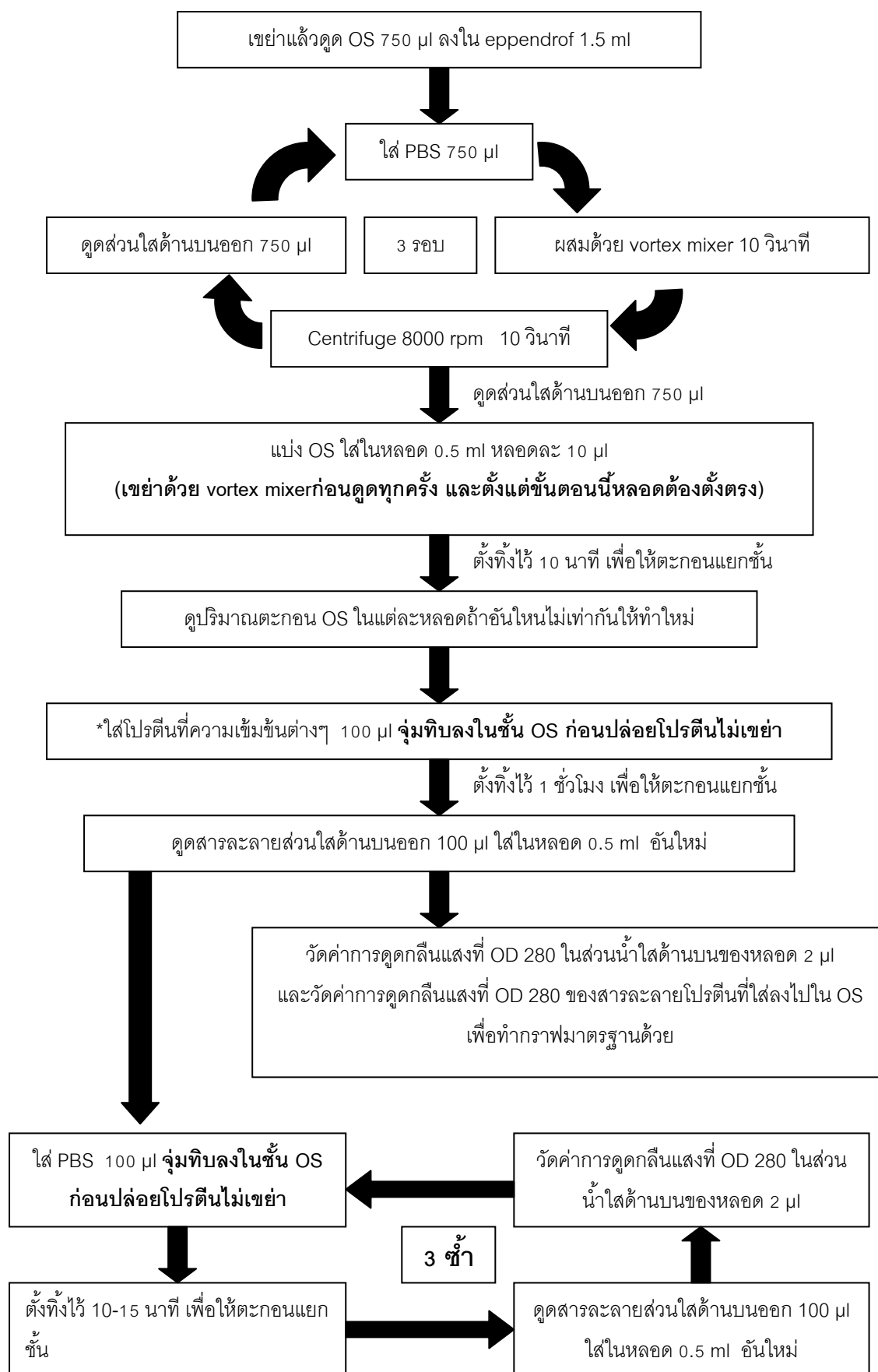
6. ทำการศึกษาซ้ำข้อ 5 ในลักษณะเดียวกัน แต่เปลี่ยนค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนก่อนการชะล้างจนครบทั้งหมดทุกเงื่อนไขความเข้มข้น

7. รวบรวมและวิเคราะห์ผลการทดลอง ทำการทดลองซ้ำสำหรับการทดลองที่คิดว่ามีข้อผิดพลาด

8. สรุปผลการทดลอง ปัญหา และประเด็นสำคัญต่างๆ เขียนรายงาน

9. เตรียมเสนอผลการวิจัย เตรียมส่งตีพิมพ์และทำการเผยแพร่งานวิจัย

แผนภาพแสดงการทดลองขั้นตอนที่ 4 ถึง 6



บทที่ 4 ผลการวิจัย

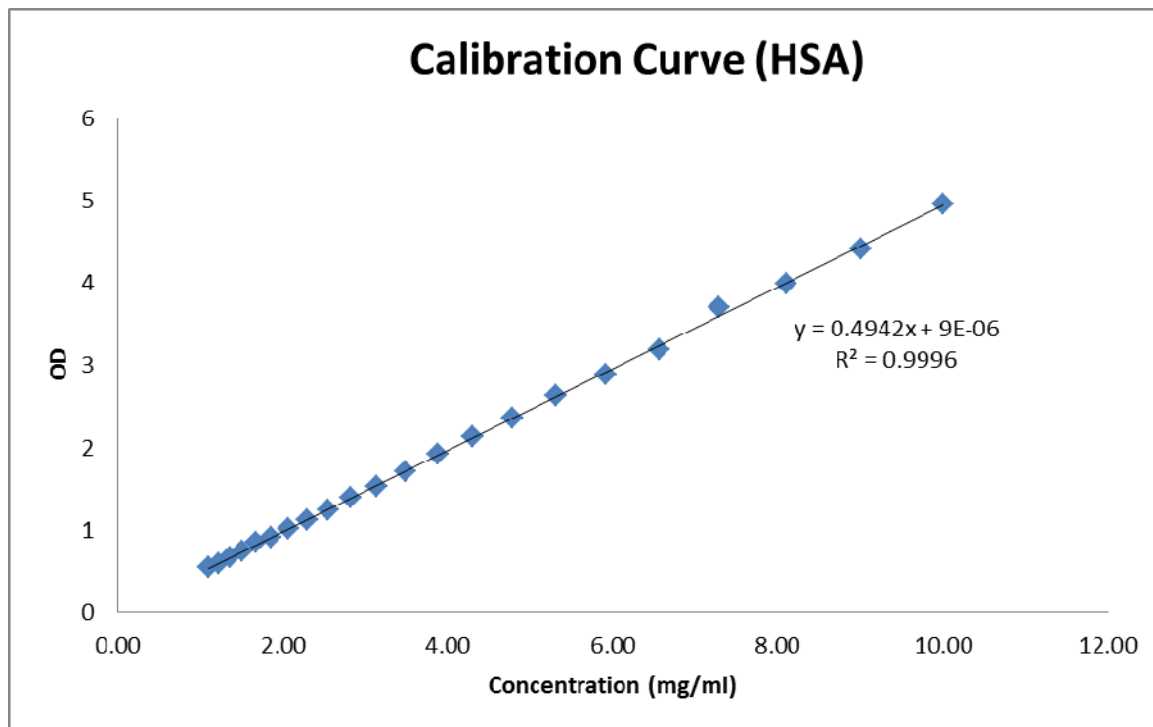
ในการทำการวิจัยในครั้งนี้ จำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาถึงความเข้มข้นอิมตัวของโปรตีนตัวอย่างแต่ละชนิดในเบื้องต้นก่อน เพื่อนำค่าความเข้มข้นอิมตัวของโปรตีนแต่ละชนิดมาเป็นข้อมูลในการเลือกค่าความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองต่อไป ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ใช้โปรตีน 5 ชนิด ดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในข้างต้น (ในการทดลองการศึกษาหาค่าความเข้มข้นอิมตัว ได้ทำการศึกษาเพียง 4 โปรตีน โดยไม่รวมโปรตีน Alpha Macroglobulin ทั้งนี้เนื่องจากโปรตีนชนิดนี้มีราคาแพงมาก อย่างไรก็ตามในการทดลองก็จะใช้ในช่วงความเข้มข้นเดียวกันกับโปรตีนชนิดอื่นๆ) โดยก่อนที่จะทำการทดลองนั้น ทางผู้วิจัยจำเป็นต้องสร้างกราฟมาตรฐาน (calibration curve) ของแต่ละโปรตีนขึ้นมาด้วยเพื่อนำไปใช้เทียบเพื่อหาความเข้มข้นย้อนกลับมาจากผลการทดลองที่วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายในแต่ละเงื่อนไข ทั้งนี้ calibration curve ของสารละลายโปรตีนแต่ละชนิดแสดงได้จากตารางและรูปดังแสดง

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (HAS) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง

protein (mg/ml)	Standard ครั้งที่1	Standard ครั้งที่2	Standard ครั้งที่3	standard (AV)
10.00	4.913	4.924	4.946	4.928
9.00	4.352	4.378	4.415	4.382
8.10	3.948	3.978	3.982	3.969
7.29	3.613	3.696	3.714	3.674
6.56	3.127	3.165	3.208	3.167
5.90	2.865	2.862	2.876	2.868
5.31	2.598	2.614	2.603	2.605
4.78	2.330	2.337	2.339	2.335
4.30	2.103	2.096	2.103	2.101
3.87	1.922	1.896	1.889	1.902
3.49	1.686	1.680	1.692	1.686
3.14	1.508	1.501	1.516	1.508
2.82	1.356	1.355	1.373	1.361
2.54	1.223	1.217	1.228	1.223
2.29	1.094	1.081	1.100	1.092
2.06	0.985	0.974	0.993	0.984
1.85	0.885	0.892	0.886	0.888
1.67	0.825	0.816	0.814	0.818
1.50	0.713	0.712	0.713	0.713
1.35	0.648	0.643	0.649	0.647
1.22	0.572	0.569	0.583	0.575
1.09	0.525	0.531	0.509	0.522

จากตารางที่ 1 สามารถนำมาทำ calibration curve ได้ดังกราฟที่ 1

กราฟที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน HSA



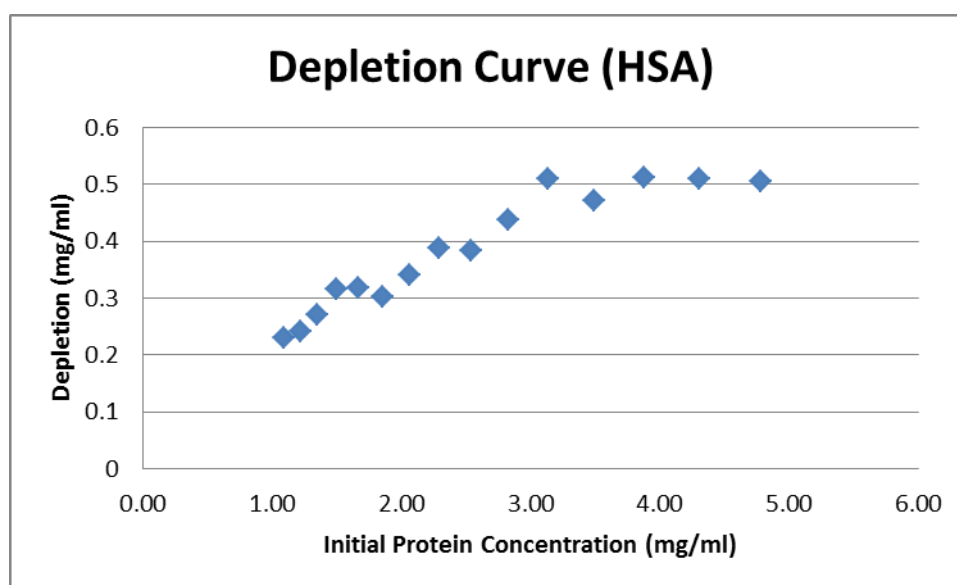
หลังจากนั้น ผู้ทำการทดลองก็นำสารละลายโปรตีนที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันมาทำการทดสอบหาค่าความเข้มข้นอ้อมตัวโดยทำการดูดซับระหว่างสารละลายและพื้นผิวเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนทำการทดสอบวัดค่าการดูดกลืนแสงและคำนวณหาค่าความเข้มข้นอ้อมตัวของโปรตีนต่อไป (ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ใช้เวลาในการดูดซับที่ 1 ชั่วโมงเนื่องจากการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้แล้วว่าเป็นเวลาที่เข้าสู่สมดุลของระบบแล้ว) ซึ่งในการทดสอบจะได้ผลดังตาราง โดยคอลัมน์แรกในตารางคือค่าความเข้มข้นของโปรตีนใน PBS ที่นำมาใช้ทดสอบ คอลัมน์ที่ 2 และ 3 คือปริมาณของพื้นผิว (OS) และปริมาณของสารละลายโปรตีนที่ใช้ ตามลำดับ คอลัมน์ที่ 4-6 คือค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนหลังจากมีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง โดยการซ้ำครั้งที่ 1, 2, และ 3 ตามลำดับ คอลัมน์ที่ 7 ค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนหลังจากมีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง คอลัมน์ที่ 8 คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายหลังจากการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง โดยคำนวณค่าจากคอลัมน์ที่ 7 เทียบกับ calibration curve และในคอลัมน์ที่ 8 คือค่าการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิว OS หลังจากมีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 แสดงค่าการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายโปรตีน HSA กับ OS

protein (mg/ml)	OS (ul)	Protein (ul)	Sample1	Sample2	Sample3	Sample (AV)	protein in solution	protein absorb
10.00	10	100	4.166	4.413	4.445	4.341	8.784567651	1.22
9.00	10	100	3.922	3.942	3.935	3.933	7.958316471	1.04
8.10	10	100	3.519	3.513	3.528	3.520	7.12262242	0.98
7.29	10	100	3.145	3.176	3.257	3.193	6.460272494	0.83
6.56	10	100	2.845	2.892	2.869	2.869	5.804667476	0.76
5.90	10	100	2.547	2.541	2.550	2.546	5.151760421	0.75
5.31	10	100	2.300	2.311	2.302	2.304	4.66275462	0.65
4.78	10	100	2.081	2.077	2.182	2.113	4.276271415	0.51
4.30	10	100	1.858	1.859	1.857	1.858	3.759611493	0.55
3.87	10	100	1.670	1.654	1.661	1.662	3.362336436	0.51
3.49	10	100	1.504	1.489	1.476	1.490	3.014299204	0.47
3.14	10	100	1.303	1.296	1.296	1.298	2.627141508	0.51
2.82	10	100	1.156	1.214	1.168	1.179	2.386348307	0.44
2.54	10	100	1.048	1.093	1.058	1.066	2.15769594	0.38
2.29	10	100	0.940	0.933	0.943	0.939	1.899365979	0.39
2.06	10	100	0.843	0.840	0.864	0.849	1.717927964	0.34
1.85	10	100	0.756	0.773	0.769	0.766	1.549979765	0.30
1.67	10	100	0.663	0.675	0.661	0.666	1.348307028	0.32
1.50	10	100	0.583	0.588	0.587	0.586	1.185754755	0.32
1.35	10	100	0.537	0.527	0.538	0.534	1.080534197	0.27
1.22	10	100	0.483	0.479	0.483	0.482	0.974639147	0.24
1.09	10	100	0.428	0.424	0.430	0.427	0.864697154	0.23

เมื่อนำข้อมูลในตารางที่ 2 มาเขียนกราฟ พบว่าจะได้กราฟที่สามารถหาค่าความเข้มข้นอิ่มตัวได้
 ดังกราฟที่ 2

กราฟที่ 2 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (HSA) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน

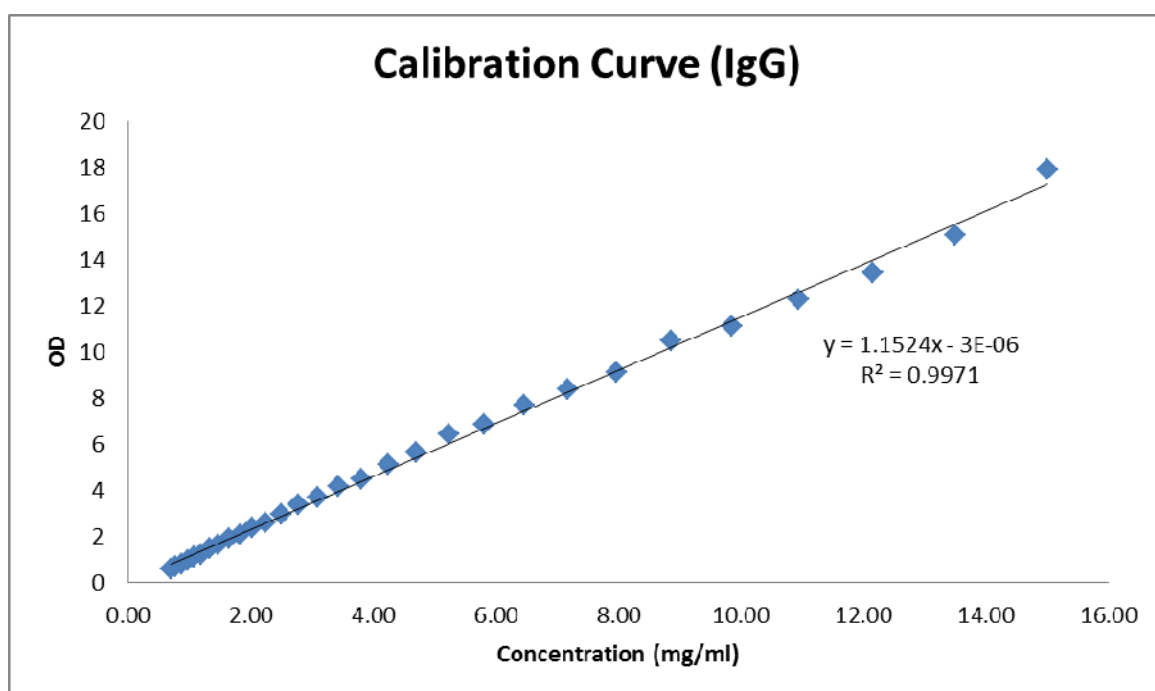


หลังจากนั้นก็ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับ HSA สำหรับโปรตีนชนิดอื่นๆ โดยจะทำให้ได้ลักษณะของ Calibration Curve และกราฟการดูดซับของโปรตีนดังแสดง

ตารางที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (IgG) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง

protein (mg/ml)	Standard1	Standard2	Standard3	standard (AV)
15.00	18.325	18.282	18.333	18.313
13.50	15.445	15.490	15.511	15.482
12.15	13.908	13.783	13.862	13.851
10.94	12.636	12.741	12.773	12.717
9.84	11.659	11.565	11.440	11.555
8.86	10.693	11.034	11.084	10.937
7.97	9.813	9.805	9.023	9.547
7.17	8.809	8.826	8.870	8.835
6.46	7.973	8.136	8.256	8.122
5.81	7.244	7.293	7.342	7.293
5.23	6.910	6.840	6.812	6.854
4.71	6.031	6.078	6.062	6.057
4.24	5.464	5.658	5.489	5.537
3.81	4.964	4.918	4.938	4.940
3.43	4.514	4.562	4.643	4.573
3.09	4.092	4.094	4.131	4.106
2.78	3.837	3.850	3.766	3.818
2.50	3.361	3.415	3.414	3.397
2.25	3.058	3.019	3.056	3.044
2.03	2.771	2.860	2.810	2.814
1.82	2.487	2.471	2.571	2.510
1.64	2.304	2.282	2.400	2.329
1.48	2.102	2.045	2.027	2.058
1.33	1.886	1.936	1.869	1.897
1.20	1.590	1.667	1.660	1.639
1.08	1.556	1.483	1.545	1.528
0.97	1.385	1.370	1.359	1.371
0.87	1.225	1.246	1.245	1.239
0.79	1.067	1.117	1.118	1.101
0.71	1.016	1.018	1.001	1.012

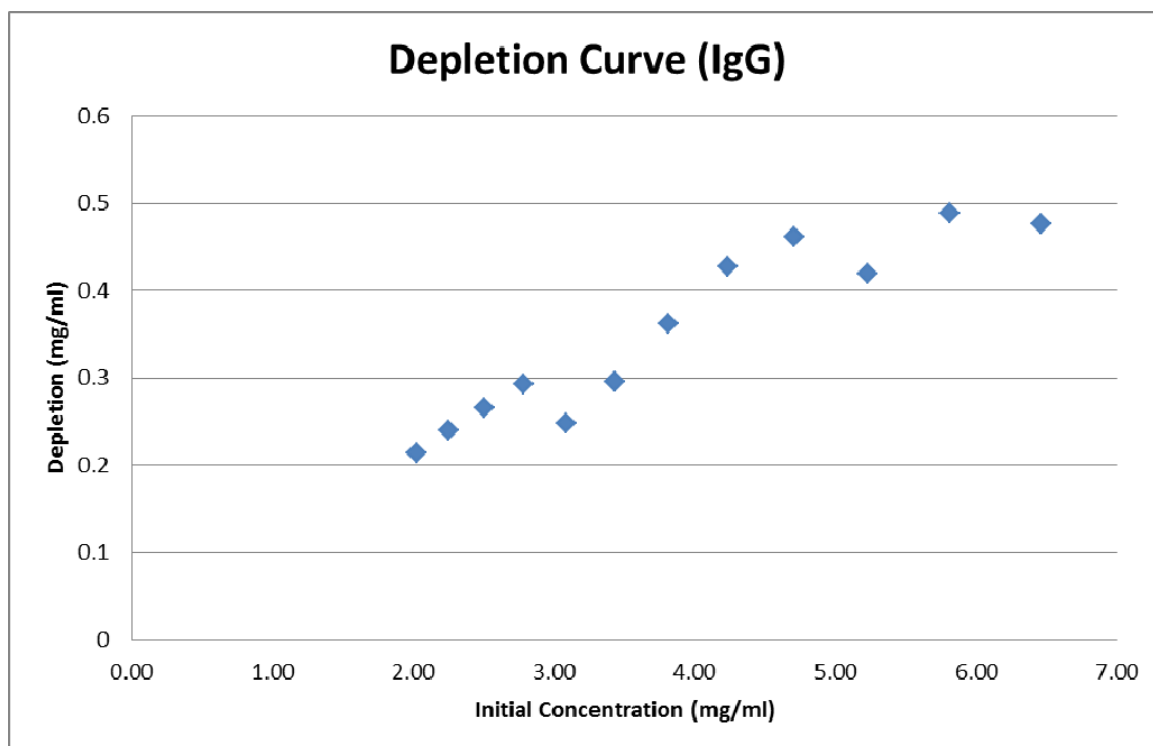
กราฟที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน IgG



