

**HAREKETLİ YATAK BENZETİMLİ ve ANNULAR
KROMATOĞRAFİ SİSTEMLERİNİN İMALATI: ANNULAR
KROMATOĞRAFİDE BSA SAFLAŞTIRMA PERFORMANSININ
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MANUFACTURE of SIMULATED MOVING BED and ANNULAR
CHROMATOGRAPHY SYSTEMS: ASSESSMENT of BSA
PURIFICATION PERFORMANCE in ANNULAR
CHROMATOGRAPHY**

GONCA SAĞLAM

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

olarak hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :
Prof.Dr. Erdoğan ALPER

Üye (Danışman) :
Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL

Üye :
Prof.Dr. Ali BİLGESU

Üye :
Prof.Dr. Deniz TANYOLAÇ

Üye :
Doç.Dr. İsmail Hakkı BOYACI

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

HAREKETLİ YATAK BENZETİMLİ ve ANNULAR KROMATOĞRAFI SİSTEMLERİNİN İMALATI: ANNULAR KROMATOĞRAFİDE BSA SAFLAŞTIRMA PERFORMANSININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Gonca Sağlam

ÖZ

Bu tez çalışmasında, iki farklı sürekli kromatografi sistemi olan "Hareketli Yatak Benzetimli Kromatograf (SMB)" ve "Sürekli Annular Kromatograf (CAC)" cihazlarının imalatı gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda, hareketli yatak benzetimli kromatograf ünitesinin karmaşık işlergesini bilgisayarla kontrol edebilmek için gerekli olan yazılım algoritması, tez dahilinde hazırlanmıştır.

Tezin diğer bir hedefi de, sığır kanından başlanılarak CAC cihazı ile yüksek safiyette Bovin Serum Albumin (BSA) elde edilmesidir. Bu amaçla yapılan deneylerde, CAC cihazı Q Sepharose XL reçinesi ile doldurulmuş ve çeşitli filtrasyon basamaklarında geçirilerek elde edilen sığır kan serumu CAC ye sürekli olarak beslenmiştir. Bu şekilde elde edilen BSA nın, karşılaştırılmalı olarak yapılan gözle muayene, FTIR spektroskopisi ve HPLC kromatogram sonuçları, tarafımızca tasarlanıp imal ettirilen CAC sistemi ile çok yüksek safiyetteki BSA nın sürekli olarak elde edilmesinin mümkün olduğunu göstermiştir.

Tezin bir diğer safhasında, sürekli olarak ayırma yapabilen SMB sistemi için, denge-dışı (non-equilibrium) adsorpsiyon modelleme tekniği kullanılarak bir matematiksel model geliştirilmiştir. Ayrıca CAC için grubumuzca daha önceden ileri sürülen denge-dışı model ile kullanılarak, BSA saflaştırılmasına yönelik deneysel çalışmaların simülasyonu yapılmıştır. Model parametrelerinden biri olan, annular kromatografte BSA adsorpsiyonunda kullanılacak olan "Q Sepharose XL" anyon değiştirici adsorbent sistemi için homojen difüzyon katsayısı, D_s değerinin bulunması amacıyla, yine grubumuz tarafından ileri sürülen ve denge dışı (non-equilibrium) yaklaşımına dayanan yeni bir yöntem kullanılmıştır. Tarafımızca ileri sürülen yöntem ile homojen difüzyon katsayısı D_s , $1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sn}$ olarak tayin edilmiş ve literatür çalışmaları sonucu bulunan değerler ile uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Hareketli yatak benzetimli kromatografi, sürekli annular kromatografi, bovin serum albumin, denge dışı modelleme, homojen difüzyon katsayısı.

Danışman: Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

MANUFACTURE of SIMULATED MOVING BED and ANNULAR CHROMATOGRAPHY SYSTEMS: ASSESSMENT of BSA PURIFICATION PERFORMANCE in ANNULAR CHROMATOGRAPHY

Gonca Sağlam

ABSTRACT

In this thesis study, manufacture of two continuous chromatographic systems named “Simulated Moving Bed Chromatography (SMB)” and “Continuous Annular Chromatography (CAC)” is performed. According to this scope, in order to control the complex operation of simulated moving bed chromatography with computer, necessary software algorithm is prepared, including the thesis work.

Another goal of thesis is to achieve high purity Bovine Serum Albumin (BSA) starting from bovine plasma and ended with CAC equipment. In the experiments performed due to this aim, the CAC equipment is packed with Q Sepharose XL adsorbent and bovine blood plasma that is passed through various filtration steps, is fed continuously to the CAC unit. Purified BSA is investigated comparatively by eye examination, FTIR spectroscopy and HPLC chromatogram. These results show that it is possible to achieve high purity BSA continuously with CAC designed and manufactured by us.

In the other stage of the thesis, a mathematical model based on non-equilibrium adsorption technique is developed for SMB system which enables to continuous separation. In addition to that simulation studies are done for BSA purification with annular chromatography by using non-equilibrium model which was proposed by our group beforehand. One of the model parameters, homogeneous diffusion coefficient, D_s , is found for anion exchange adsorbent, “Q Sepharose XL” that is used in BSA adsorption in annular chromatography. In order to find D_s value a new technique based on non-equilibrium approach is proposed by our group. D_s value is determined by us as $1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ and compared with those given in literature studies.