ตารางที่ 4 แสดงค่าการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายโปรตีน IgG กับ OS

protein (mg/ml)	OS (ul)	Protein (ul)	Sample1	Sample2	Sample3	Sample (AV)	protein in solution	protein absorb
15.00	10	100	15.621	15.613	16.883	16.039	13.54390837	1.46
13.50	10	100	13.932	14.047	14.203	14.061	11.8272012	1.67
12.15	10	100	12.294	12.473	12.553	12.440	10.42086081	1.73
10.94	10	100	11.272	11.498	11.424	11.398	9.516660882	1.42
9.84	10	100	10.505	10.565	10.653	10.574	8.801920629	1.04
8.86	10	100	9.628	9.866	9.672	9.722	8.062304755	0.80
7.97	10	100	8.779	8.936	8.827	8.847	7.303309036	0.67
7.17	10	100	7.929	8.000	7.916	7.948	6.523197964	0.65
6.46	10	100	7.305	7.352	7.314	7.324	5.981140808	0.48
5.81	10	100	6.540	6.600	6.553	6.564	5.322226079	0.49
5.23	10	100	6.019	5.935	5.972	5.975	4.811118824	0.42
4.71	10	100	5.282	5.332	5.356	5.323	4.245343052	0.46
4.24	10	100	4.665	4.969	4.829	4.821	3.809441166	0.43
3.81	10	100	4.439	4.400	4.385	4.408	3.45105866	0.36
3.43	10	100	4.032	4.081	4.020	4.044	3.135485364	0.30
3.09	10	100	3.686	3.694	3.735	3.705	2.841027421	0.25
2.78	10	100	3.311	3.271	3.309	3.297	2.486983686	0.29
2.50	10	100	2.989	2.997	3.038	3.008	2.236202707	0.27
2.25	10	100	2.690	2.754	2.802	2.749	2.011165105	0.24
2.03	10	100	2.486	2.506	2.565	2.519	1.811870878	0.21
1.82	10	100	2.236	2.263	2.386	2.295	1.617493926	0.21
1.64	10	100	2.018	2.079	2.057	2.051	1.40605114	0.24
1.48	10	100	1.824	1.870	1.826	1.840	1.222665741	0.25
1.33	10	100	1.661	1.681	1.685	1.676	1.080064792	0.25
1.20	10	100	1.464	1.458	1.462	1.461	0.894076131	0.30
1.08	10	100	1.358	1.375	1.365	1.366	0.811350226	0.27
0.97	10	100	1.215	1.195	1.213	1.208	0.673955802	0.30
0.87	10	100	1.103	1.129	1.099	1.110	0.589494389	0.28
0.79	10	100	0.982	1.005	0.998	0.995	0.489413398	0.30
0.71	10	100	0.874	0.909	0.874	0.886	0.394538933	0.31

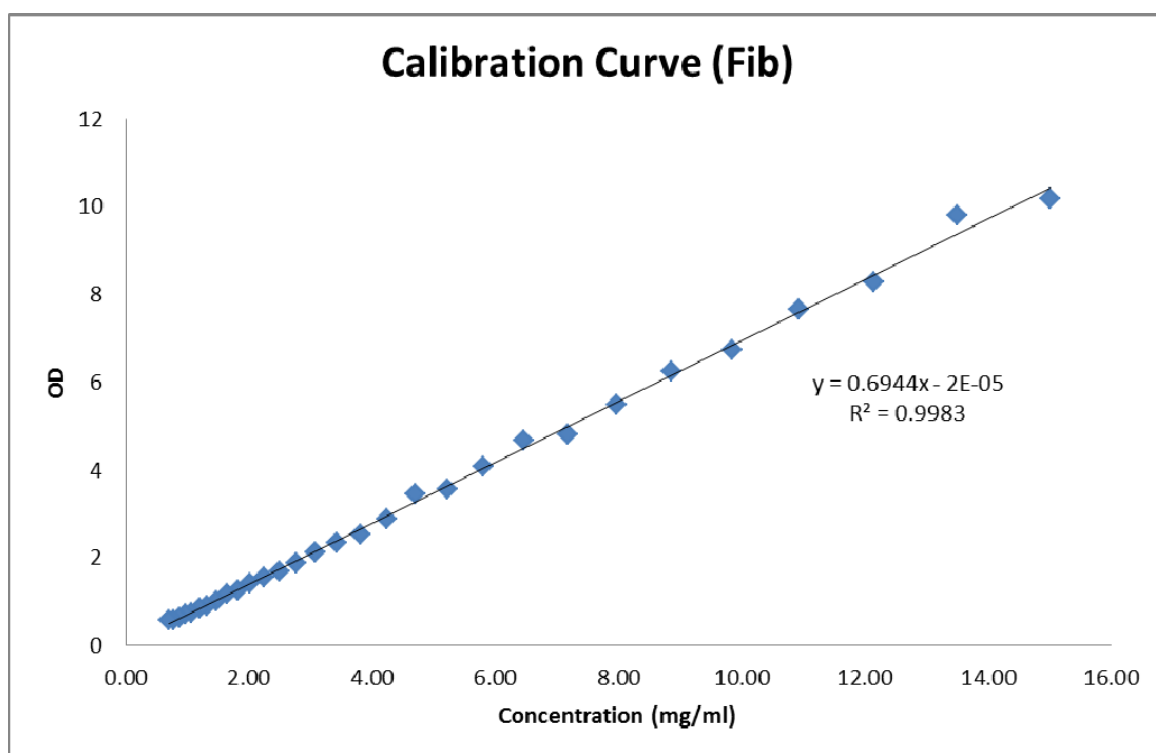
กราฟที่ 4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (IgG) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน



ตารางที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (Fib) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง

protein (mg/ml)	Standard1	Standard2	Standard3	standard (AV)
15.00	10.022	10.038	10.086	10.049
13.50	9.758	9.238	10.037	9.678
12.15	8.154	8.168	8.164	8.162
10.94	7.613	7.430	7.546	7.530
9.84	6.710	6.498	6.658	6.622
8.86	6.022	6.163	6.147	6.111
7.97	5.325	5.380	5.348	5.351
7.17	4.752	4.606	4.731	4.696
6.46	4.463	4.503	4.644	4.537
5.81	3.892	4.007	3.925	3.941
5.23	3.502	3.407	3.404	3.438
4.71	3.391	3.179	3.377	3.316
4.24	2.750	2.751	2.776	2.759
3.81	2.407	2.388	2.397	2.397
3.43	2.231	2.197	2.226	2.218
3.09	2.012	1.995	2.004	2.004
2.78	1.796	1.740	1.743	1.760
2.50	1.568	1.586	1.563	1.572
2.25	1.420	1.428	1.419	1.422
2.03	1.299	1.267	1.290	1.285
1.82	1.090	1.146	1.152	1.129
1.64	1.003	1.069	1.067	1.046
1.48	0.891	0.902	0.894	0.896
1.33	0.771	0.790	0.778	0.780
1.20	0.709	0.706	0.711	0.709
1.08	0.615	0.626	0.618	0.620
0.97	0.579	0.601	0.591	0.590
0.87	0.485	0.504	0.502	0.497
0.79	0.449	0.443	0.430	0.441
0.71	0.436	0.441	0.440	0.439

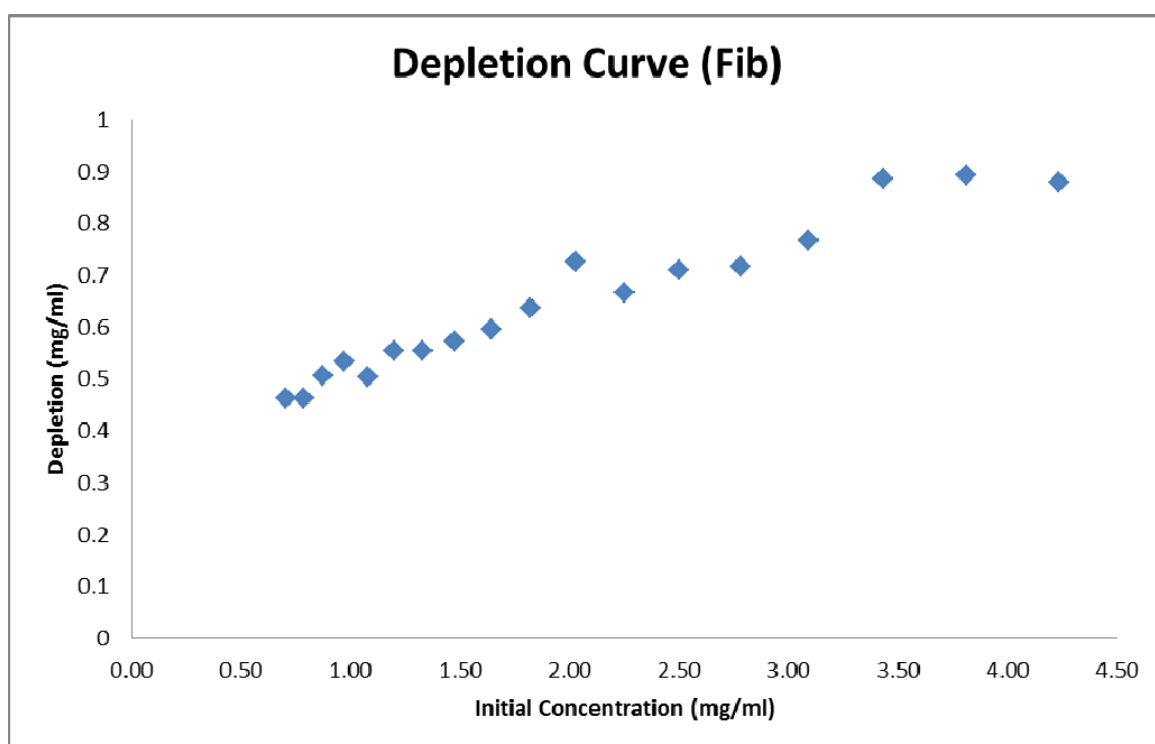
กราฟที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Fib



ตารางที่ 6 แสดงค่าการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายโปรตีน Fib กับ OS

protein (mg/ml)	OS (ul)	Protein (ul)	Sample1	Sample2	Sample3	Sample (AV)	protein in solution	protein absorb
15.00	10	100	8.951	8.974	9.044	8.990	12.76579301	2.23
13.50	10	100	8.010	8.025	8.048	8.028	11.38042435	2.12
12.15	10	100	7.211	7.211	7.248	7.223	10.22211022	1.93
10.94	10	100	6.463	6.624	6.467	6.518	9.206365207	1.73
9.84	10	100	5.876	5.949	5.898	5.908	8.327428955	1.51
8.86	10	100	5.299	5.304	5.273	5.292	7.440812212	1.42
7.97	10	100	4.790	4.804	4.835	4.810	6.746207757	1.23
7.17	10	100	4.203	4.125	4.240	4.189	5.852870584	1.32
6.46	10	100	3.816	3.828	3.733	3.792	5.281153994	1.18
5.81	10	100	3.494	3.449	3.420	3.454	4.794402842	1.02
5.23	10	100	3.039	3.029	3.057	3.042	4.200124808	1.03
4.71	10	100	2.686	2.764	2.757	2.736	3.759456605	0.95
4.24	10	100	2.461	2.420	2.486	2.456	3.356230799	0.88
3.81	10	100	2.185	2.156	2.118	2.153	2.920362903	0.89
3.43	10	100	1.909	1.911	1.857	1.892	2.544978879	0.89
3.09	10	100	1.745	1.741	1.724	1.737	2.320804531	0.77
2.78	10	100	1.524	1.522	1.626	1.557	2.062548003	0.72
2.50	10	100	1.374	1.373	1.359	1.369	1.790850614	0.71
2.25	10	100	1.237	1.216	1.222	1.225	1.583957373	0.67
2.03	10	100	1.079	1.023	0.984	1.029	1.301219278	0.73
1.82	10	100	0.945	0.969	0.932	0.949	1.186011905	0.64
1.64	10	100	0.829	0.883	0.843	0.852	1.046322965	0.59
1.48	10	100	0.761	0.761	0.739	0.754	0.905193932	0.57
1.33	10	100	0.680	0.678	0.634	0.664	0.776065668	0.55
1.20	10	100	0.584	0.555	0.574	0.571	0.642137097	0.55
1.08	10	100	0.540	0.517	0.512	0.523	0.573012673	0.50
0.97	10	100	0.428	0.425	0.430	0.428	0.435723886	0.53
0.87	10	100	0.385	0.379	0.374	0.379	0.366119432	0.51
0.79	10	100	0.365	0.346	0.336	0.349	0.322436636	0.46
0.71	10	100	0.298	0.290	0.296	0.295	0.244191628	0.46

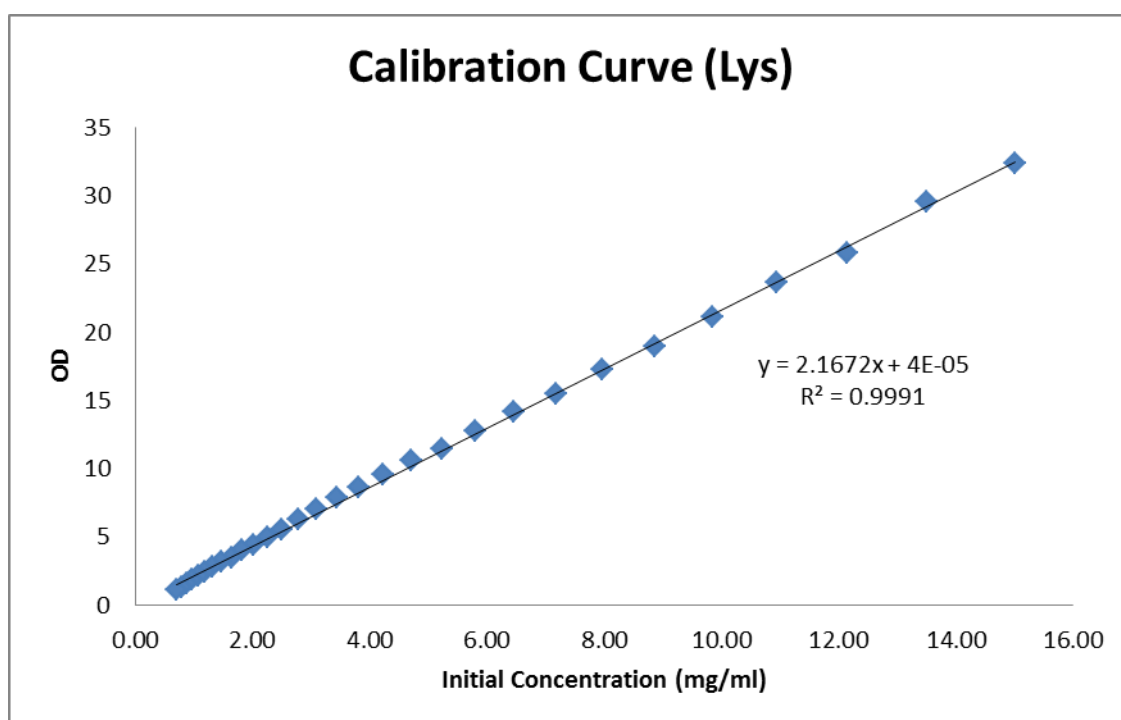
กราฟที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Fib) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน



ตารางที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ของค่าความเข้มข้นของโปรตีน (Lys) กับปริมาณการส่องผ่านของแสง

protein (mg/ml)	Standard1	Standard2	Standard3	standard (AV)
15.00	33.052	33.060	32.971	33.028
13.50	30.072	30.470	30.283	30.275
12.15	26.339	26.551	26.459	26.450
10.94	24.044	24.461	24.363	24.289
9.84	21.576	21.937	21.877	21.797
8.86	19.665	19.582	19.731	19.659
7.97	17.966	17.963	17.887	17.939
7.17	16.014	16.271	16.245	16.177
6.46	14.676	14.948	14.952	14.859
5.81	13.443	13.432	13.414	13.430
5.23	12.024	12.171	12.185	12.127
4.71	11.276	11.370	11.294	11.313
4.24	10.201	10.166	10.254	10.207
3.81	9.300	9.250	9.293	9.281
3.43	8.472	8.507	8.543	8.507
3.09	7.709	7.708	7.733	7.717
2.78	6.920	6.905	6.916	6.914
2.50	6.188	6.201	6.199	6.196
2.25	5.668	5.672	5.701	5.680
2.03	5.041	5.134	5.128	5.101
1.82	4.614	4.743	4.703	4.687
1.64	4.142	4.153	4.159	4.151
1.48	3.809	3.825	3.795	3.810
1.33	3.399	3.447	3.457	3.434
1.20	3.120	3.099	3.156	3.125
1.08	2.738	2.899	2.851	2.829
0.97	2.501	2.518	2.578	2.532
0.87	2.199	2.238	2.260	2.232
0.79	2.001	1.980	2.008	1.996
0.71	1.773	1.716	1.763	1.751

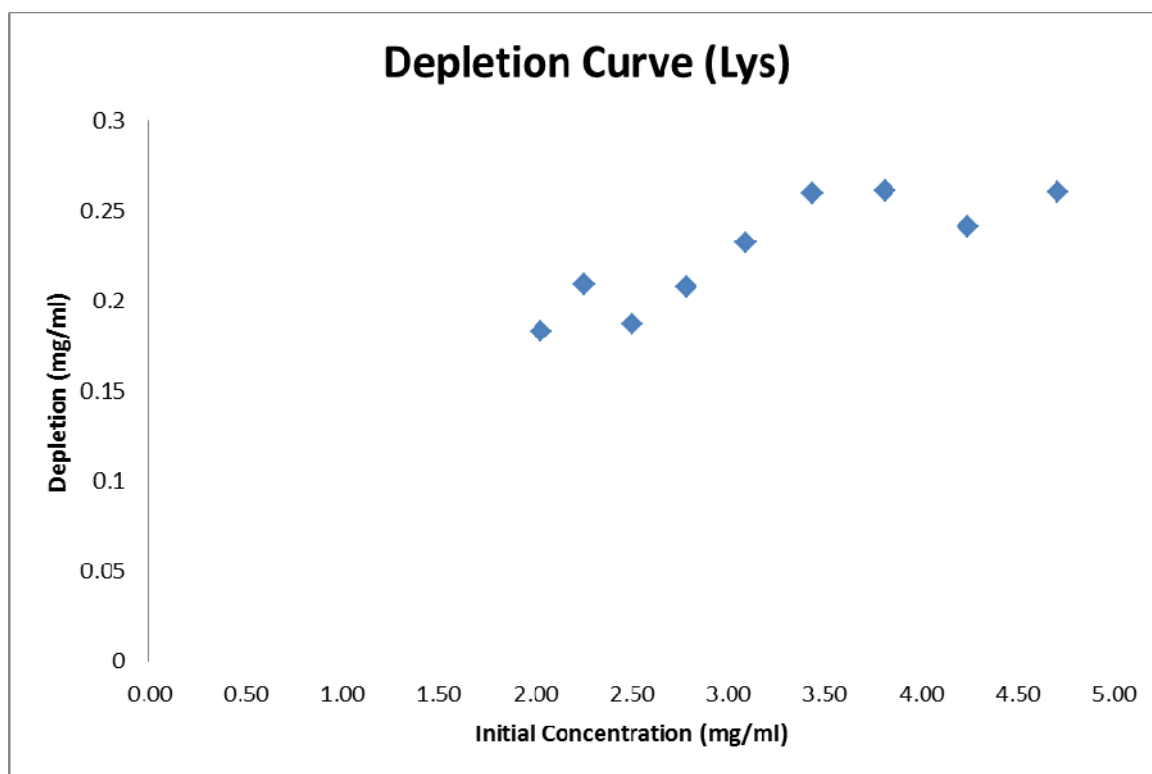
กราฟที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกับค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน Lys



ตารางที่ 8 แสดงค่าการดูดซับของโปรตีนที่ค่าความเข้มข้นต่างๆ กันของสารละลายโปรตีน Lys กับ OS

protein (mg/ml)	OS (ul)	Protein (ul)	Sample1	Sample2	Sample3	Sample (AV)	protein in solution	protein absorb
15.00	10	100	30.116	30.188	30.149	30.151	13.60188261	1.40
13.50	10	100	26.132	26.477	26.388	26.332	11.8398548	1.66
12.15	10	100	24.247	24.378	24.716	24.447	10.9699151	1.18
10.94	10	100	22.071	22.958	22.411	22.480	10.06229236	0.87
9.84	10	100	19.724	19.671	20.012	19.802	8.826750338	1.01
8.86	10	100	17.896	18.262	18.530	18.229	8.100929002	0.76
7.97	10	100	16.909	16.134	16.066	16.370	7.242832534	0.73
7.17	10	100	15.356	14.717	16.213	15.429	6.808631721	0.37
6.46	10	100	13.683	13.208	13.270	13.387	5.866555925	0.59
5.81	10	100	12.086	12.024	12.164	12.091	5.268703088	0.54
5.23	10	100	11.251	11.097	11.016	11.121	4.821120955	0.41
4.71	10	100	10.234	10.327	10.371	10.311	4.447059185	0.26
4.24	10	100	9.432	9.357	9.207	9.332	3.995478036	0.24
3.81	10	100	8.244	8.387	8.478	8.370	3.551433493	0.26
3.43	10	100	7.520	7.547	7.575	7.547	3.171988434	0.26
3.09	10	100	6.834	6.892	6.861	6.862	2.855912391	0.23
2.78	10	100	6.232	6.267	6.243	6.247	2.57213609	0.21
2.50	10	100	5.661	5.663	5.743	5.689	2.314507198	0.19
2.25	10	100	5.067	5.135	5.095	5.099	2.042266519	0.21
2.03	10	100	4.662	4.674	4.668	4.668	1.843392396	0.18
1.82	10	100	4.212	4.207	4.219	4.213	1.633290267	0.19
1.64	10	100	3.803	3.786	3.825	3.805	1.445028916	0.20
1.48	10	100	3.434	3.445	3.438	3.439	1.276301218	0.20
1.33	10	100	3.094	3.098	3.106	3.099	1.119570567	0.21
1.20	10	100	2.766	2.786	2.811	2.788	0.975759813	0.22
1.08	10	100	2.513	2.515	2.533	2.520	0.852405562	0.22
0.97	10	100	2.292	2.290	2.296	2.293	0.747354497	0.22
0.87	10	100	2.048	2.061	2.043	2.051	0.635689676	0.24
0.79	10	100	1.838	1.861	1.840	1.846	0.541405193	0.24
0.71	10	100	1.639	1.614	1.670	1.641	0.446659284	0.26

กราฟที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเข้มข้นของสารละลายโปรตีน (Lys) บนพื้นผิวกับค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารละลายโปรตีน



จากข้อมูลในตารางและกราฟข้างต้นทำให้สามารถหาค่าความเข้มข้นอิ่มตัวของโปรตีนแต่ละชนิดได้ดังตารางที่ 9

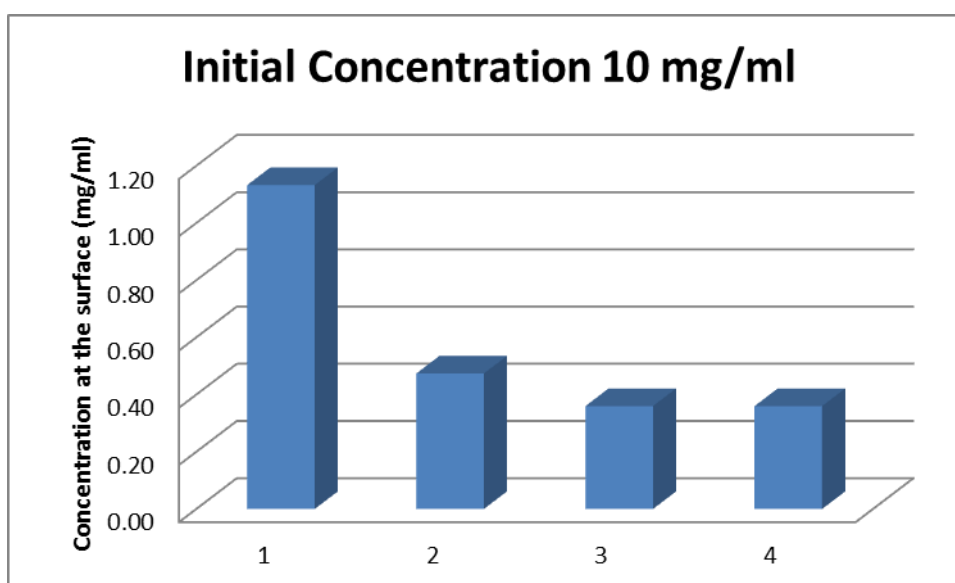
ตารางที่ 9 แสดงค่าความเข้มข้นอิ่มตัวของโปรตีนแต่ละชนิด

โปรตีน	MW (kDa)	ค่าความเข้มข้นอิ่มตัว (mg/ml)
Albumin (HSA)	66.3	3.21 ± 0.02
IgG	160	4.97 ± 0.03
Fibrinogen (Fib)	340	3.53 ± 0.01
Lysozyme (Lys)	14.3	3.54 ± 0.01
Alpha Macglobulin (α -mac)	725	-

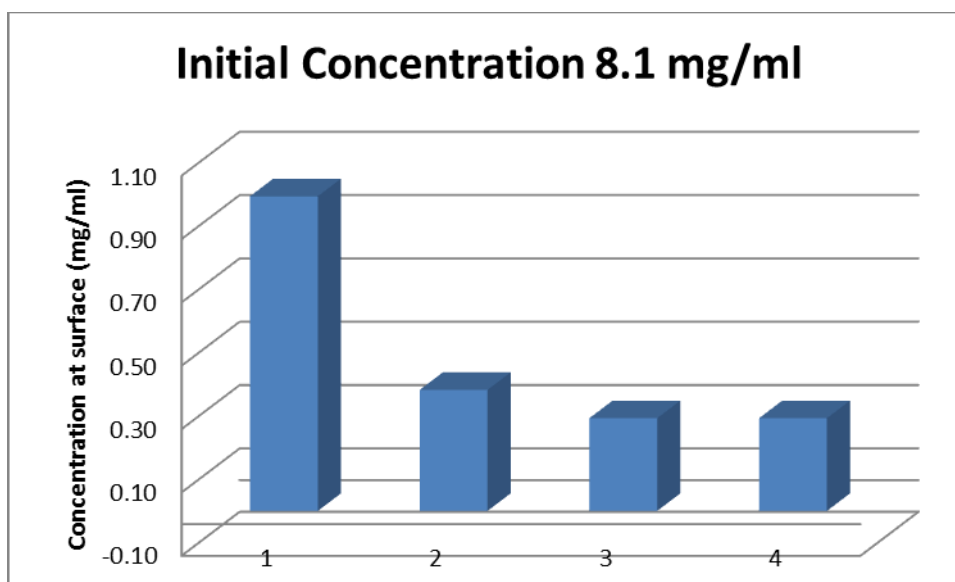
จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นข้อมูลให้ผู้วิจัยเลือกทำการทดลองการดูดซับของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นในช่วง 0-10 mg/ml ทั้งนี้เนื่องจากการให้ระบบหรือสถานะของการดูดซับมีทั้งในส่วนที่อยู่ในสถานะที่โปรตีนไม่อิ่มตัว อิ่มตัว และมากกว่าระดับที่อิ่มตัว ทั้งนี้เพื่อที่จะสามารถอธิบายปรากฏการณ์การดูดซับของโปรตีนได้อย่างครอบคลุมในทุกๆ สถานะของแต่ละโปรตีน

ในการทดสอบการดูดซับของโปรตีนที่เวลา 1 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณการดูดซับ เทียบกับปริมาณการดูดซับของโปรตีนที่เหลืออยู่บนพื้นผิวหลังจากทำการชะล้างด้วยสารละลาย PBS ครั้งที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ เพื่อหาปริมาณโปรตีนรวมที่หลุดออกเนื่องจากการชะล้างและปริมาณของโปรตีนที่คงเหลือหรือถูกดูดซับอยู่หลังการชะล้างนั้น จะพบลักษณะการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นของโปรตีนแต่ละชนิดในแต่ละความเข้มข้นดังต่อไปนี้

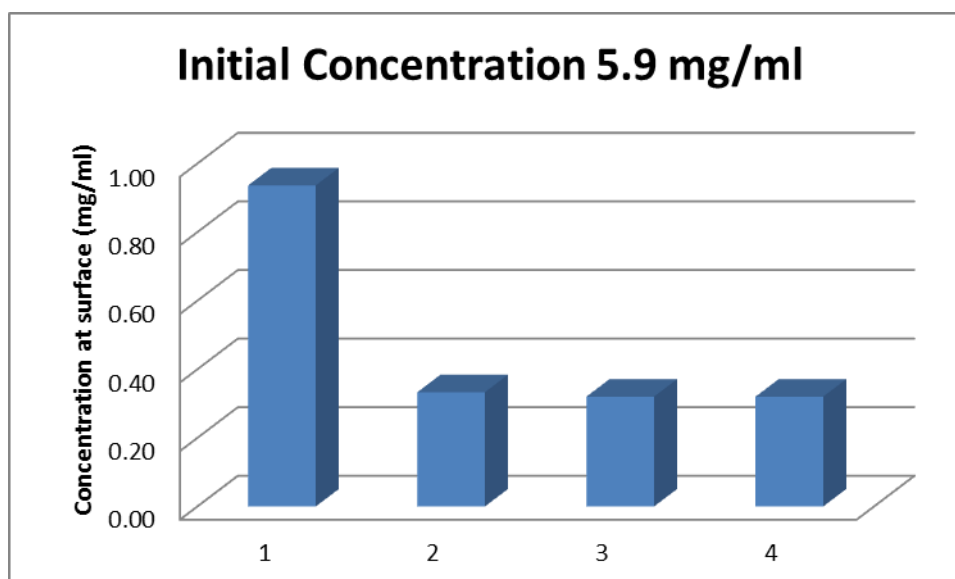
กราฟที่ 9 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่ 1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml



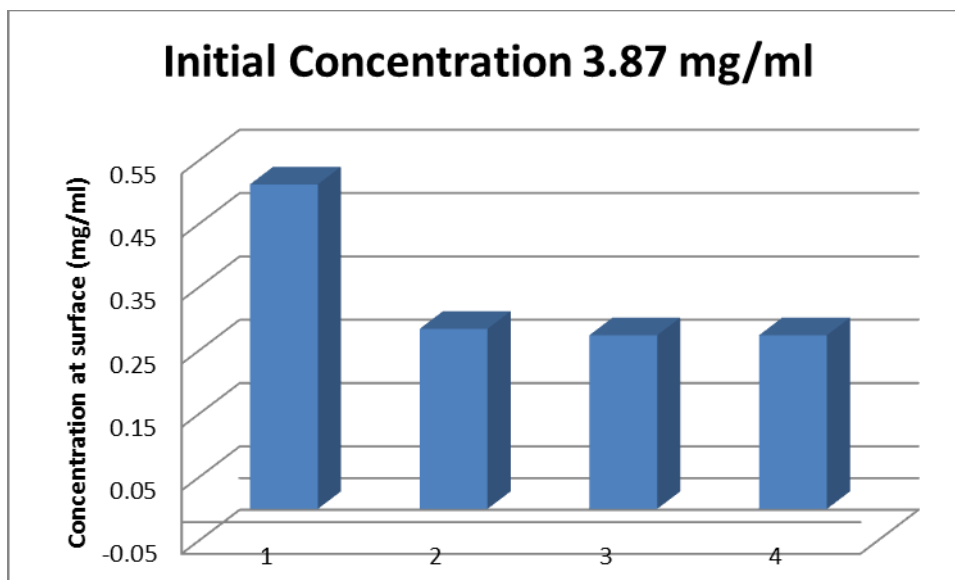
กราฟที่ 10 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.1 mg/ml



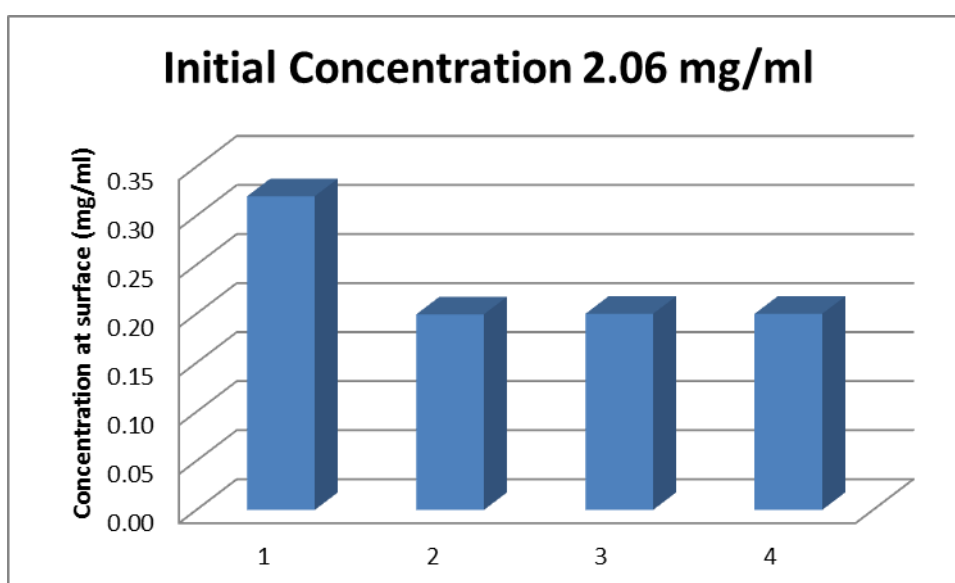
กราฟที่ 11 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 1.9 mg/ml



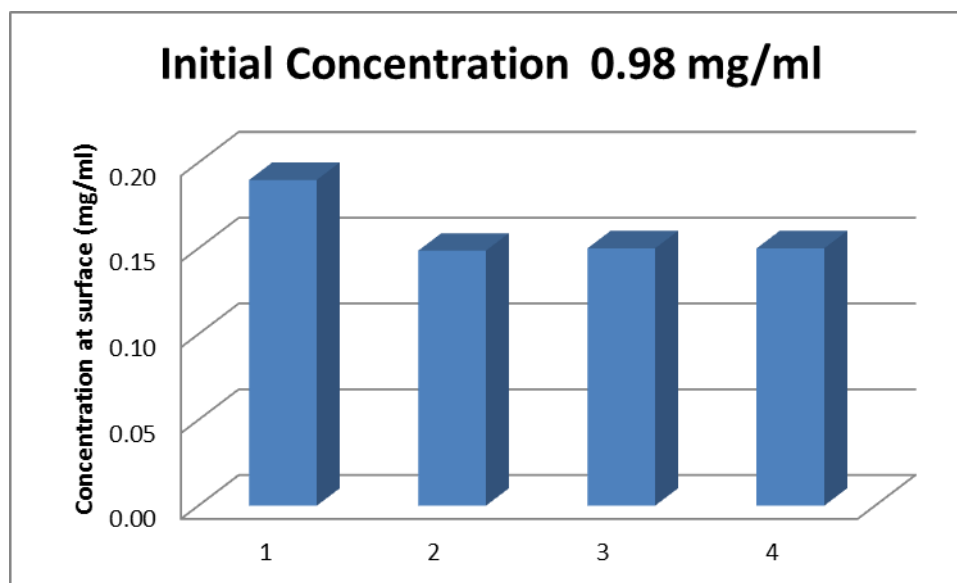
กราฟที่ 12 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87 mg/ml



กราฟที่ 13 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml

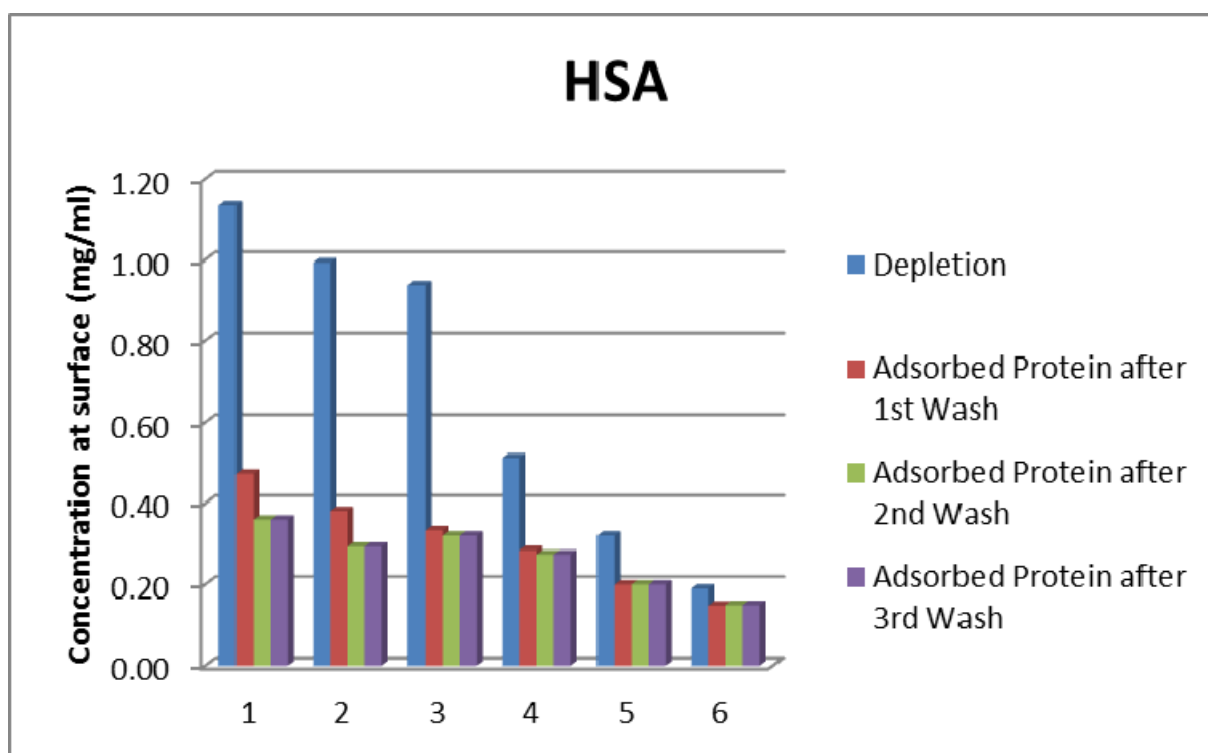


กราฟที่ 14 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (HSA) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml

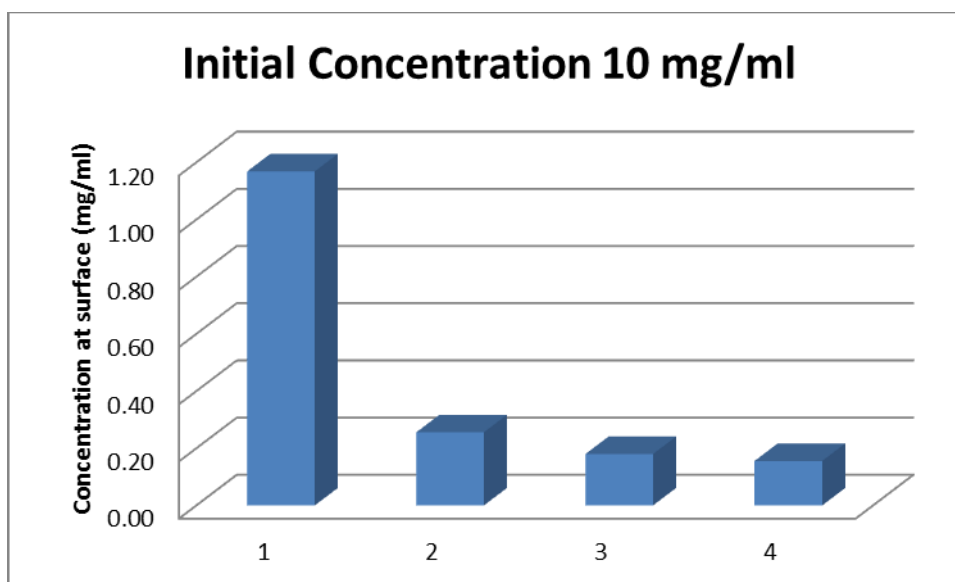


และเมื่อนำผลของข้อมูลข้างต้นทั้งหมดของ HSA มาแสดงด้วยกราฟแท่งเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูการชะล้างแต่ละครั้งจะแสดงได้ดังกราฟที่

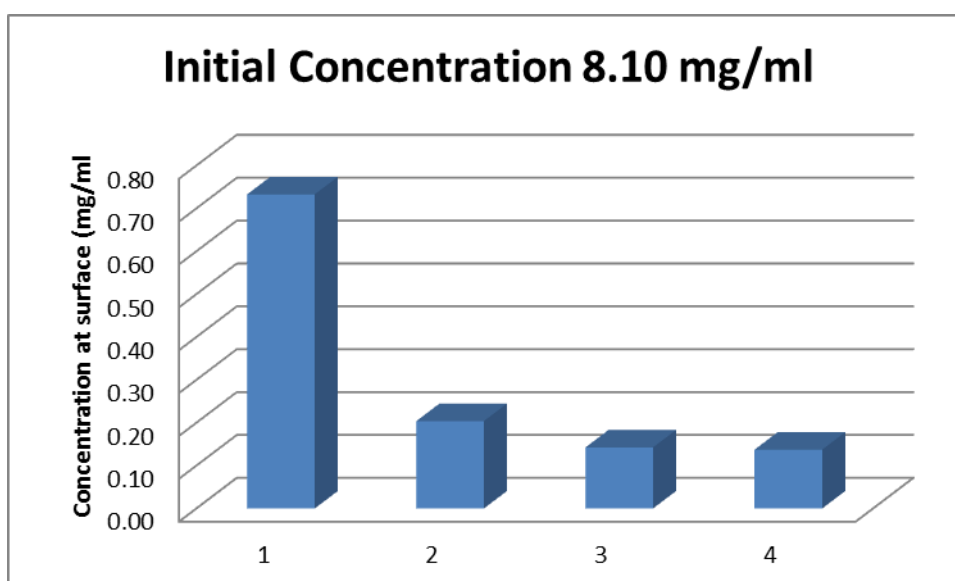
กราฟที่ 15 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ HSA ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06mg/ml และข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)



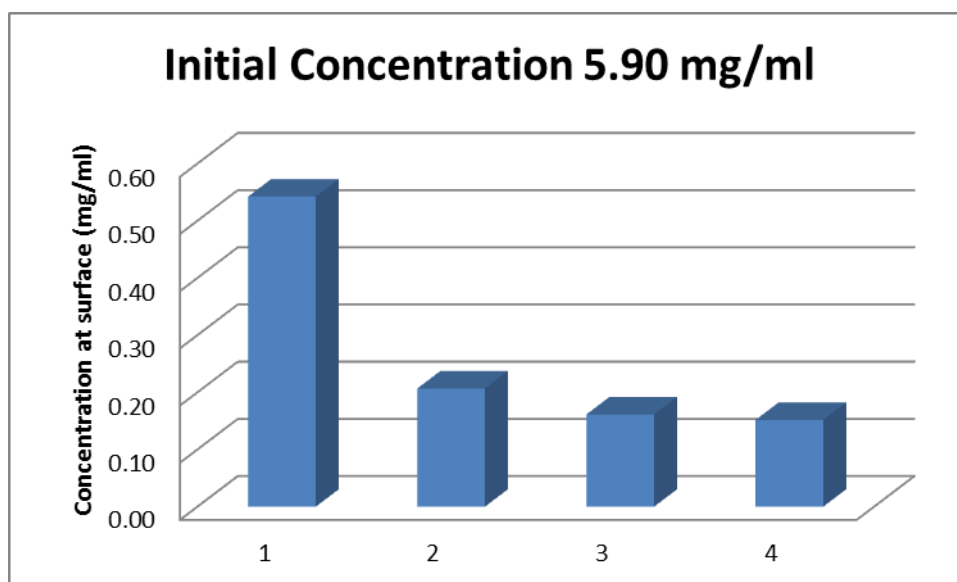
กราฟที่ 16 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml



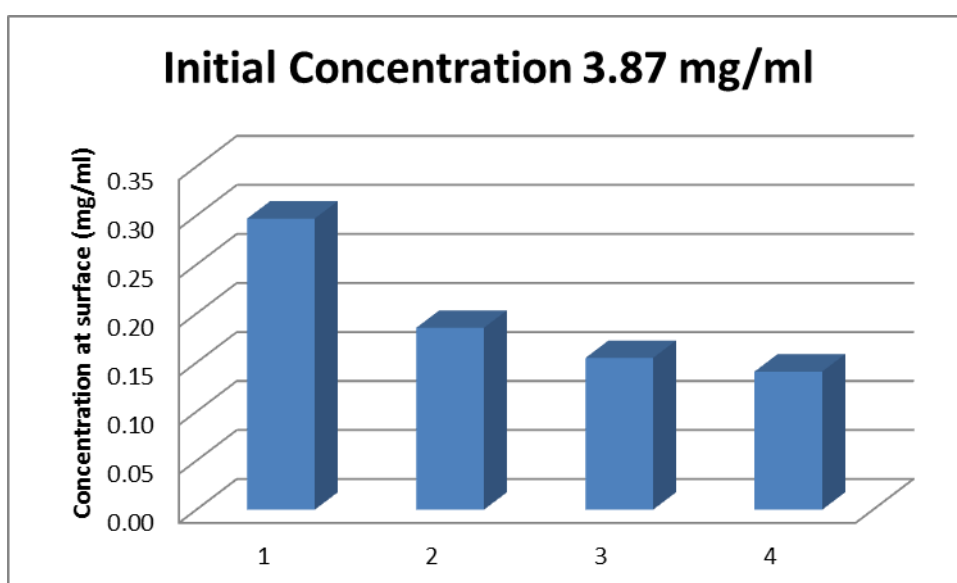
กราฟที่ 17 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.1 mg/ml



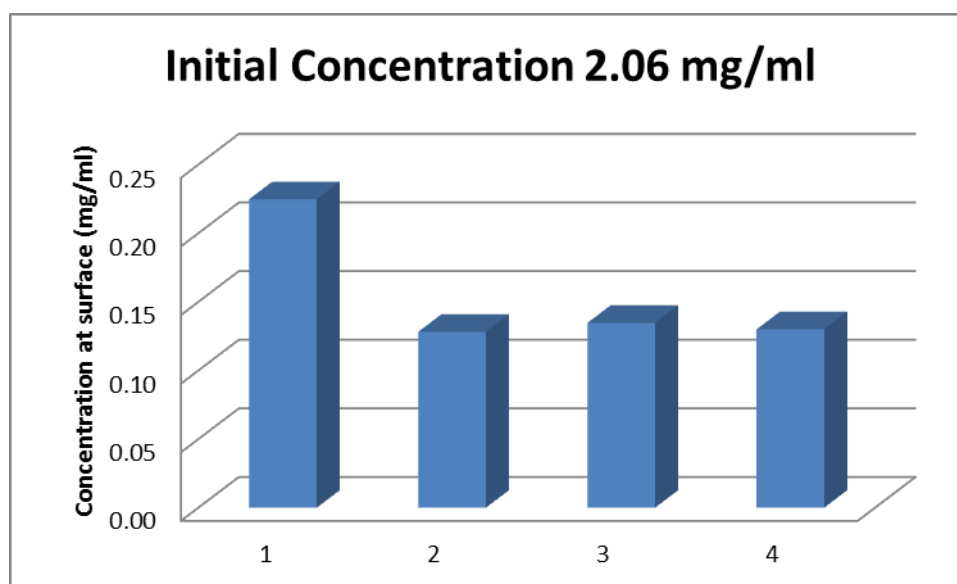
กราฟที่ 18 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.90 mg/ml



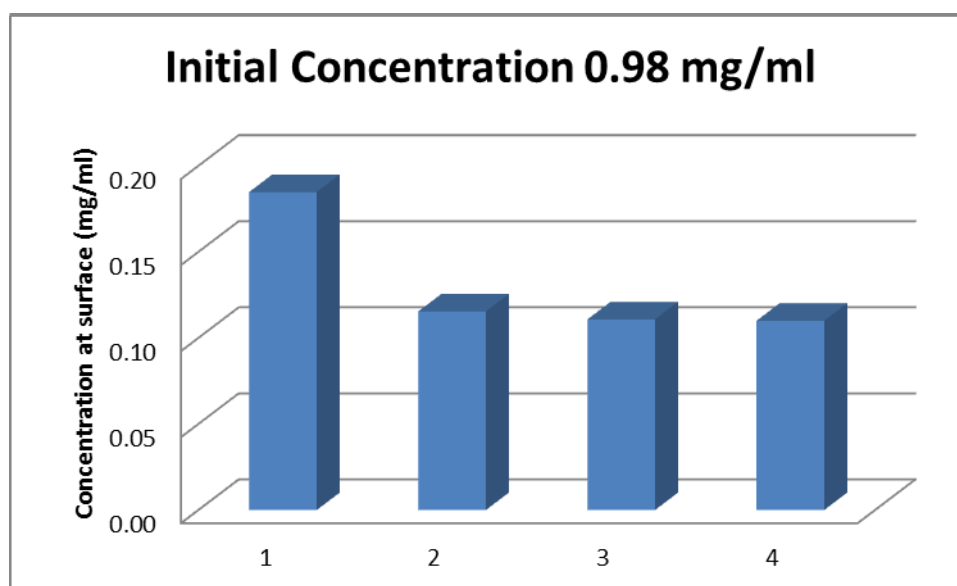
กราฟที่ 19 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87mg/ml



กราฟที่ 20 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml

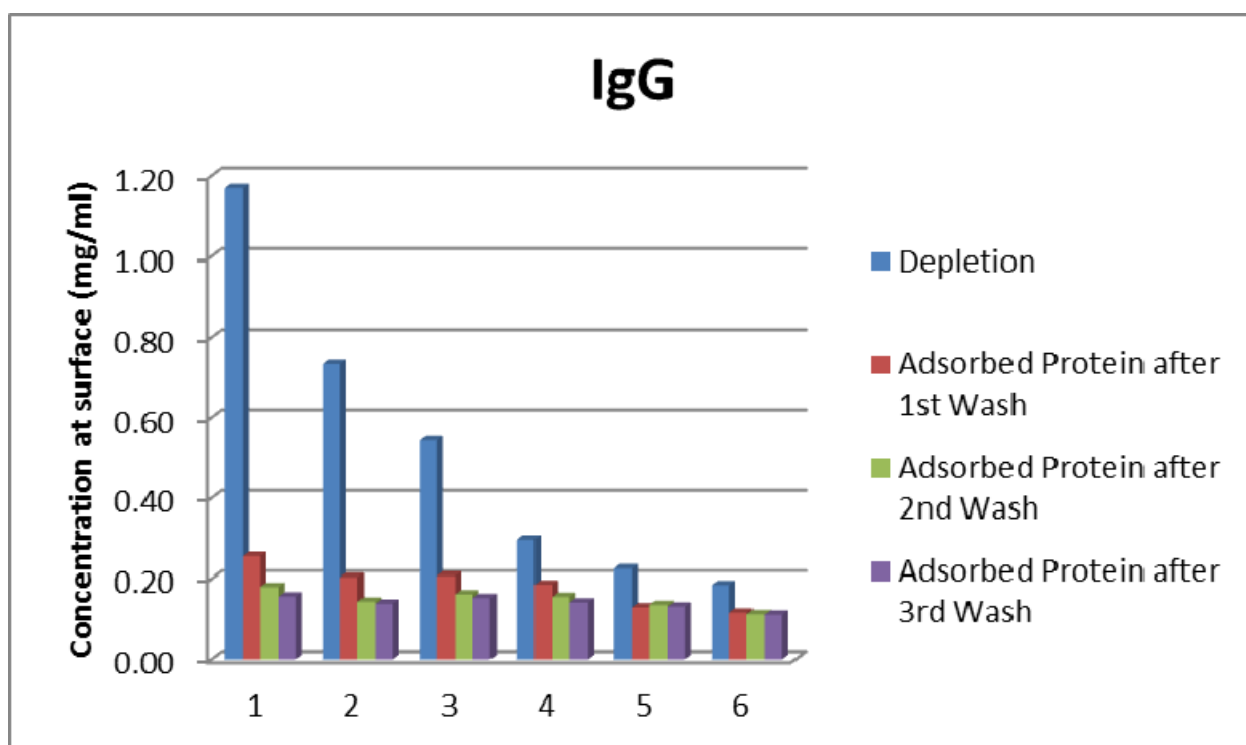


กราฟที่ 21 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (IgG) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml

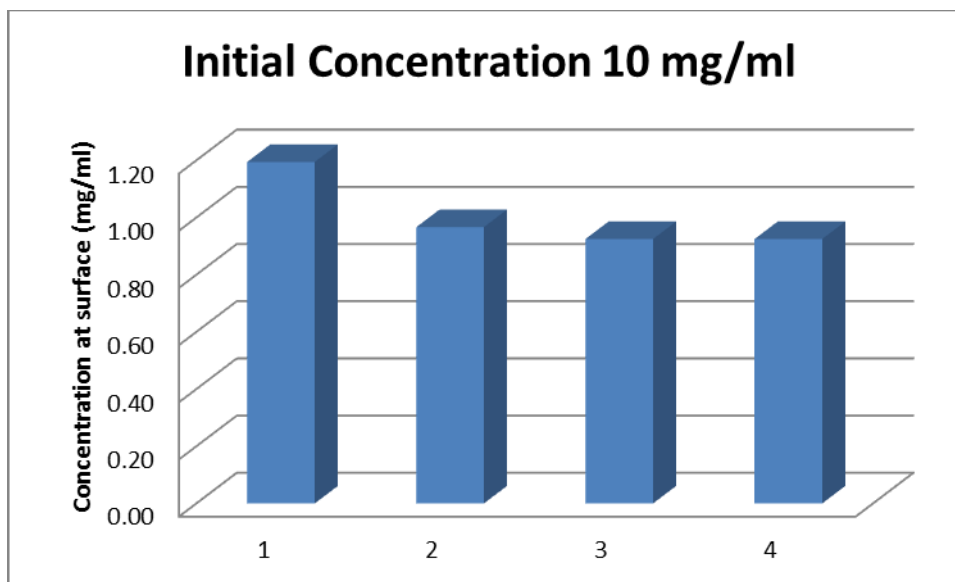


และเมื่อนำผลของข้อมูลข้างต้นทั้งหมดของ IgG มาแสดงด้วยกราฟแท่งเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งจะแสดงได้ดังกราฟที่

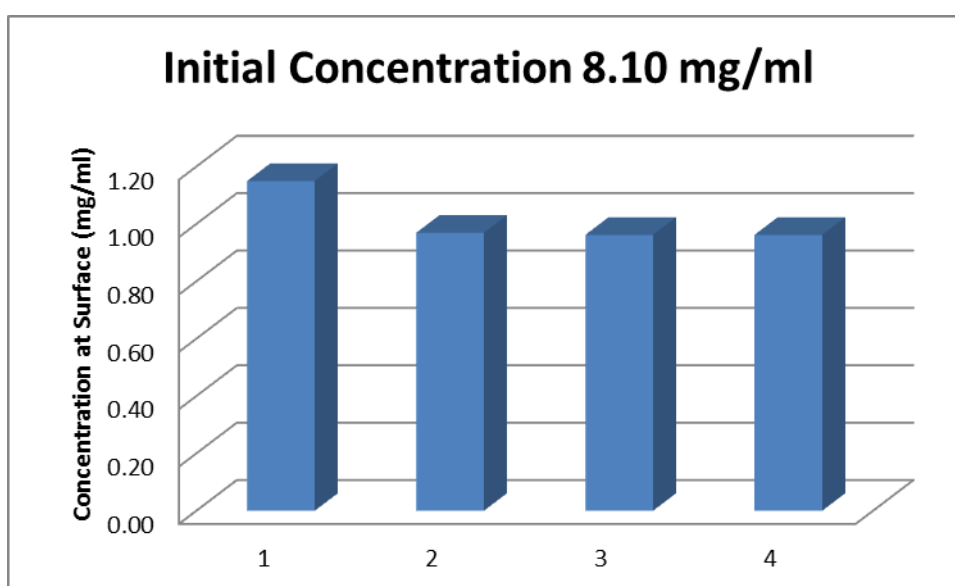
กราฟที่ 22 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ IgG ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06mg/ml และข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)



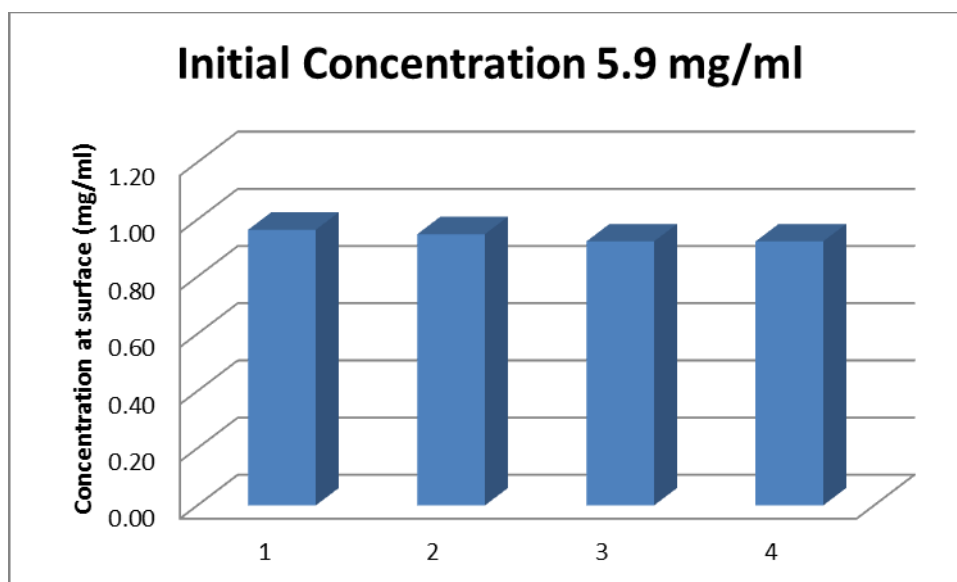
กราฟที่ 23 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Fib) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10 mg/ml



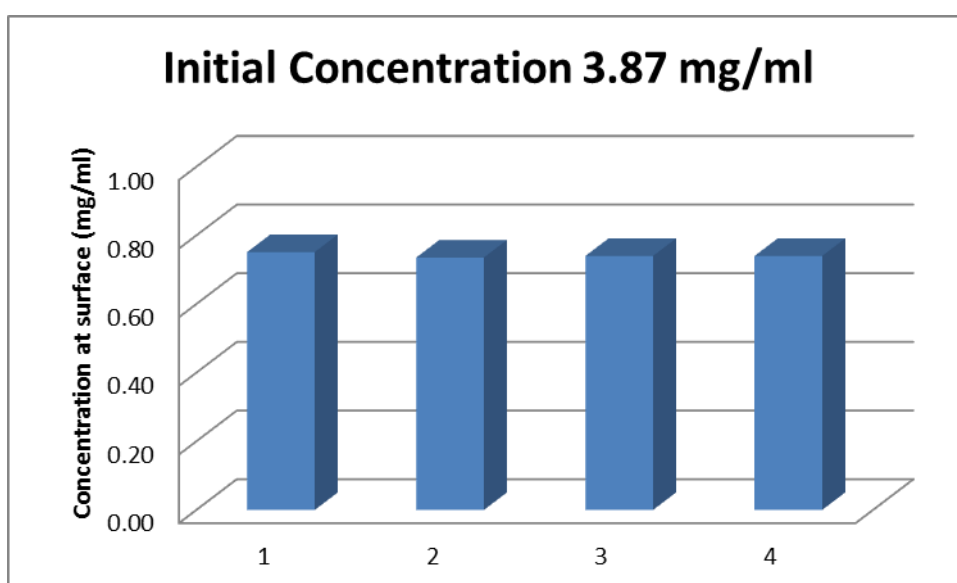
กราฟที่ 24 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Fib) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.10 mg/ml



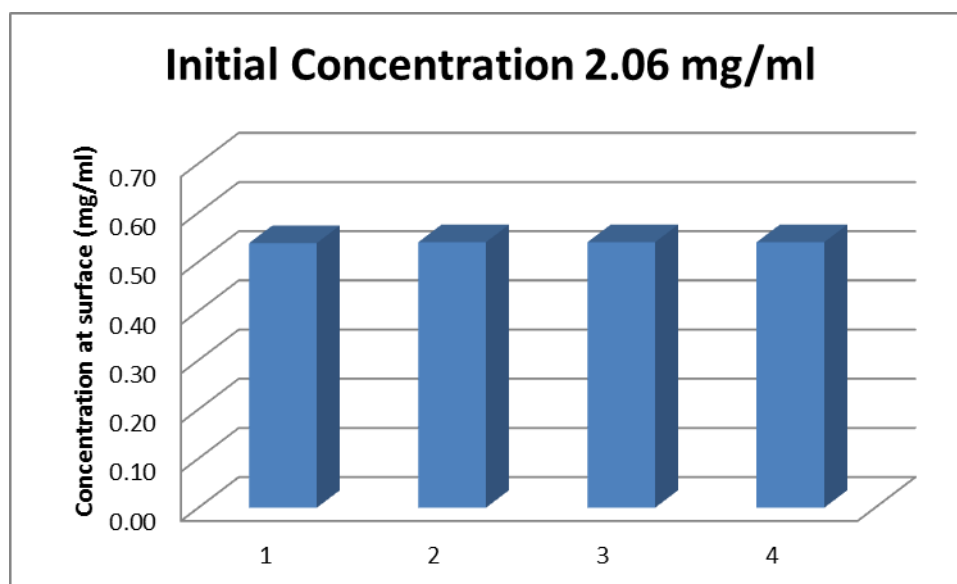
กราฟที่ 25 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Fib) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.90 mg/ml



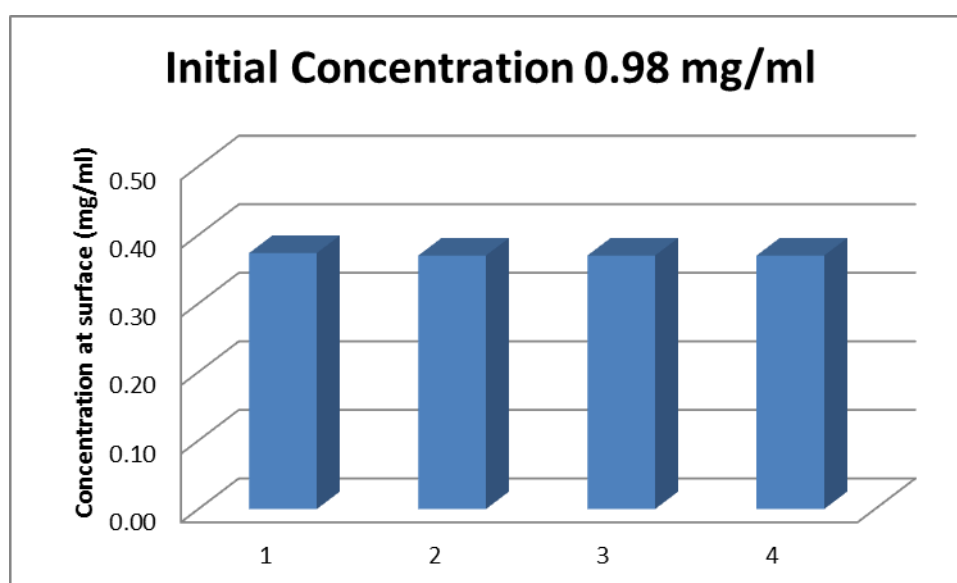
กราฟที่ 26 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Fib) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87 mg/ml



กราฟที่ 27 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Fib) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml

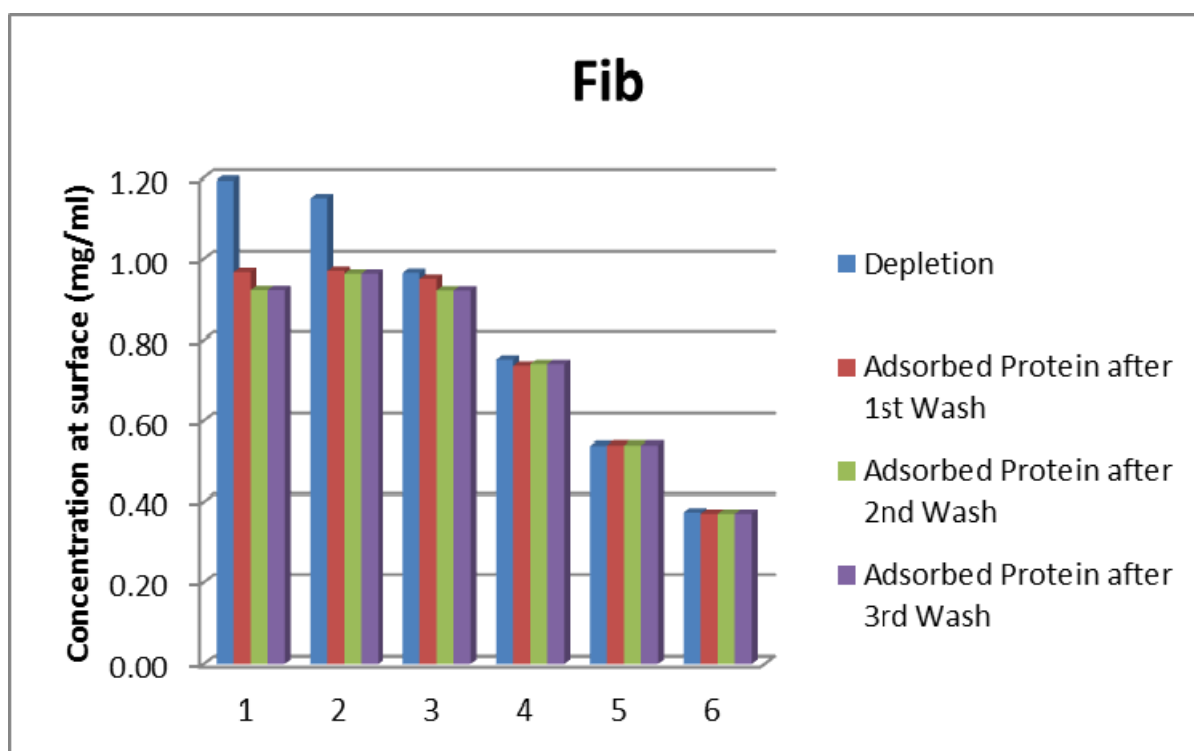


กราฟที่ 28 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Fib) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml

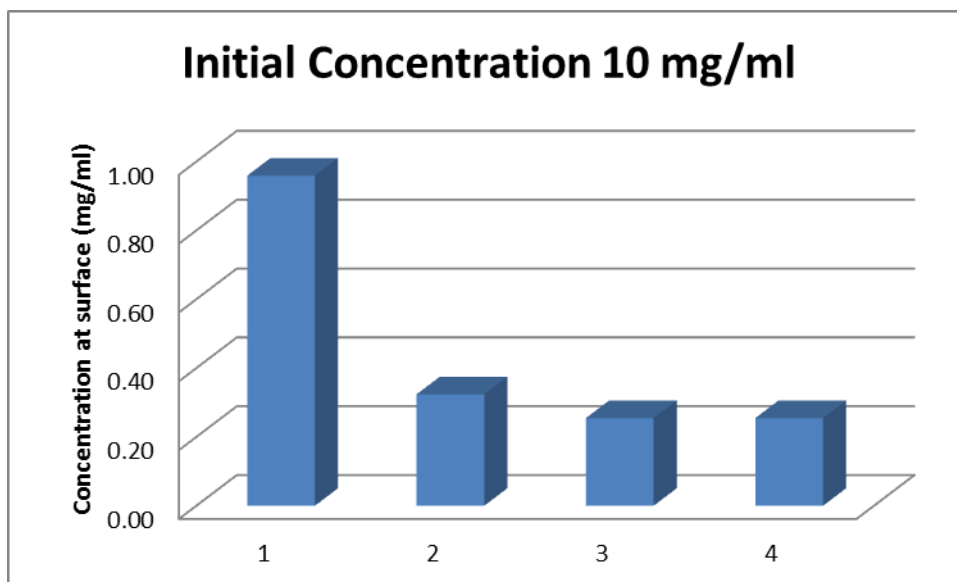


และเมื่อนำผลของข้อมูลข้างต้นทั้งหมดของ Fib มาแสดงด้วยกราฟแท่งเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งจะแสดงได้ดังกราฟที่ 29

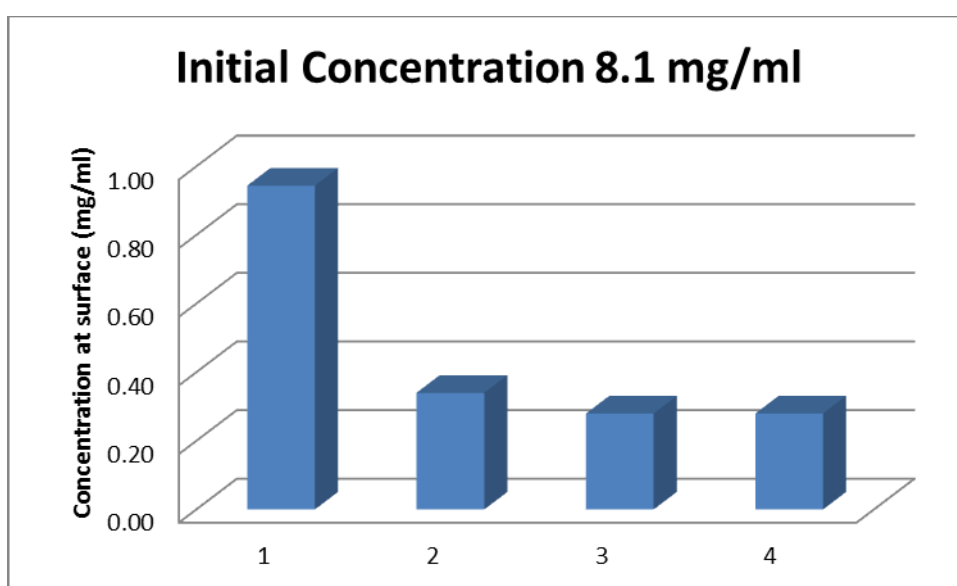
กราฟที่ 29 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ Fib ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06mg/ml และข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)



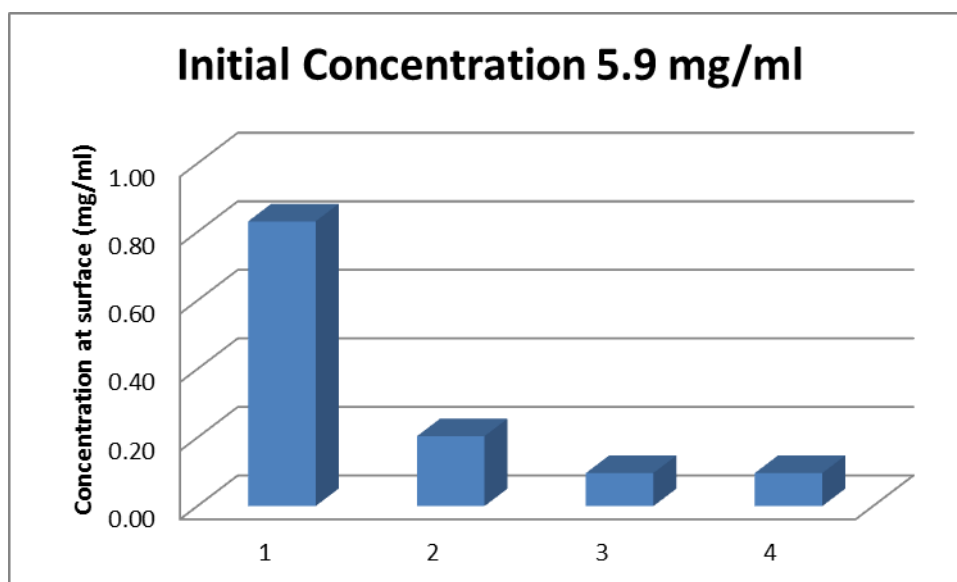
กราฟที่ 30 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10mg/ml



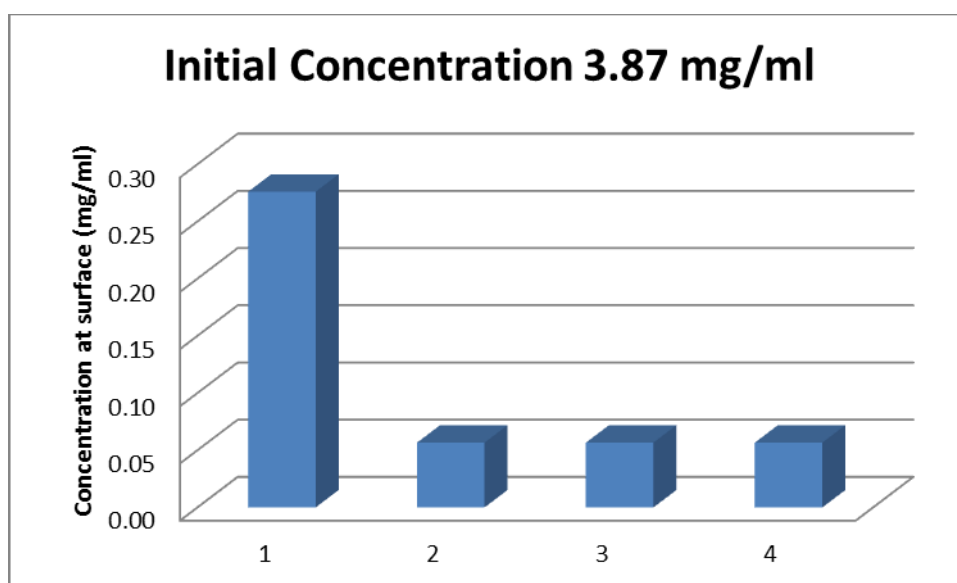
กราฟที่ 31 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.10 mg/ml



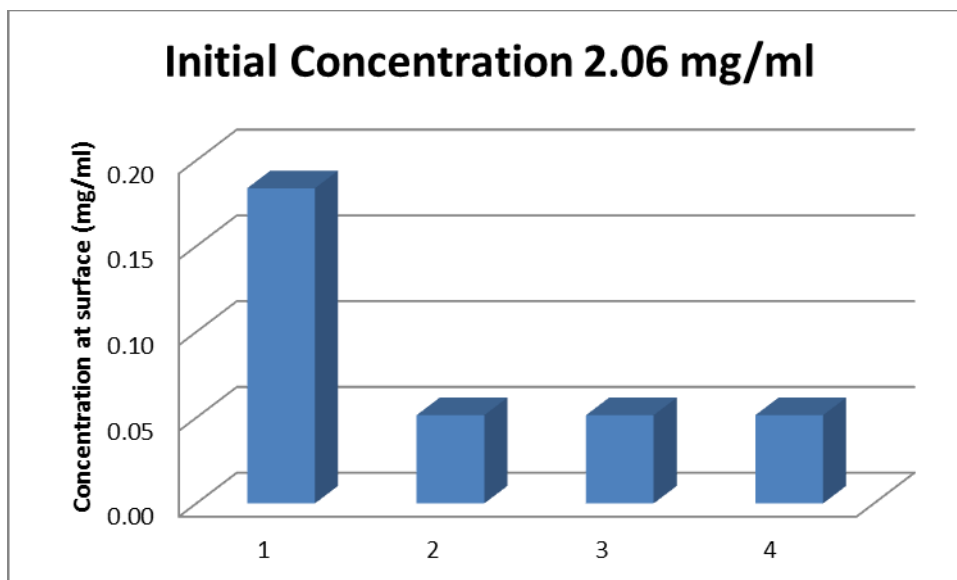
กราฟที่ 32 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.90mg/ml



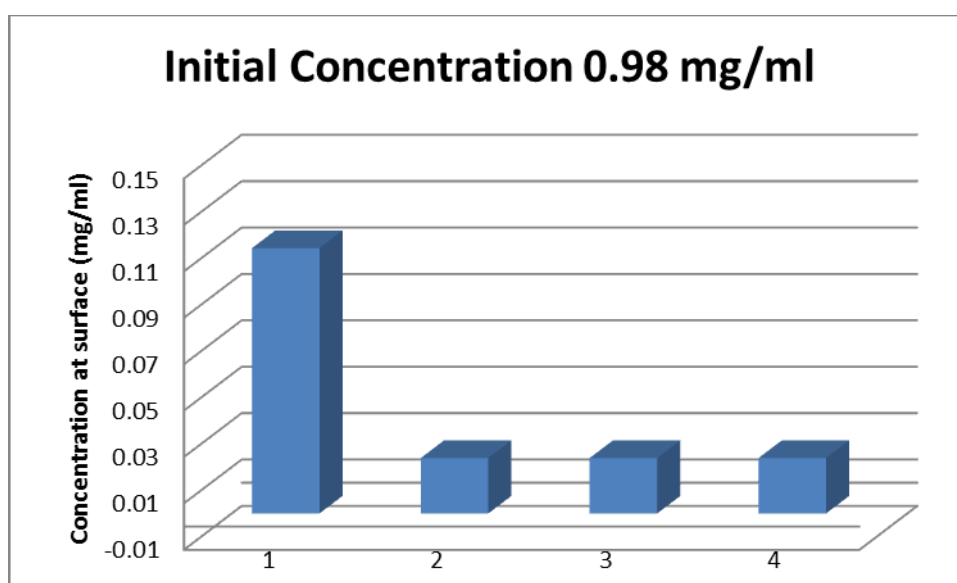
กราฟที่ 33 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87mg/ml



กราฟที่ 34 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml



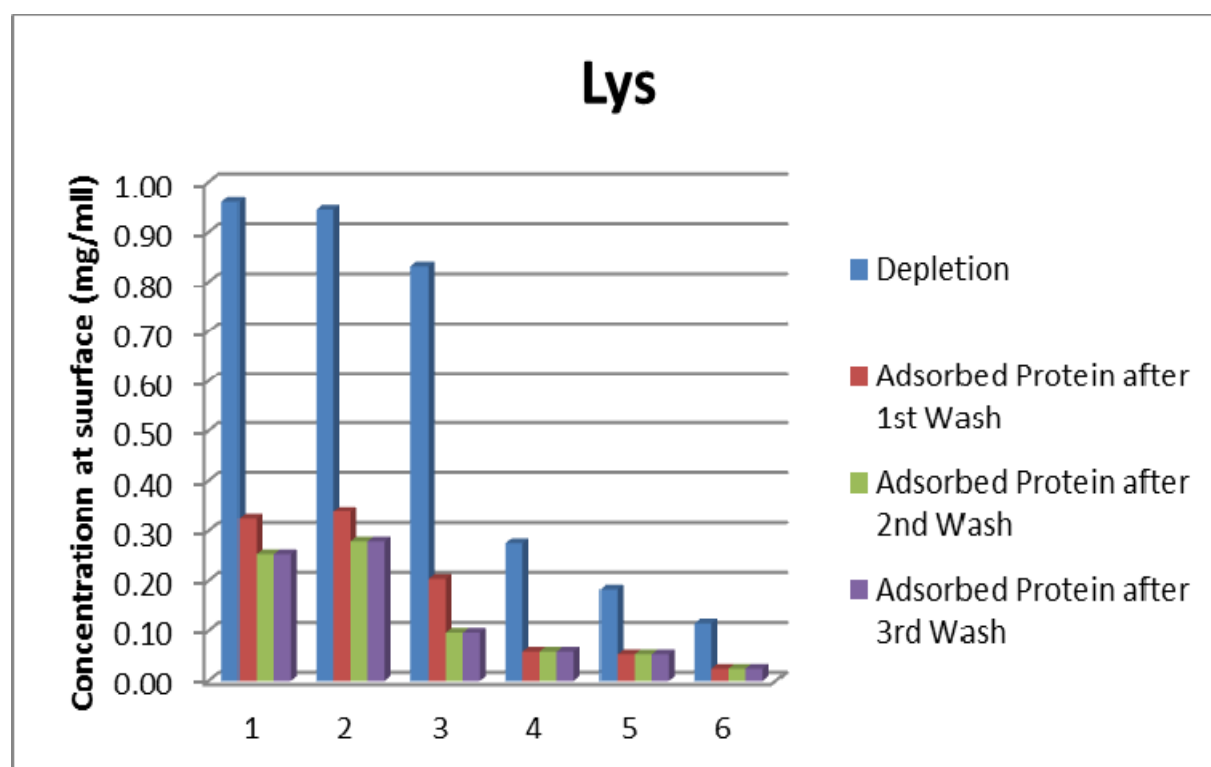
กราฟที่ 35 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (Lys) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml



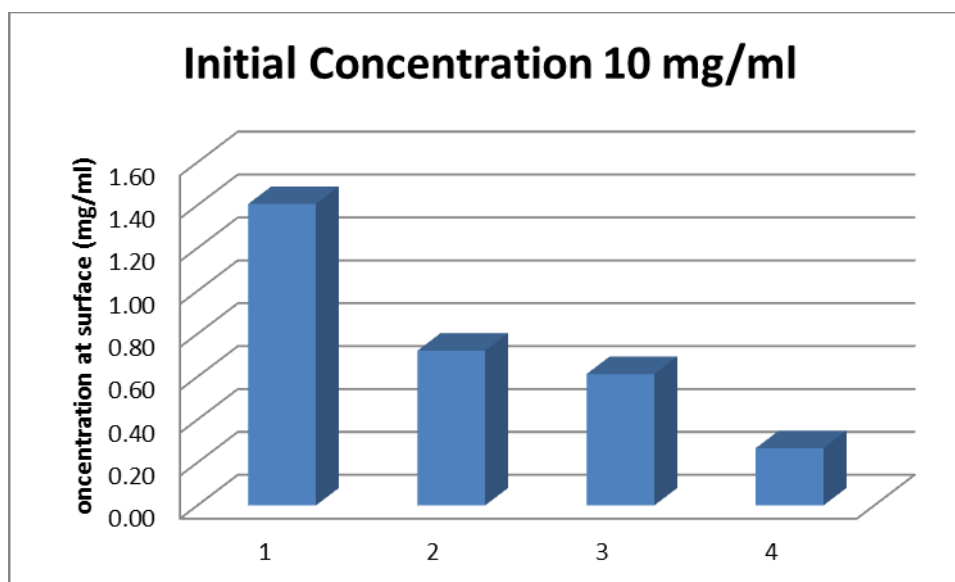
และเมื่อนำผลของข้อมูลข้างต้นทั้งหมดของ Lys มาแสดงด้วยกราฟแท่งเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งจะแสดงได้ดังกราฟที่

36

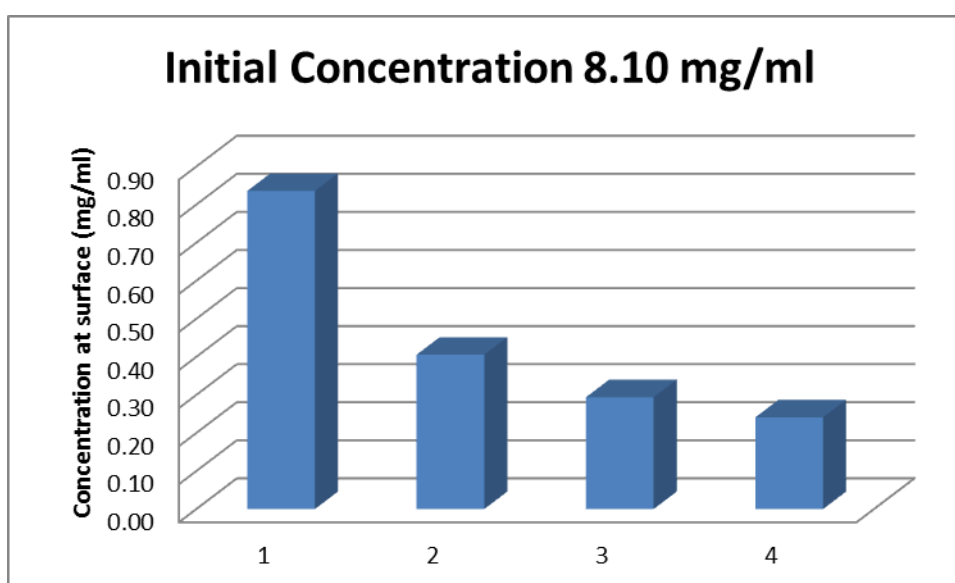
กราฟที่ 36 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ Lys ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06mg/ml และข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)



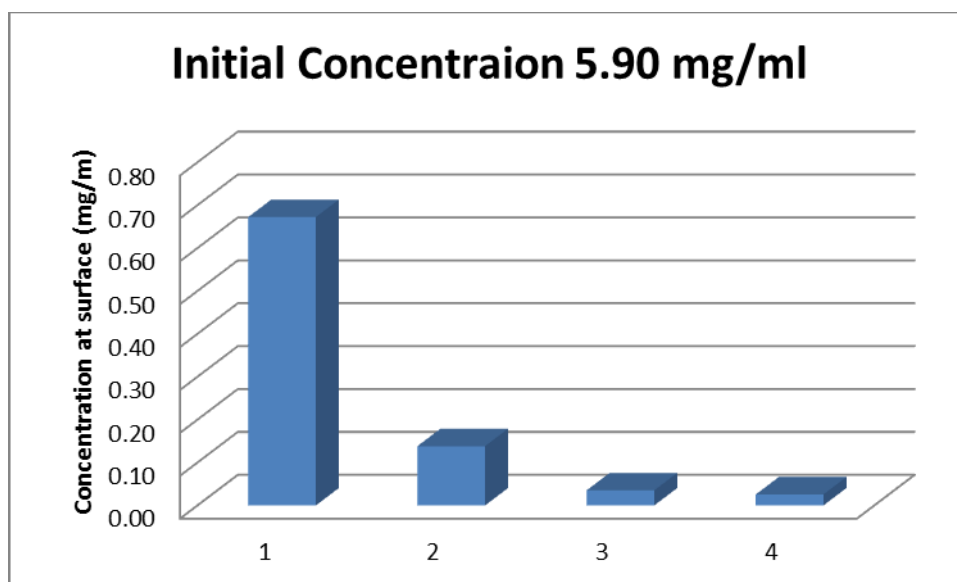
กราฟที่ 37 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 10mg/ml



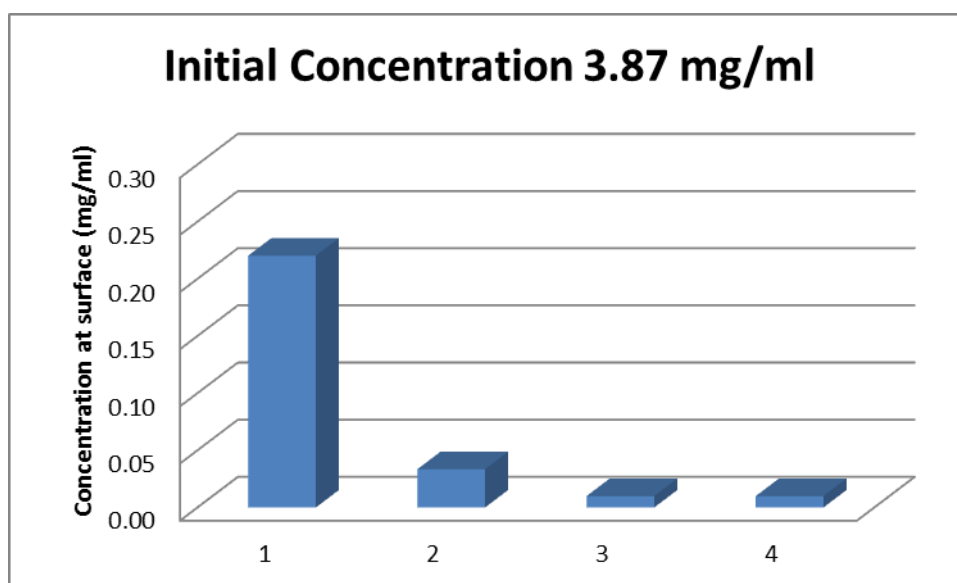
กราฟที่ 38 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 8.10 mg/ml



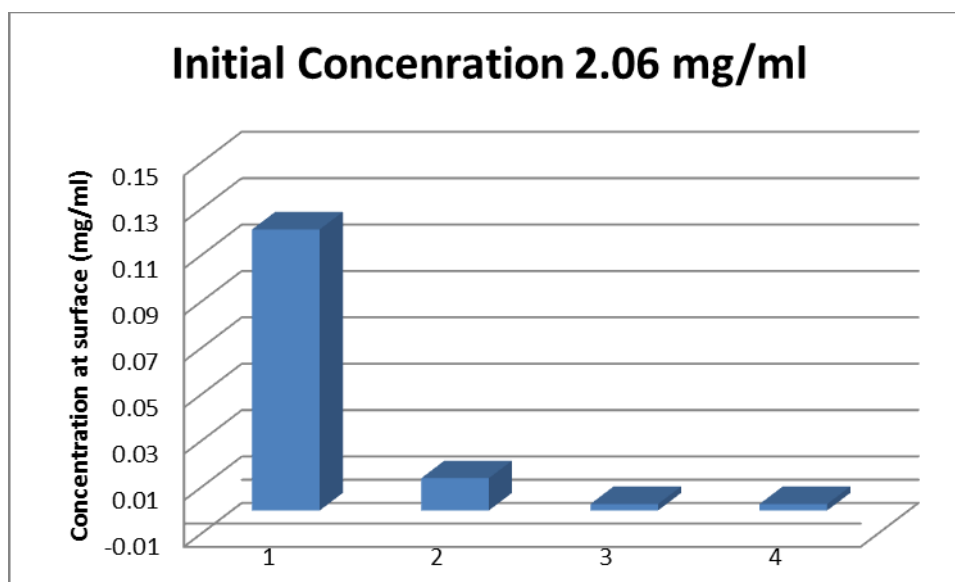
กราฟที่ 39 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 5.90mg/ml



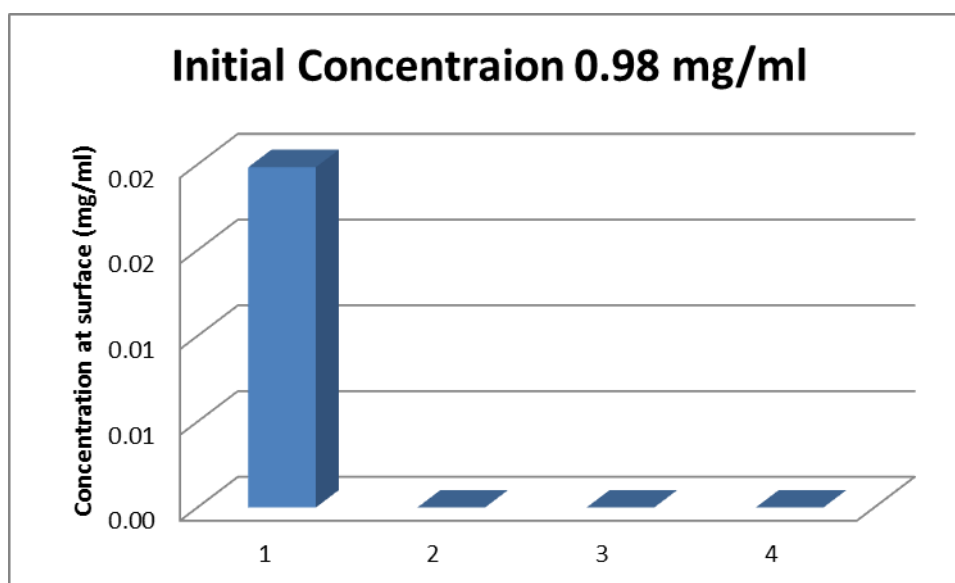
กราฟที่ 40 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 3.87mg/ml



กราฟที่ 41 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 2.06 mg/ml

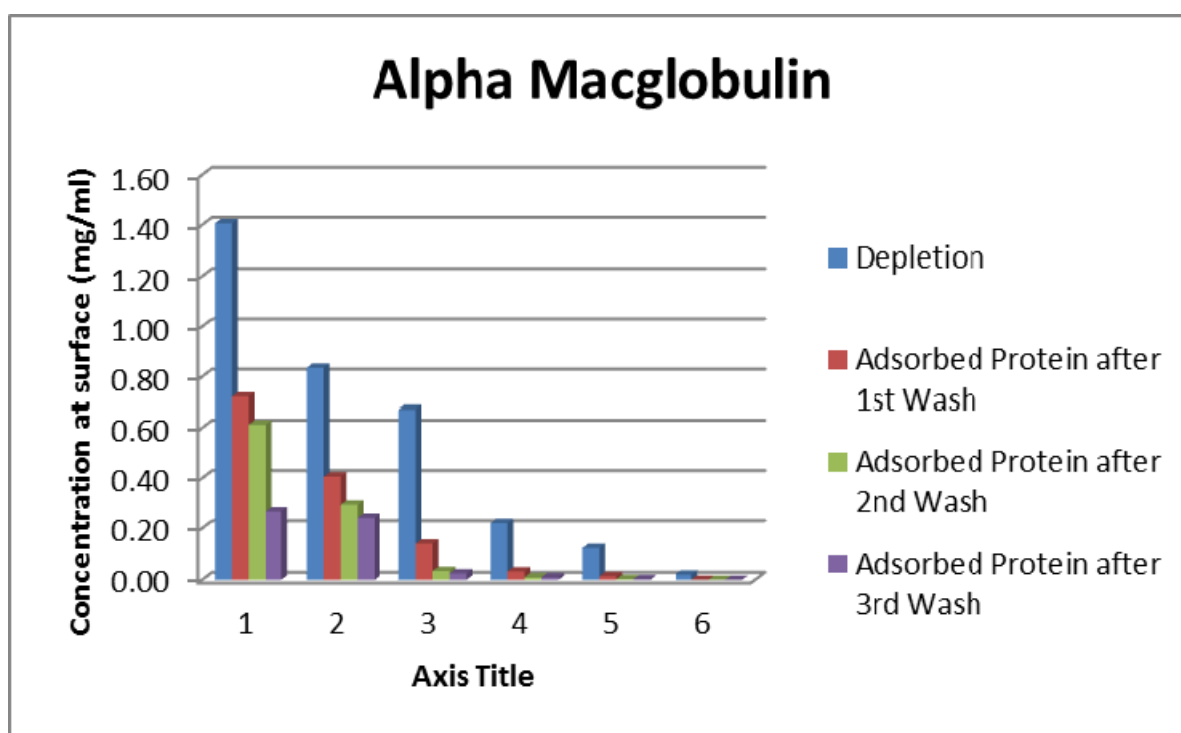


กราฟที่ 42 แสดงปริมาณการดูดซับของโปรตีน (α -mac) บนพื้นผิว (OS) หลังจากปล่อยให้มีการดูดซับที่เวลา 1 ชั่วโมง (แท่งที่1) เทียบกับปริมาณของโปรตีนที่เหลืออยู่หลังการชะล้าง ครั้งที่ 1 (แท่งที่ 2) ครั้งที่ 2 (แท่งที่ 3) และครั้งที่ 3 (แท่งที่ 4) เมื่อใช้ความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นที่ 0.98 mg/ml



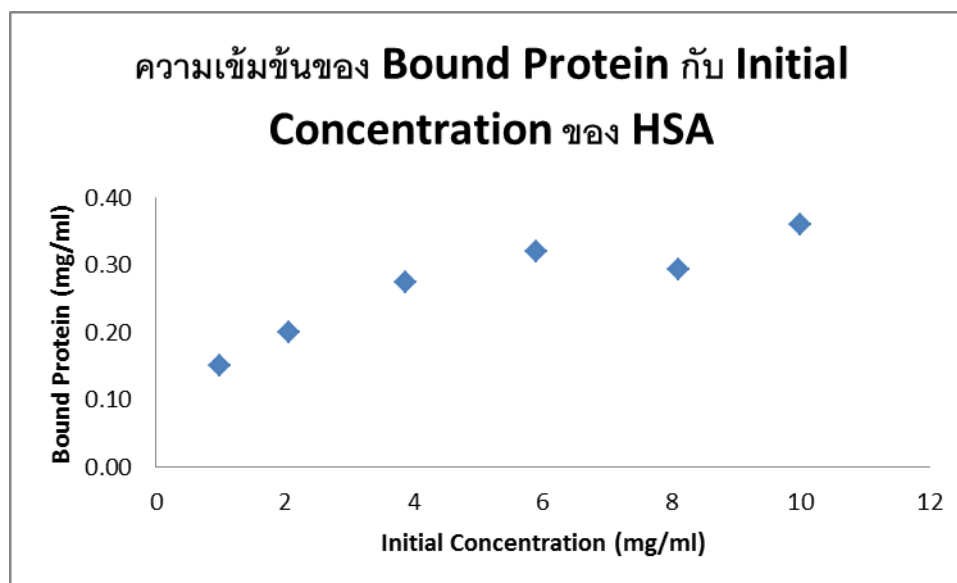
และเมื่อนำผลของข้อมูลข้างต้นทั้งหมดของ α -mac มาแสดงด้วยกราฟแท่งเดียวกันเพื่อเปรียบเทียบให้เห็นถึงปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งจะแสดงได้ดังกราฟที่ 43

กราฟที่ 43 แสดงเปรียบเทียบปริมาณการดูดซับที่ลดลงของโปรตีนบริเวณพื้นผิวหลังจากถูกการชะล้างแต่ละครั้งของ α -mac ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ (ข้อมูลชุดที่ 1 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10mg/ml ข้อมูลชุดที่ 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 8.1 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 3 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5.9 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 4 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3.87 mg/ml ข้อมูลชุดที่ 5 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2.06mg/ml และข้อมูลชุดที่ 6 ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.98 mg/ml)

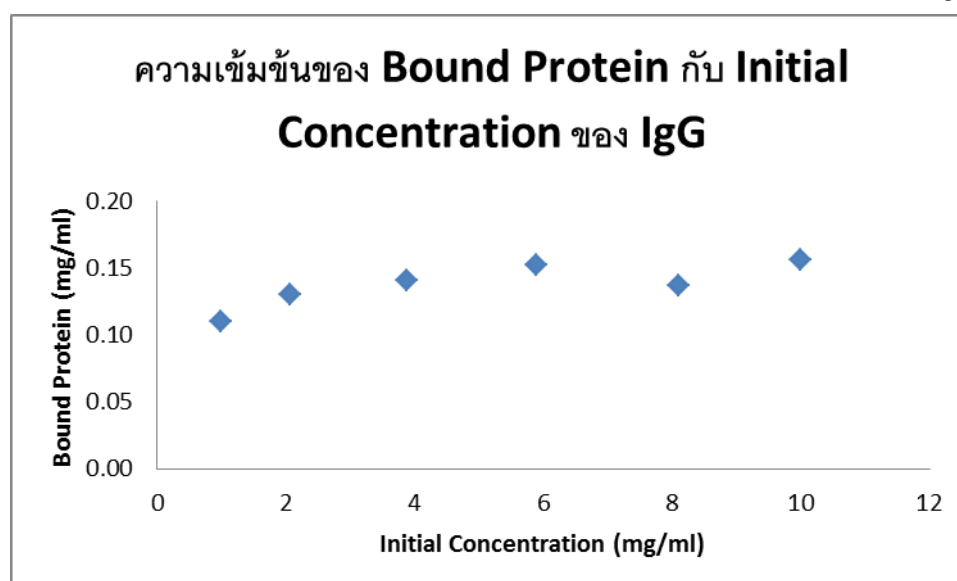


จากการทดสอบในทุกเงื่อนไขข้างต้นของสารละลายโปรตีนทั้ง 5 ชนิด พบว่า การชะล้างในแต่ละครั้งทำให้โปรตีนที่ถูกดูดซับสามารถหลุดออกได้จากการดูดซับ ทั้งนี้ปริมาณของการหลุดออกนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีน และหากนำค่าความสัมพันธ์ดังกล่าวของแต่ละโปรตีนมาเขียนแสดงด้วยกราฟ โดยนำปริมาณของโปรตีนที่ยังคงเหลืออยู่บนพื้นผิวหลังการชะล้างครั้งที่ 3 หรือที่เรียกว่า Bound Protein ของแต่ละความเข้มข้น ของแต่ละโปรตีน มาแสดงจะได้ดังกราฟ

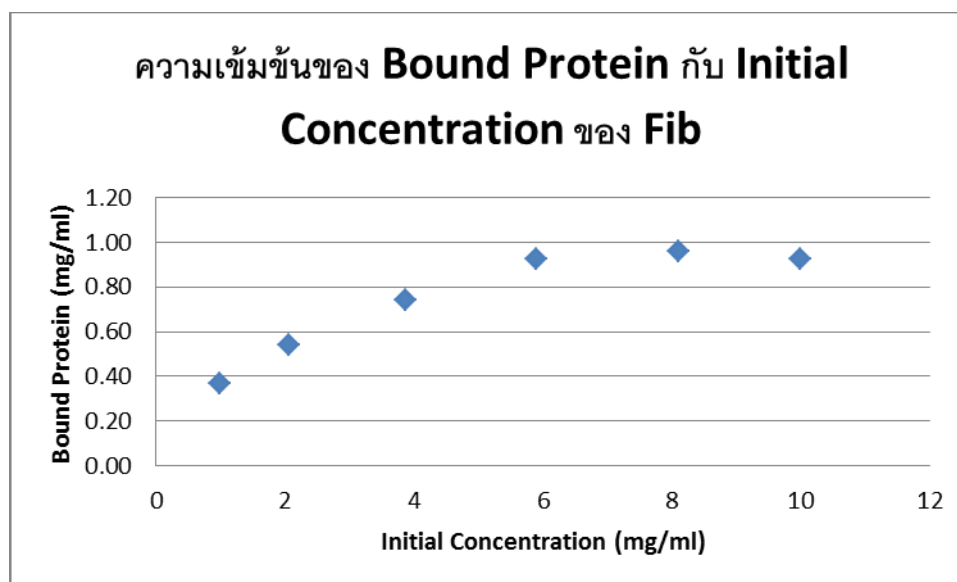
กราฟที่ 44 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้น ของ HSA



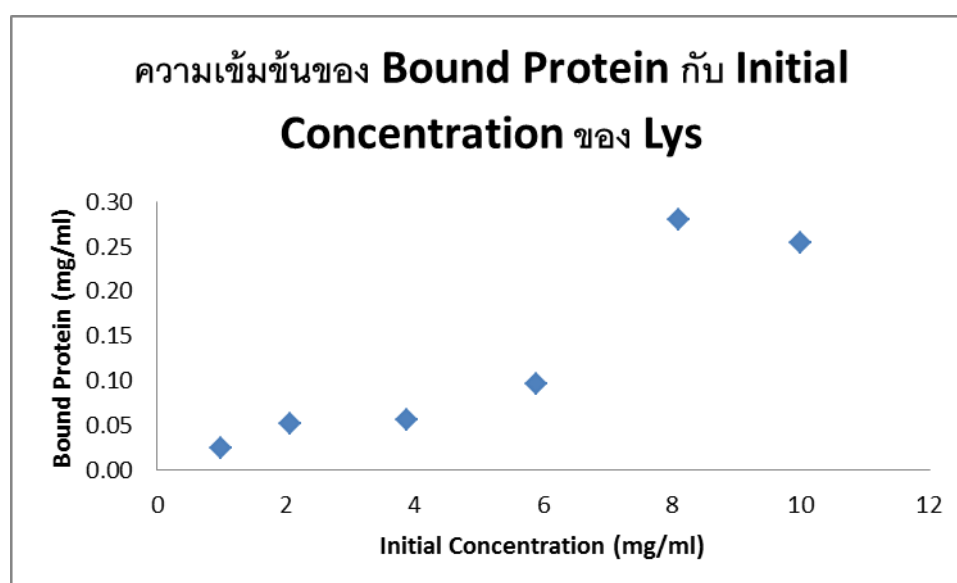
กราฟที่ 45 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้น ของ IgG



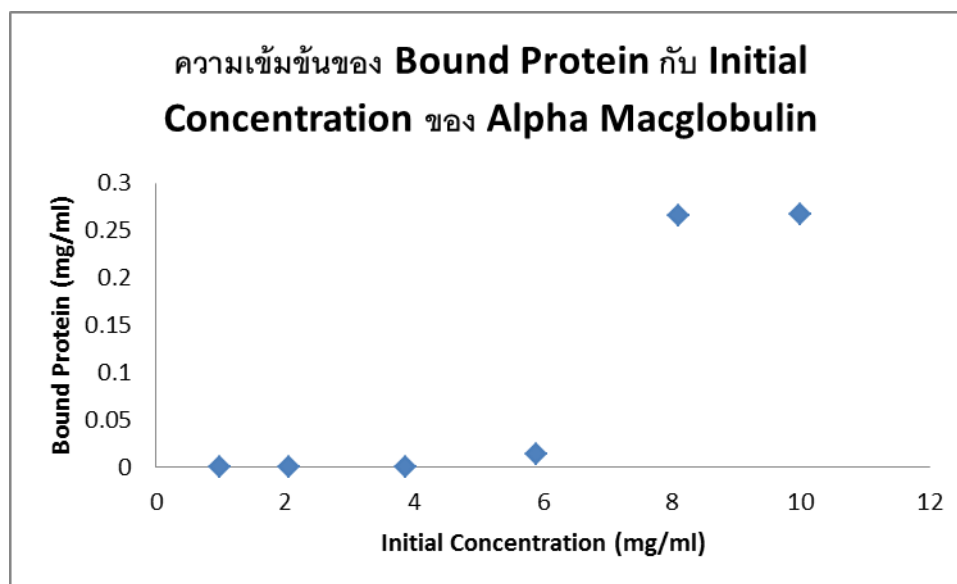
กราฟที่ 46 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้น ของ Fib



กราฟที่ 47 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้น ของ Lys

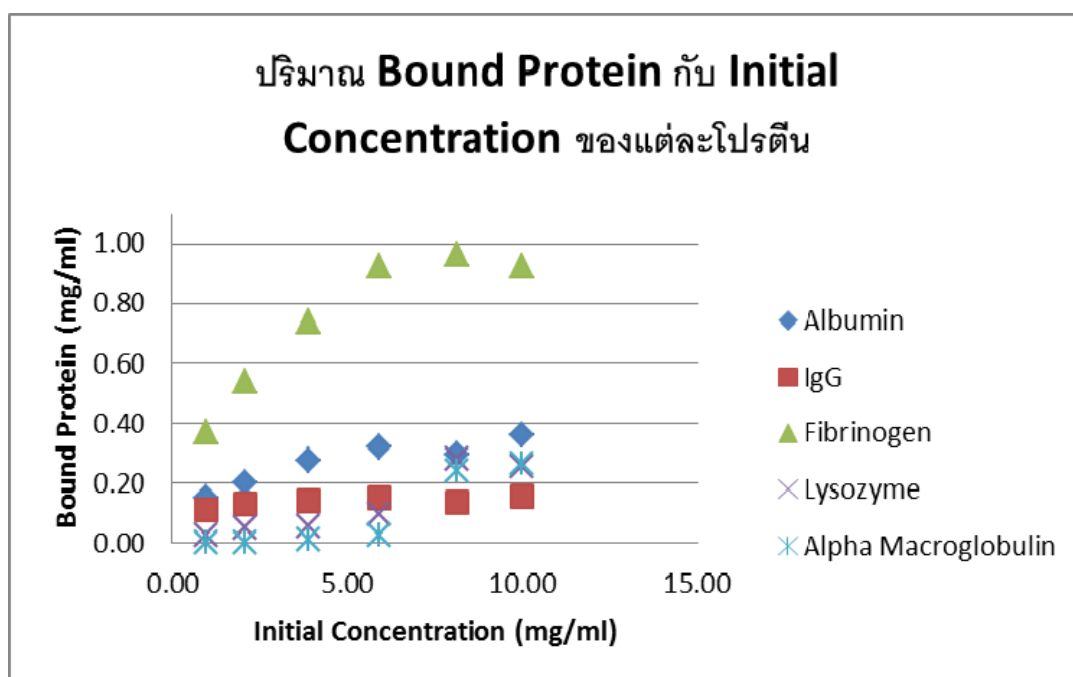


กราฟที่ 48 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้น ของ α -mac



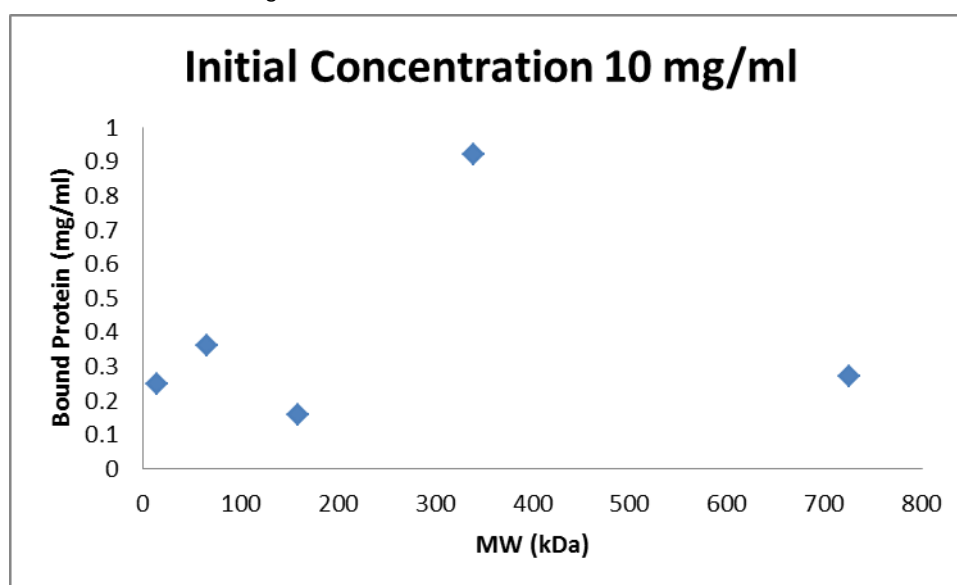
และเมื่อนำปริมาณของ Bound Protein ของโปรตีนแต่ละชนิดมาเขียนกราฟที่สัมพันธ์กับความเข้มข้นเริ่มต้นในกราฟเดียวกันจะได้ดังกราฟที่ 49

กราฟที่ 49 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนแต่ละชนิด

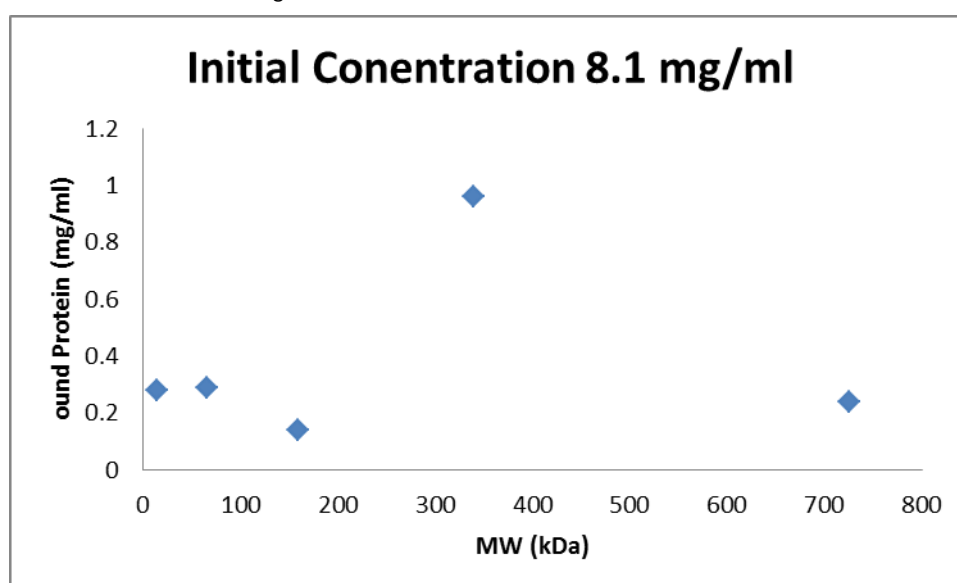


หากพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างขนาดของโปรตีน (MW) และปริมาณที่ถูกดูดซับหลังจากการชะล้างครั้งที่ 3 (Bound Protein) ของแต่ละความเข้มข้น จะได้ความสัมพันธ์ดังกล่าวดังที่แสดงในกราฟต่อไปนี้

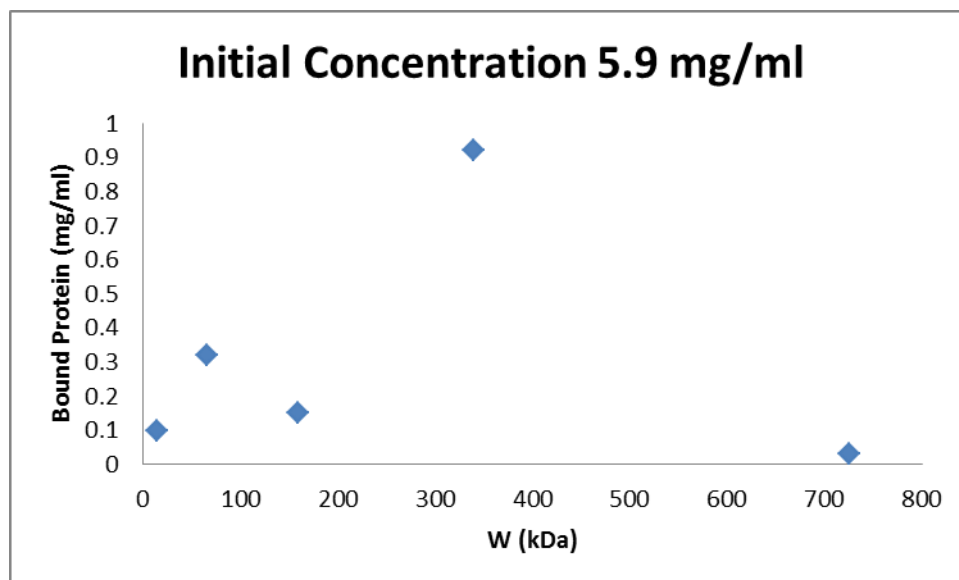
กราฟที่ 50 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10 mg/ml



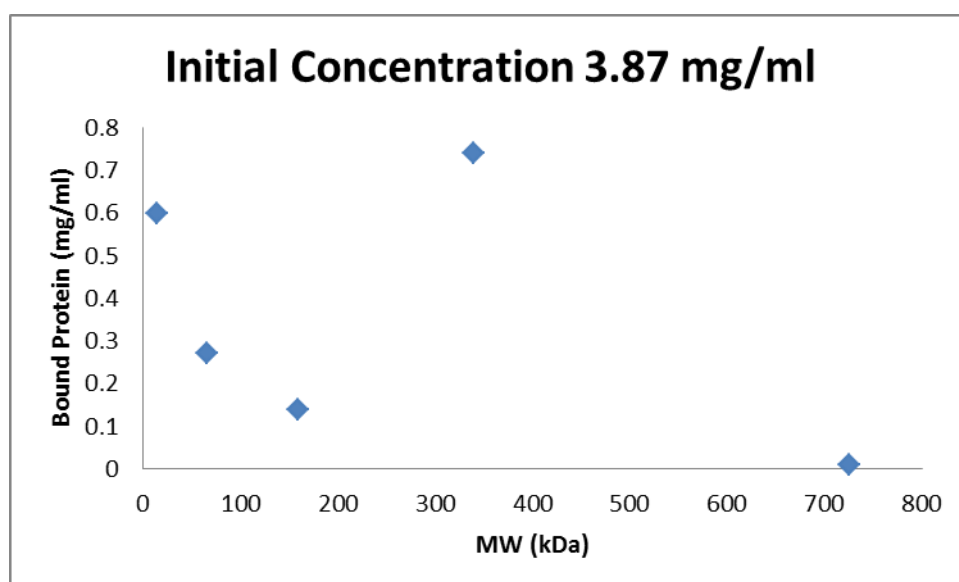
กราฟที่ 51 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 8.1 mg/ml



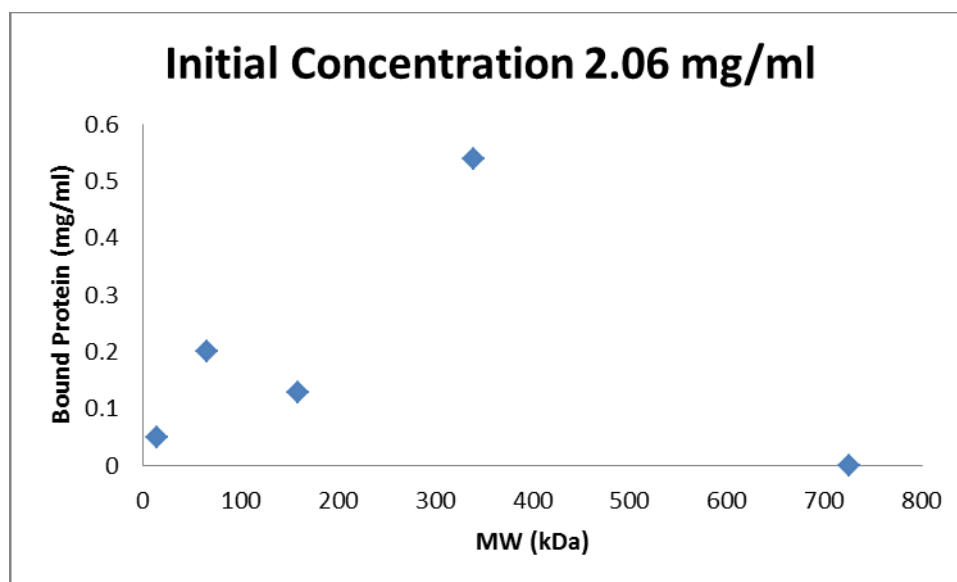
กราฟที่ 52 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5.9 mg/ml



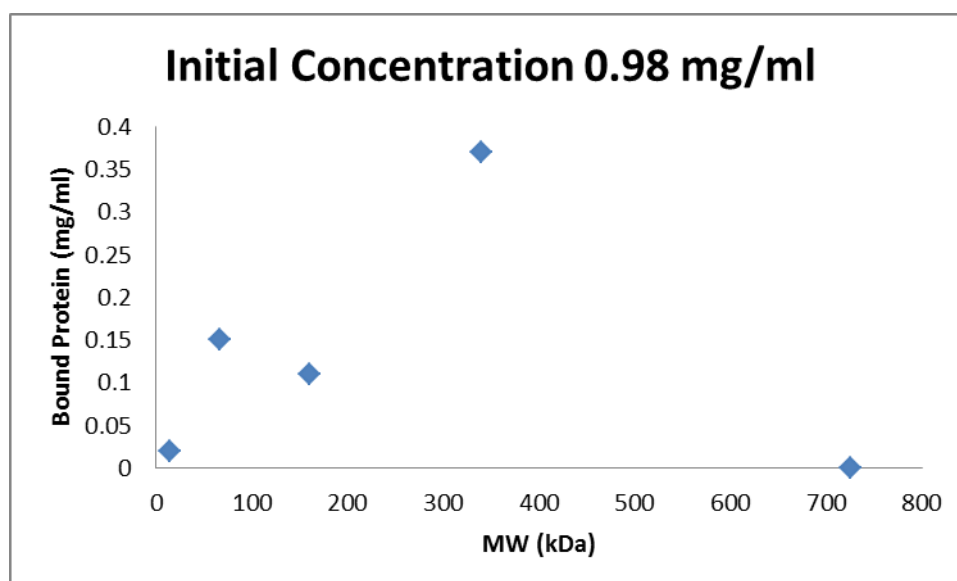
กราฟที่ 53 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 3.87 mg/ml



กราฟที่ 54 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 2.06 mg/ml



กราฟที่ 55 แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein และขนาดของโปรตีนแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 0.98 mg/ml



บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการทำการศึกษาผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนที่มีผลต่อการดูดซับของโปรตีน สามารถสรุปการวิจัยได้ดังต่อไปนี้

5.1 สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาถึงผลของขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับของโปรตีนนั้น สามารถแยกพิจารณาออกเป็นสองหัวข้อใหญ่ๆ คือ

5.1.1 ผลของความเข้มข้นของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง

จากกราฟที่ 48 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับหลังจากการชะล้างครั้งที่สาม (Bound Protein) กับ ค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของการทดลองสำหรับแต่ละโปรตีน (Initial Concentration) พบว่าในทุกๆ โปรตีนสำหรับช่วงของความเข้มข้นที่ศึกษานั้น ในช่วงต้นหากเพิ่มความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นให้เพิ่มสูงขึ้น ปริมาณของ Bound Protein ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย กล่าวคือ ปริมาณของ Bound Protein แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของโปรตีนตอนเริ่มต้นนั่นเอง จนถึงที่ระดับความเข้มข้นค่าหนึ่งของโปรตีนแต่ละชนิด ปริมาณของ Bound Protein จะเริ่มคงที่ นั่นคือ ถึงแม้ว่าจะทำการเพิ่มความเข้มข้นให้กับระบบต่อไป ปริมาณของ Bound Protein ก็ไม่ได้เพิ่มขึ้น นั่นบ่งบอกให้เห็นว่าระบบอาจจะสามารถมี Bound Protein ได้ในระดับที่สามารถยึดกันได้ดีกับพื้นผิวอย่างแข็งแรงเท่านั้น ซึ่งการยึดกันอย่างแข็งแรงนี้ ย่อมแสดงให้เห็นว่า เป็นการก่อตัวแบบชั้นเดียวของโปรตีนกับพื้นผิว ส่วนโปรตีนที่หลุดออกไปจากการชะล้างในแต่ละครั้ง น่าจะเป็นโปรตีนที่มีการก่อตัวแบบหลายชั้นจึงสามารถหลุดออกจากพื้นผิวได้ง่าย

5.1.2 ผลของขนาดของโปรตีนที่มีต่อการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิววัสดุตัวอย่าง

จากกราฟที่ 49-54 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของโปรตีนที่ถูกดูดซับหลังจากการชะล้างครั้งที่สาม กับขนาดของโปรตีนแต่ละชนิด (MW) พบว่า ในทุกๆ เงื่อนไขของความเข้มข้น ปริมาณการดูดซับของโปรตีนที่พื้นผิวหลังจากการชะล้างนั้นไม่มีความสัมพันธ์เป็นลักษณะเชิงเส้นกับขนาดของโปรตีน แต่จะสามารถสังเกตเห็นได้ว่า รูปแบบการจัดเรียงตัวของกราฟดังกล่าวจะมีลักษณะเช่นเดียวกันทั้ง 6 กราฟ ซึ่งบ่งบอกให้เห็นว่า แรงในการดูดซับระหว่างโปรตีนแต่ละชนิดกับพื้นผิวมีแนวโน้มในลักษณะเดียวกัน สำหรับในทุกๆ ความเข้มข้นที่ทำการศึกษา นั่นคือ Fibrinogen จะมีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับพื้นผิวสูงกว่าโปรตีนชนิดอื่นๆ และ Alpha Macglobulin มีแรงดึงดูดระหว่างโมเลกุลของโปรตีนกับพื้นผิวต่ำที่สุด ซึ่งจะสามารถเห็นได้จากกราฟว่าปริมาณของโปรตีนบนพื้นผิวสามารถหลุดออกได้เกือบทั้งหมดหลังจากที่ดูดซับอยู่บริเวณพื้นผิวในช่วงแรกก่อนการชะล้าง

จาก 5.1.1 และ 5.1.2 สามารถสรุปได้เพิ่มเติมว่า ระบบการดูดซับของโปรตีนจากสารละลายสู่วัสดุพื้นผิวตัวอย่างเป็นการดูดซับแบบผันกลับได้ (reversible process) ซึ่งเห็นได้จากปริมาณการดูดซับของโปรตีนบนพื้นผิวหลังจากการชะล้างที่มีปริมาณลดลงเมื่อเทียบกับก่อนการชะล้างนั่นเอง อีกทั้งยังสามารถสรุปได้ว่า การดูดซับของโปรตีนมีการจัดเรียงตัวแบบหลายชั้น (multilayer) เพราะหากเป็นการเรียงตัวแบบชั้นเดียว (monolayer) ปริมาณการหลุดออกของโปรตีนจากพื้นผิวหลังจากการชะล้าง ควรมีปริมาณน้อย หรือไม่มีเลย เพราะแรงดึงดูดระหว่างโปรตีนในชั้นแรกที่ติดกับพื้นผิววัสดุจะมีค่าสูงกว่าแรงที่เกิดขึ้นจากการชะล้าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ถูกต้องและมีความน่าเชื่อถือในผลการทดลองมากยิ่งขึ้น พร้อมทั้งที่จะสามารถระบุถึงสมการความสัมพันธ์ของปริมาณ Bound Protein กับ ขนาดและความเข้มข้นของโปรตีนได้ชัดเจนนั้น ทางผู้วิจัยเห็นว่า ควรทำการทดลองและการวิจัยเพิ่มเติมในส่วนต่างๆ ดังนี้

1. ควรทำการทดลองเช่นเดียวกับการวิจัยนี้แต่ใช้เครื่องมือในการทดลองที่แตกต่างกันเพื่อทำการเปรียบเทียบลักษณะของการทดลองที่ได้ว่าจะให้ผลเช่นเดียวกันหรือไม่ เพราะในบางกรณีการใช้เครื่องมือต่างชนิดกันที่มี sensitivity ที่ต่างกัน ก็อาจทำให้ผลแตกต่างกัน
2. หากมีงบประมาณที่เพียงพอหรือมากขึ้น ควรทำการทดลองที่ความเข้มข้นต่างๆ ของโปรตีนให้มากขึ้น และควรใช้จำนวนโปรตีนมากขึ้น เพื่อให้ได้กราฟเปรียบเทียบที่สมบูรณ์ขึ้นตลอดทุกช่วงขนาดของโปรตีน
3. ควรใช้พื้นผิววัสดุให้หลากหลายขึ้น เพื่อทดสอบว่าหากเปลี่ยนวัสดุตัวอย่าง การทดลองจะให้ผลออกมาเช่นเดิมหรือไม่ อย่างไร
4. ควรศึกษาวิธีการทางสถิติโดยเฉพาะในส่วนของการ fit curve ให้มากยิ่งขึ้นเพื่อสามารถระบุถึงสมการความสัมพันธ์ที่ไม่ได้เป็นเชิงเส้นได้แม่นยำและถูกต้อง ซึ่งจะสามารถนำไปสร้างเป็นโมเดลหรือสมการต้นแบบแสดงความสัมพันธ์ได้

เอกสารอ้างอิง

1. Anderson RN, Minino AM, Hoyert DL, Rosenberg HM. National Vital Statistics Reports. In: Control CfD, editor. Volume 49; 2001. p 1-32.
2. Guzzo M. Medical Device Frims Focus on Cardiac, Respiratory Care. Pittsburgh Business Times 2004 June 4.
3. Williams DF, Bagnall RD. Fundamental Aspects of Biocompatibility. Boca Raton: CRC Press; 1981. p 114-127.
4. Williams DF. The Blood-Device Interface. Medical Device Technol. 1993 September:8-12.
5. Williams DF. General Concepts of Biocompatibility. In: Black J, Hastings G, editors. Handbook of Biomaterial Properties. London: Chapman and Hall; 1998. p 481-488.
6. Williams DF. Review: Tissue-Biomaterial Interactions. J. Mat. Sci. 1987;22:3421-3445.
7. Krishnan A, Sturgeon J, Siedlecki CA, Vogler EA. Scaled Interfacial Activity of Proteins at the Liquid-Vapor Interface. J. Biomed. Mat. Res. 2004;68A:544-557.
8. Horbett T. Protein Adsorption on Biomaterials. In: Cooper SL, Peppas NA, Hoffman AS, Ratner BD, editors. Biomaterials: Interfacial Phenomena and Applications. Washington D. C.: Am. Chem. Soc.; 1982. p 234-243.
9. Krishnan A, Liu Y-H, Cha P, Allara DL, Vogler EA. Interfacial Energetics of Blood Plasma and Serum Adsorption to a Hydrophobic Self-Assembled Monolayer Surface. Biomaterials 2006;27:3187-3194.
10. Johlin JM. Interfacial Adsorption as a Function of the Concentration of Colloidal Solutions. J. Biol. Chem. 1929;84:543-551.
11. Johlin JM. Interfacial Adsorption as a factor in the Clotting of Blood Plasma. J. Biol. Chem 1929;81:99-113.
12. Brash J, Lyman D. Adsorption of Proteins and Lipids to Nonbiological Surfaces. In: Brash JL, editor. The Chemistry of Biosurfaces. new York: Marcel Dekker; 1971. p 177-222.
13. Lyman DJ, Brash JL, Chaikin SW, Carini M. The effect of chemical structure and Surface properties of synthetic polymers on the coagulation of blood. II. Protein and platelet interaction with polymer surfaces. Trans Am Soc Artif Intern Organs 1968;14:250-5.

14. Lyman DJ, Brash JL, Chaikin SW, Klein KG, Carini M. The Effect of Chemical Structure and Surface Properties of Synthetic Polymers on the Coagulation of Blood. II. Protein and Platelet Interaction with Polymer Surfaces. *Trans. Amer. Soc. Artif. Int. Organs* 1968;14:250- 255.
15. Brash JL, Lyman DJ. Adsorption of Plasma Proteins in Solution to Uncharged, Hydrophobic Polymer Surfaces. *J. Biomed. Mat. Res.* 1969;3:175-189.
16. Krishnan A, Liu Y-H, Cha P, Allara DL, Vogler EA. Interfacial Energetics of Globular-Blood Protein Adsorption to a Hydrophobic Surface from Aqueous-Buffer Solution. *Journal of the Royal Society Interface* 2006;3:283-301.
17. Vogler EA. Structure and Reactivity of Water at Biomaterial Surfaces. *Adv. Colloid and Interface Sci.* 1998;74(1-3):69-117.
18. Barnthip N, Noh H, Leibner E, Vogler EA. Volumetric Interpretation of Protein Adsorption: Kinetic Consequences of a Slowly-Concentrating Interphase. *Biomaterials* 2008;29:3062- 3074.
19. Barnthip N, Parhi P, Golas A, and Vogler E. Volumetric Interpretation of Protein Adsorption: Kinetics of Protein-Adsorption Competition from Binary Solution. *Biomaterials*. 2009; In Press.
20. Leibner E, Barnthip N, Chen W, Baumrucker C, Badding J, Pishko M, and Vogler E. Superhydrophobic Effect on the Adsorption of Human Serum Albumin, *Acta Biomaterialia*. 2009; 5(5): 1389-1398.
21. Dee KC, Puleo DA, and Bizios R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. Wiley- Liss. 2002. p. 41-45.
22. Krishnan A, Siedlecki CA, and Vogler EA. Mixology of Protein Solutions and Vroman Effect. *Langmuir*. 2004; 20: 5071-5078.
23. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, and Lemons JE. *An Introduction to Materials in Medicine*. 2nd Edition. Elsevier Academic Press. 2004. p.237-246.
24. Aveyard R, and Haydon DA. *An Introduction to the Principles of Surface Chemistry*. Cambridge University Press. 1973. p.7-9.
25. Vogler, E. A., Martin, D. A., Montgomery, D. B., Graper, J. & Sugg, H. W. 1993 A graphical method for predicting protein and surfactant adsorption properties. *Langmuir* 9, 497-507.
26. Graham, D. E. & Phillips, M. C. 1979 Proteins at liquid interfaces. *J. Colloid Interface Sci.* 70, 415-426.

27. Brynda, E., Cepalova, N. & Stol, M. 1984 Equilibrium adsorption of human serum albumin and human fibrinogen on hydrophobic and hydrophilic surfaces. *J. Biomed. Mater. Sci.* 18, 685–693.
28. Jeon, J., Superline, R. & Raghavan, S. 1992 Quantitative analysis of adsorbed serum albumin on segmented polyurethane using FT-IR/ATR spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 46, 1644–1648.
29. Claesson, P. M., Blomberg, E., Froberg, J. C. et al. 1995 Protein interactions at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* 57, 161–227.
30. Chen, W.-Y., Huang, H.-M., Lin, C.-C., Lin, F.-Y. & Chan, Y.-C. 2003 Effect of temperature on hydrophobic interaction between proteins and hydrophobic adsorbents: studies by isothermal titration calorimetry and the van't Hoff equation. *Langmuir* 19, 9395–9403.
31. Zhou, C. et al. 2004 Human immunoglobulin adsorption investigated by means of quartz crystal microbalance dissipation, atomic force microscopy, surface acoustic wave, and surface plasmon resonance techniques. *Langmuir* 20, 5870–5878.
32. Krishnan A, Siedlecki C, Vogler EA. Traube-rule interpretation of protein adsorption to the liquid–vapor interface. *Langmuir* 2003;19:10342–52.

เอกสารแนบ

การเผยแพร่ผลงานบางส่วนจากผลของโครงการวิจัยนี้ในลักษณะสิ่งตีพิมพ์

Naris Barnthip and Erwin A. Vogler. Protein Adsorption Kinetics
from Single and Binary Solution. Applied Surface Science.
December 2011, In press.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Applied Surface Science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apsusc



Protein adsorption kinetics from single- and binary-solution

Naris Barnthip^{a,*}, Erwin A. Vogler^b

^a Division of Physics, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum Thani 12110, Thailand

^b Departments of Materials Science and Engineering and Bioengineering, The Pennsylvania State University, PA 16802, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2011

Received in revised form 4 December 2011

Accepted 4 December 2011

Available online xxx

Keywords:

Protein adsorption

Kinetics

Interphase

Surface

Adsorption competition

ABSTRACT

Comparison of protein mass-adsorption-rates to rates-of-change in interfacial tensions reveals that mass adsorption is decoupled from interfacial energetics. This implies that energy-barrier theories describing protein-adsorption kinetics do not accurately capture the physics of the process. An alternative paradigm in which protein molecules rapidly diffuse into an inflating interphase which subsequently slowly shrinks in volume, concentrating adsorbed protein and causing slow concomitant decrease in interfacial tensions, is shown to be consistent with adsorption kinetics measured by solution depletion and tensiometry. Mass adsorption kinetics observed from binary-protein solution is compared to adsorption kinetics from single-protein solution, revealing that organization of two different-sized proteins within the interphase can require significantly longer than that adsorbed from single-protein solution and may require expulsion of initially adsorbed protein which is not observed in the single-protein case.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

One of the more interesting and important outcomes of recent research into protein-adsorption kinetics is that the rate-of-mass-adsorption is significantly faster than the rate-of-change in interfacial energetics [1]. This finding alerts us that the conventional understanding of adsorption kinetics could be significantly in error as applied to large molecules such as proteins. Furthermore, this new knowledge could revolutionize the way those involved in biomaterials surface science conceive of the protein-adsorption process that is so fundamental to understanding mechanisms of biocompatibility [2].

It is evident from the literature that we have changed our thinking about the fundamental aspects adsorption kinetics a number of times [3]. In the early 1900s it was thought that adsorption kinetics was diffusion controlled [4]. Later, it was shown that diffusion was far too fast to limit mass transport and control the observed slow rates-of-change in the interfacial tension of surfactant solutions [5,6]. By the late 1980s, various kinetic theories positing an energy barrier to adsorption came forward [7–10], explaining that diffusion toward a freshly created interface was indeed fast but that the rate at which solute crossed from an imaginary sub-surface region into the interface was slow, accounting for slow change in interfacial energetics. Perhaps the most advanced version of these energy-barrier theories is that of Varoqui and Pefferkorn

[10] who combined Fick's law with the notion of a semi-reflecting energy barrier. A reflecting plane was envisioned to reside below the authentic interface that increasingly retarded passage of solute into the interface as it became increasingly populated with solute molecules diffusing in from bulk solution against a concentration gradient. In this way, concentration-dependent adsorption kinetics was accommodated by phenomenological rate equations.

Thus the basic paradigm of adsorption arising from energy-barrier theories is that of interfacial tension changing as a function of time as solute adsorbs to the interface as a function of time. In sharp contrast, recent work by Clark et al. using a modified resonant microbalance method [1] experimentally demonstrates that proteins arrive at the interface quickly relative to slower change in interfacial tensions. It is apparent that another change in the way we think about protein-adsorption kinetics is required. Although change in paradigm is sometimes disconcerting, a new approach to adsorption kinetics relieves us of certain conceptual difficulties about the surface region that accompany energy-barrier theories. Notably in this latter regard, it is not clear why a semi-reflecting plane and an interfacial plane do not together constitute an interphase similar to that employed by Gibbs [11] and Guggenheim [12] in development of surface thermodynamics. And it is not clear why molecules collected at a semi-reflecting plane do not qualify as adsorbed from solution and do not contribute to decay in interfacial tensions.

The fundamental equilibrium adsorption equation for a two component system consisting of solvent “1” and solute (protein) “2” according to either Gibbs or Guggenheim [13] states that $d\gamma = -[\Gamma_2 - (n_{B,2}/n_{B,1})\Gamma_1]d\mu_2$, where γ is interfacial tension

* Corresponding author. Tel.: +66 25494186/+66 814206611; fax: +66 25494187.
E-mail addresses: naris.bt@gmail.com (N. Barnthip), eav3@psu.edu (E.A. Vogler).

(ergs/cm² = mJ/m²), $\Gamma \equiv (n_l/A)$ measures the number of moles of 1 or 2 within the interphase n_l per-unit-area (moles/cm²), and n_B is the mole number within bulk solution. The subscripts B and l track bulk solution and interphase, respectively. Evidentially, change in γ is an explicit function of solute chemical potential μ_2 , not absolute adsorbed mass *per se*. That is to say, interfacial tension tracks solute concentration within the interphase. In fact, there are three ways interphase concentration can increase: (i) total adsorbed mass within a fixed interphase volume can increase, (ii) the interphase volume containing a fixed total adsorbed mass can decrease, or (iii) both (i) and (ii) can simultaneously occur. Option (i) is effectively the old paradigm of adsorption kinetics: mass slowly accumulates at the interface (a pseudo-two-dimensional region with fixed volume) and causes decrease in interfacial tensions. Option (ii) is consistent with the new finding that mass adsorption is much faster than change in interfacial tension because it does not insist that mass-adsorption rates are directly coupled to rates-of-change in interfacial tensions. Rather, option (ii) allows for rapid accumulation of protein mass and subsequent concentration of this mass in a decreasing interphase volume. And of course option (iii) is not viable if option (i) does not occur.

An alternative paradigm of protein adsorption arising from these considerations is that of protein rapidly diffusing into an inflating interphase volume which subsequently slowly decreases in volume, increasing interphase protein concentration and concomitantly causing decrease in interfacial tensions [3,14]. Herein we test this idea using an electrophoretic implementation of the venerable solution-depletion method of measuring adsorption [15–18]. Use of electrophoresis as a multiplexing separation and quantification tool permitted us to measure kinetics of adsorption from single- and binary-protein solutions to the same hydrophobic adsorbent surface. Results are completely consistent with this alternative paradigm, leading us to conclude that the initial rate of protein adsorption is indeed diffusion controlled but that the final concentration of protein within the interphase is controlled by slow reorganization of the interphase region. Reorganization of the interphase region has profound consequences in the case when two proteins participate in adsorption competition to the same adsorbent surface.

2. Materials and methods

Both materials and methods applied in this work have been extensively described elsewhere [3,14–18]. Briefly for the purposes of this report, adsorption of five different proteins were studied singly and in pairs at different solution concentrations [3,14]: ubiquitin (Ub), 10.7 kDa; human serum albumin (HSA), 66.3 kDa; prothrombin (FII), 72 kDa; human immunoglobulin type G (IgG), 160 kDa; and fibrinogen (Fib), 341 kDa. These proteins were selected to provide a broad range in size. Proteins were prepared in phosphate buffer saline solution (PBS, at pH 7.4 prepared from powder as received from Sigma in 18 mΩ distilled/deionized water from a Millipore Simplicity ion-exchange unit). Both hydrophobic octyl sepharose (OS, Octyl Sepharose Fast Flow Adsorbent, Amersham Biosciences) and hydrophobic glass particles (Sigma) silanized with octadecyltrichlorosilane (OTS, Sigma) were used as adsorbents and found to give essentially identical results. SDS-PAGE electrophoresis was carried out using 26 lane NuPage Novex tris-aceate precast gels (Invitrogen) stained with SimplyBlue Safestain (Invitrogen) according to manufacturer's directions. Band intensity was read on a Gel-doc system (Bio-Rad Labs). A standard curve was prepared for each protein and each gel using the first 6–8 lanes by applying solutions of known concentration of each probe protein. Linear calibration curves were obtained within the concentration

range of interest that permitted estimation of unknown protein concentrations.

Computational and statistical methods have been well described in refs. [3,14–18]. Again briefly for the purposes of this report, solution depletion $D_i = (W_{B_i}^0 - W_{B_i})$ in mg/mL bulk solution was the experimental parameter, where $W_{B_i}^0$ is the initial protein concentration before contact with adsorbent and W_{B_i} is the solution concentration measured at time t , both in mg/mL. The subscript i tracks protein identity and used to differentiate from a second protein j used in binary-protein-adsorption studies. Binary mixtures were differentiated from single mixtures using an i, j subscript as in, for example, $(W_B^0)_{i,j}$ referring to the total binary-protein concentration prepared by combining protein i and protein j in a mixture. The absolute adsorbed mass $m_i = D_i V_B$ in mg, where the bulk solution volume $V_B = 30 \mu\text{L}$ in this work.

3. Results

3.1. Adsorption isotherms by solution depletion

The solution depletion has been used to collect adsorption isotherms of many different proteins and protein mixtures for many different surface types embracing a wide range of surface chemistries and water wetting characteristics [3,14–21]. Results obtained are consistent with that obtained by tensiometry [22–27] and quartz-crystal microbalance (QCM) [21]. These adsorption isotherms approximate a Henry isotherm wherein adsorbed amount is in direct proportion to solution concentration $W_{B_i}^0$ up to a maximum solution depletion $(D_i)^{\max}$ obtained at a particular solution concentration $(W_{B_i}^0)^{\max}$ at which the adsorbent surface area is saturated with protein. We have implemented the solution depletion method using spectroscopy [19,20] for single-protein solutions or electrophoresis for single- or binary-protein solutions [3,14–18].

The solution depletion method of measuring adsorption from binary-protein solution is complicated by the fact that there are two broad categories of adsorption competition falling into 5 separate cases that can be studied [14]. The first category consists of a single experimental situation termed Case 1 in which total binary-mixture concentration is insufficient to saturate the adsorbent surface. The second category consists of four different experimental situations termed Cases 2–5 in which the total-mixed-solution concentration is sufficient to saturate the adsorbent surface that can be obtained by combining i, j proteins at different concentrations relative to that required to saturate the adsorbent surface area with either pure i or pure j . Case 5 differed from surface-saturating Cases 2–4 in that both competing proteins were mixed at solution concentrations well in excess of the amount needed to saturate available adsorbent. At least one of the competing proteins was at under-saturating solution concentration in Cases 2–4. We have extensively tested each of these conditions with proteins listed in Section 2 [14] but disclose results herein for Case 5 for $i = \text{FII}$ and $j = \text{Fib}$ which has not been illustrated previously.

3.2. Adsorption from single-protein solution

Fig. 1 collects adsorption kinetics measured by the solution-depletion method for HSA adsorbing to hydrophobic OS adsorbent at five different initial solution concentrations $W_{B_i}^0$ (3.9, 3.2, 2.4, 1.6, and 0.8 mg/mL) corresponding to the five solution-depletion levels indicated by right-hand annotations running from top-to-bottom of Fig. 1, respectively. There was no detectable adsorption kinetics over the 5–90 min timeframe studied for any of the solution concentrations. Similar results were obtained for the other proteins

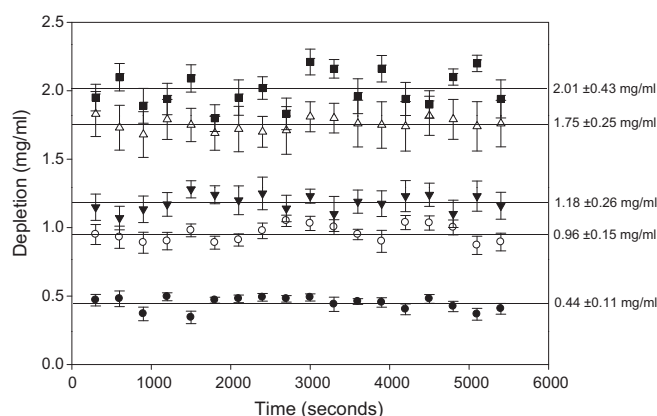


Fig. 1. Mass-adsorption kinetics of human serum albumin (HSA) adsorbing to hydrophobic octyl sepharose adsorbent particles. Similar adsorption kinetics were observed for hydrophobized glass particles. The ordinate plots amount of HSA adsorbed as the depletion $D_i = (W_{B_i}^0 - W_{B_i})$ in mg/mL bulk, where $W_{B_i}^0$ is the initial protein concentration before contact with adsorbent and W_{B_i} is the solution concentration measured at time t , both in mg/mL. The subscript i tracks protein identity and used to differentiate from a second protein j used in binary-protein-adsorption studies (see Fig. 2). D_i listed on the right-hand axis correspond to five different initial solution concentrations $W_{B_i}^0$ (3.9, 3.2, 2.4, 1.6, and 0.8 mg/mL reading top-to-bottom), respectively, with listed error representing mean and standard deviation of the individual time points. Lines through the data represent mean solution depletion. Error bars are calculated from calibration curves used to translate electrophoresis-band intensity to solution concentrations.

mentioned in Section 2 (not shown) [3,14]. These kinetics were compared to slow change in interfacial energetics of adsorption to either the hydrophobic buffer–air (liquid–vapor, lv) or hydrophobic solid–liquid (sl) interfaces lasting between 30 and 60 min observed using time- and concentration-dependent interfacial tensions and contact angles for these same proteins at similar concentrations [22–27].

3.3. Adsorption from binary-protein solution

Fig. 2 compiles adsorption kinetics observed with two proteins (i = FII, closed circles, $W_{B_i}^0 = 6$ mg/mL; j = Fib, open circles, $W_{B_j}^0 = 7$ mg/mL) competing from the solution for the same adsorbent surface under Case 5 conditions specified in Section 2 with both i, j proteins mixed in binary-solution at concentrations in excess of that required to saturate the adsorbent surface indicated by dashed horizontal lines annotated either $(D_i^{\max})$ FII or $(D_j^{\max})$ Fib. A pseudo-steady-state 1 was observed which was followed by a slow transition to a final state 2, with an inflection half-time of 60 min.

It was observed that less Fib was adsorbed from the binary mixture in State 1 than was adsorbed from single-protein solution under identical conditions (vertical arrow pointing downward from the $(D_j^{\max})$ dashed line lines on the left side of the vertical inflection line). By contrast more FII was adsorbed from the binary mixture in State 1 than was absorbed from single-protein solution under identical conditions (vertical arrow pointing upward from the $(D_i^{\max})$ FII dashed line lines on the left side of the vertical inflection line). In the State 1 $\rightarrow$ State 2 transition, initially adsorbed mass of both Fib and FII was desorbed from the adsorbent surface as indicated by decreasing solution depletion (increasing bulk solution concentration). Less of both Fib and FII were adsorbed from the binary mixture in State 2 than absorbed from single-protein solutions under identical conditions (vertical arrows pointing downward from the $(D_j^{\max})$ Fib and $(D_i^{\max})$ FII dashed lines on the right side of the vertical inflection line).

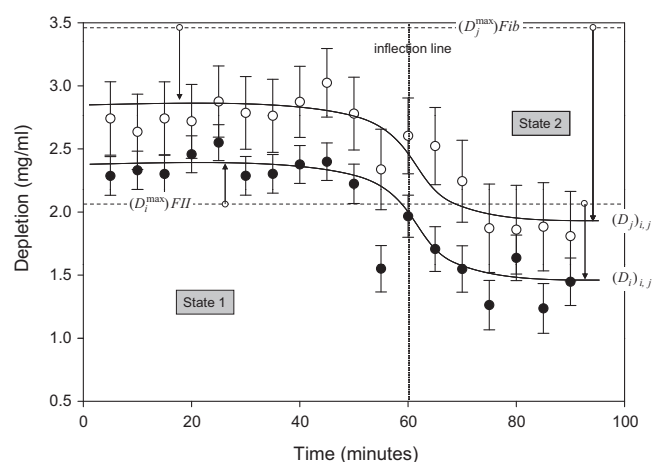


Fig. 2. Adsorption competition between prothrombin (FII) and human fibrinogen (Fib) for the same hydrophobic octyl sepharose adsorbent under Case 5 adsorption condition (Section 2) in which both FII and Fib are at solution concentrations capable of individually and collectively saturating the adsorbent surface. Similar adsorption kinetics were observed for hydrophobized glass particles. Two adsorption regimes were observed: a supersaturated State 1 over the time range $5 \leq t \leq 60$ min followed by a final State 2 over the time range $70 \leq t \leq 90$ min with a transition centered at 60 min lasting for about 20 min. Horizontal dashed lines indicate the solution depletions $(D_i^{\max})$ FII and $(D_j^{\max})$ Fib obtained from single-protein solution at the same concentration used in the adsorption-competition experiment. Notice that more FII was adsorbed in State 1 from binary-protein solution than from single-protein solution whereas less Fib was adsorbed in State 1 from binary-protein solution than from single-protein solution. Transition to State 2 involved expulsion of both FII and Fib initially adsorbed in State 1.

4. Discussion

4.1. Adsorption from single-protein solutions

It has been well established from tensiometric studies that interfacial tensions and contact angles of protein solutions slowly decrease with time (see, as examples, refs. [22–29] and citations therein). Kinetics for larger proteins are observed to be slower than for smaller proteins. Drops of protein solution held either pendant on a needle or placed on an adsorbent surface are usually stagnant, except in the first moments of creation of the interface, so that mass transfer is not affected by stirring. Accordingly, slow change in interfacial tensions and contact angles in the hour timeframe have been interpreted to be due to slow arrival at, and adsorption to, the interface (either liquid–vapor or solid–liquid; see further Section 1).

Adsorption studies carried out by solution-depletion can mimic conditions employed in tensiometry by mixing protein solutions with adsorbent, leaving adsorbent and solution unmixed thereafter. Except for the initial mixing in the first few moments of the experiment, mass transfer is unassisted by mixing. Alternatively, the solution-depletion experiment can be performed with continuous mixing. In either event, mixed or not mixed, no mass adsorption kinetics can be detected within the $5 \leq t \leq 90$ min timeframe accessible to solution depletion as implemented in our experimental program [3,15–18] for adsorption from single-protein solution. Statistically flat kinetics are obtained for a wide range of proteins and different hydrophobic adsorbents, like that shown in Fig. 1.

Quite evidently, factors influencing rates-of-change in interfacial energetics are not the same as those influencing mass adsorption. Mass adsorption is prompt whereas change in interfacial tensions and contact angles is far slower under similar experimental conditions. This observation is entirely consistent with those by made Clark et al. mentioned in Section 1 using a third kind of experimental technique. Collectively, these observations are inconsistent with the adsorption paradigm evolved from

energy-barrier theories that attempt to reconcile fast diffusion with slow change in interfacial tensions. A new adsorption paradigm in which protein diffuses into an inflating interface which subsequently slowly shrinks in volume is consistent with the observed decoupling of mass adsorption and change in interfacial energetics. A slowly shrinking interphase captures adsorbed protein in a decreasing volume which increases interphase concentrations and causes concomitant change in interfacial energetics, as anticipated by the standard adsorption equation mentioned in Section 1.

4.2. Adsorption from binary-protein solution

Measurement of adsorption of two-or-more proteins to the same adsorbent surface by tensiometry is not generally possible [28] but can be achieved using the solution-depletion method implemented with electrophoresis as a separation and quantification tool [14,17]. This work is tedious because at least two categories of relative protein concentration consisting of five different cases must be studied to obtain a comprehensive picture [14]. The first category embraces all combinations of i, j proteins that neither separately nor collectively saturate the adsorbent surface. The second category embraces combinations that separately or collectively saturate the adsorbent surface. Among the four cases comprising this second category, the case when either-and-both i, j proteins saturate the adsorbent surface is perhaps the most interesting and informative about the protein-adsorption process.

Fig. 2 shows that two pseudo-steady state adsorption regimes are obtained. The State 1 interphase is super-saturated with protein relative to the final State 2 obtained within 90 min. State 1 is unstable and slowly decays to a State 2 by expelling initially adsorbed protein. Interestingly, more FII is adsorbed from binary solution in State 1 than adsorbed from single-protein solution and less Fib is adsorbed than from single-protein solution. Less of both proteins is adsorbed in State 2. The transition between State 1 and State 2 is slow, lasting for more than 20 min.

Interestingly, unlike results obtained with single-protein solution discussed in Section 4.1, continuous mixing binary solution with adsorbent strongly affects adsorption outcomes (not shown) [14]. We find that mixing prevents or significantly delays the transition between State 1 and State 2, apparently favoring the super-saturated State 1. We infer from this observation that protein adsorbed in the State 2 interphase is a more organized collection of proteins than State 1 and that mixing prevents or delays establishment of organized adsorbed protein layer(s).

In this latter regard, it has been shown that a relatively straightforward sphere-packing model of protein adsorbed from single-protein solution predicts measurements by both solution depletion and QCM with almost analytical accuracy [21]. Proteins adsorb into one or two layers depending on size, with larger proteins requiring two square-or-hexagonally packed layers. This in mind, we speculate that proteins of a single size can promptly organize into the interphase and concentrate within that interphase by expulsion of interphase water but not adsorbed protein, leading to the flat kinetics observed in Fig. 1. By contrast, finding the most efficient packing of two dissimilar proteins requires time and the expulsion of initially adsorbed protein, leading to the two-adsorption states observed in Fig. 2.

4.3. Implications for biomaterials surface science

The overall paradigm of protein adsorption from multiple-protein solutions evolving from this work is that of individual proteins diffusing into an inflating interphase against individual (as opposed to collective) concentration gradients. The interphase can over fill very rapidly from concentrated (mg/mL) protein solutions relative to a final steady-state and can remain in this overfilled

condition under conditions of flow, apparently indefinitely. Adsorption specificity from binary protein solution appears to be related to relative diffusion rates and concentrations. In fact, adsorption specificity predicted by the classical Stokes–Einstein–Sutherland (SES) equation varies systematically from experimental measurements [14], suggesting that a modified SES equation taking into account changes in diffusivity due to crowding within the interphase could predict protein-adsorption specificity, although this yet remains to be demonstrated.

This new paradigm is quite different than the popular concept of selective protein adsorption due to differential adsorption affinities of different proteins for a particular adsorbent surface. However, it is important to stress that this work is restricted to the first hours of contact of an adsorbent with relatively simple solutions of one or two purified proteins containing no other entities such as biological cells. Extrapolation to long term adsorbent contact with complex biological milieu such as occurs in clinical applications of biomaterials or civil-engineering applications of materials in the environment should be made with great caution.

5. Conclusions

The experimental observation that mass-adsorption kinetics are decoupled from rates-of-change in interfacial tensions implies that energy-barrier theories are inadequate to describe protein-adsorption kinetics. An alternative paradigm in which protein molecules rapidly diffuse into an inflating interphase which subsequently slowly shrinks in volume concentrating adsorbed protein and causing slow concomitant decrease in interfacial tensions is consistent with adsorption kinetics measured by solution depletion and tensiometry. Mass adsorption kinetics observed from binary-protein solution is much more complex than from single-protein solution but can be explained with the same basic adsorption paradigm. The primary difference between adsorption from single- and binary-protein solutions is that the organization of two different sized proteins within the interphase can require significantly longer and may require expulsion of initially adsorbed protein.

Acknowledgments

This work was supported, in part, by the Office of the Higher Education Commission, the Office of National Research Council of Thailand. NB appreciates additional support from the Division of Physics, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Thailand. EAV appreciates support from the National Institutes of Health grant PHS 2R01HL069965, and the Departments of Materials Science and Engineering and Bioengineering, Pennsylvania State University, USA.

References

- [1] A.J. Clark, A. Kotlicki, C.A. Haynes, L.A. Whitehead, A new model of protein adsorption kinetics derived from simultaneous measurement of mass loading and changes in surface energy, *Langmuir* 23 (2007) 5591–5600.
- [2] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29 (2008) 2941–2953.
- [3] N. Barnthip, H. Noh, E. Leibner, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: kinetic consequences of a slowly concentrating interphase, *Biomaterials* 29 (2008) 3062–3074.
- [4] S.R. Milner, On the surface concentration and the formation of liquid films, *Philos. Mag.* 13 (1907) 96–110.
- [5] S. Ross, The change of surface tension with time. I. Theories of diffusion to the surface, *J. Am. Chem. Soc.* 67 (1945) 990–994.
- [6] A.F.H. Ward, L. Tordai, Time-dependence of boundary tensions of solutions I. The role of diffusion in time-effects, *J. Chem. Phys.* 14 (1946) 453–461.
- [7] A.F.H. Ward, L. Tordai, Time-dependence of boundary tensions of solutions, *Recueil* 71 (1952) 572–584.
- [8] A.F.H. Ward, L. Tordai, Existence of time-dependence for interfacial tension of solutions, *Nature* (1944) 146–147.

- [9] P. Schaff, P. Dejardin, Coupling between interfacial protein adsorption and bulk diffusion. A numerical study, *Colloids Surf.* 24 (1987) 239–247.
- [10] R. Varoqui, E. Pefferkorn, Adsorption kinetics at a plane interface: the excluded surface effect, *J. Colloid Interface Sci.* 109 (1986) 520–526.
- [11] J.W. Gibbs, *The Scientific Papers of J. Willard Gibbs*, Dover Publications, New York, 1961.
- [12] E.A. Guggenheim, *Thermodynamics: An Advanced Treatment for Chemists and Physicists*, 5th ed., Wiley, New York, 1967.
- [13] R. Aveyard, D.A. Haydon, *An Introduction to the Principles of Surface Chemistry*, Cambridge University Press, London, 1973.
- [14] N. Barnthip, P. Parhi, A. Golas, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: kinetics of protein–adsorption competition from binary solution, *Biomaterials* 30 (2009) 6495–6513.
- [15] H. Noh, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: partition coefficients, interphase volumes, and free energies of adsorption to hydrophobic surfaces, *Biomaterials* 27 (2006) 5780–5793.
- [16] H. Noh, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: mass and energy balance for albumin adsorption to particulate adsorbents with incrementally increasing hydrophilicity, *Biomaterials* 27 (2006) 5801–5812.
- [17] H. Noh, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: competition from mixtures and the Vroman effect, *Biomaterials* 28 (2007) 405–422.
- [18] H. Noh, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: ion-exchange adsorbent capacity, protein pI, and interaction energetics, *Biomaterials* 29 (2008) 2033–2048.
- [19] P. Parhi, A. Golas, N. Barnthip, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: capacity scaling with adsorbate molecular weight and adsorbent surface energy, *Biomaterials* 30 (2009) 6814–6824.
- [20] P. Parhi, A. Golas, E.A. Vogler, Role of water and proteins in the attachment of mammalian cells to surfaces: a review, *J. Adhes. Sci. Technol.* 24 (2010) 853–888.
- [21] P. Kao, P. Parhi, A. Krishnan, H. Noh, W. Haider, S. Tadigadapa, D.L. Allara, E.A. Vogler, Volumetric interpretation of protein adsorption: interfacial packing of protein adsorbed to hydrophobic surfaces from surface-saturating solution concentrations, *Biomaterials* 32 (2010) 969–978.
- [22] A. Krishnan, J. Sturgeon, C.A. Siedlecki, E.A. Vogler, Scaled interfacial activity of proteins at the liquid–vapor interface, *J. Biomed. Mater. Res.* 68A (2004) 544–557.
- [23] A. Krishnan, C. Siedlecki, E.A. Vogler, Traube-rule interpretation of protein adsorption to the liquid–vapor interface, *Langmuir* 19 (2003) 10342–10352.
- [24] A. Krishnan, A. Wilson, J. Sturgeon, C.A. Siedlecki, E.A. Vogler, Liquid–vapor interfacial tension of blood plasma, serum and purified protein constituents thereof, *Biomaterials* 26 (2005) 3445–3453.
- [25] A. Krishnan, Y.-H. Liu, P. Cha, D.L. Allara, E.A. Vogler, Interfacial energetics of globular–blood protein adsorption to a hydrophobic surface from aqueous–buffer solution, *J. R. Soc. Interface* 3 (2006) 283–301.
- [26] A. Krishnan, Y.-H. Liu, P. Cha, D.L. Allara, E.A. Vogler, Scaled interfacial activity of proteins at a hydrophobic solid/aqueous–buffer interface, *J. Biomed. Mater. Res.* 75A (2005) 445–457.
- [27] P. Cha, A. Krishnan, V.F. Fiore, E.A. Vogler, Interfacial energetics of protein adsorption from aqueous buffer to surfaces with varying hydrophilicity, *Langmuir* 24 (2008) 2553–2563.
- [28] A. Krishnan, C.A. Siedlecki, E.A. Vogler, Mixology of protein solutions and the Vroman effect, *Langmuir* 20 (2004) 5071–5078.
- [29] A. Krishnan, Y.-H. Liu, P. Cha, D.L. Allara, E.A. Vogler, Interfacial energetics of blood plasma and serum adsorption to a hydrophobic self-assembled monolayer surface, *Biomaterials* 27 (2006) 3187–3194.