Keywords: Simulated moving bed chromatography, continuous annular chromatography, bovine serum albumin, non-equilibrium modelling, homogeneous diffusion coefficient.

Advisor: Prof. Dr. Ahmet R. ÖZDURAL, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering, Chemical Engineering Section

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitiminin boyunca, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle daima beni yüreklendiren, tez çalışmam sırasında bana her türlü olanağı sağlayan, öğrencisi olmaktan çok büyük gurur duyduğum ve hayatım boyunca örnek alacağım çok değerli hocam, Sayın Prof. Dr. Ahmet R. Özdural'a,

Yüksek lisans eğitiminin boyunca manevi desteğini her zaman üzerimde hissettiğim, her türlü sorunumda yardımına koşan, Sayın Prof. Dr. Deniz Tanyoloç'a,

Laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan ve her konuda bana içtenlikle destek olduğunu bildiğim hocam, Sayın Prof. Dr. Süleyman Ali Tuncel'e,

Tez çalışmalarımın yürütülmesinde çok büyük emeği olan, bilgisi ve deneyimiyle yardımlarını benden hiç esirgemeyen laboratuvar arkadaşım Sayın Gönül Akkaya'ya,

Çalışmalarımı sürdürdüğüm süre boyunca arkadaşlıklarını ve yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, bana her konuda destek olan sevgili arkadaşlarım Yasemin Onaran, Pınar Gördesli, Ceyda Büyüknohutçu, Işıl Gerçek Beşkardeş ve Mine Önder'e,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen, attığım her adımda arkamda olup, bana güvenen anneme, babama ve canım kardeşlerim Gamze ve Simge'ye en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kromatografi	5
2.2. Ayrılma Mekanizmalarına göre Kromatografi Teknikleri	6
2.2.1. Adsorpsiyonu kromatografisi	6
2.2.2. Partisyon kromatografisi	7
2.2.3. İyon değiştirme kromatografisi.....	8
2.2.4. Jel filtrasyon kromatografisi	9
2.3. Uygulama Biçimine göre Kromatografi Teknikleri	9
2.3.1. Düzlemsel kromatografi	9
2.3.2. Kolon kromatografisi	10
2.4. Faz Tipine göre Kromatografi Teknikleri	10
2.4.1. Sıvı kromatografisi	10
2.4.2. Gaz kromatografisi.....	12
2.4.3. Süperkritik akışkan kromatografisi.....	13
2.5. Elüsyon Kromatografisinden Sürekli Kromatografiye Geçiş.....	14
2.6. Hareketli Yatak Benzetimli Kromatografisi (SMB).....	19
2.6.1. Hareketli yatak kromatografisi (TMB) çalışma prensibi	21
2.6.2. Hareketli yatak benzetimli kromatografisi (SMB) çalışma prensibi	25
2.6.3. SMB teknolojisinin uygulanması	27
2.6.4. SMB proses modifikasyonları	30
2.7. Sürekli Annular Kromatografisi (CAC).....	38
2.7.1. Sürekli annular kromatografisi çalışma prensibi	40
2.7.2. Sürekli annular kromatografisi teknolojisinin uygulanması	42
3. SÜREKLİ KROMATOĞRAFİK SİSTEMLERİN TEORİK ANALİZİ	45
3.1. Hareketli Yatak Benzetimli Kromatograf Sistemi için Matematiksel İfadelerin Türetilmesi	45
3.1.1. TMB model yaklaşımı esas alınarak matematiksel ifadelerin türetilmesi ...	47

3.1.2. Denge-dışı adsorpsiyon kabulü ile SMB model yaklaşımının modifikasyonu.....	51
3.2. SMB Optimizasyon Tekniğinin Geliştirilmesi - Üçgen Teorisi	59
3.2.1. Lineer adsorpsiyon izoterm durumu için üçgen teorisinin geliştirilmesi.....	60
3.2.2. Langmuir adsorpsiyon izoterm durumu için üçgen teorisinin geliştirilmesi .	65
3.2.3. MATLAB programı ile (m_2 , m_3) üçgen düzleminin elde edilmesi	68
3.3. SMB İşletme Parametrelerinin Belirlenmesi.....	69
3.4. SMB Performans Parametrelerinin Belirlenmesi.....	71
3.5. Sürekli Annular Kromatograf Sistemi için Denge-dışı Modelin Modifikasyonu.....	73
4. SÜREKLİ KROMATOĞRAFİK SİSTEMLERİN İMALAT ÇALIŞMALARI	82
4.1. Hareketli Yatak Benzetimli Kromatograf (SMB) Cihazının İmalatı.....	82
4.2. Sürekli Annular Kromatograf (CAC) Cihazının İmalatı ve Yatağın Sabit Faz ile Doldurulması	87
4.2.1. Basınçlı sürekli annular kromatograf cihazının imalatı	87
4.2.2. Annular kromatografte partikül yatağının sabit faz ile doldurulması.....	90
5. ANNULAR KROMATOĞRAFİDE BOVIN SERUM ALBUMİN SAFLAŞTIRMA PERFORMANSININ İNCELENMESİ.....	94
5.1. Sığır Kanından Serum Eldesi ve Serumun İşlenmesi	94
5.1.1. Sığır kan serumunun tanjant akış filtrasyon aşaması	95
5.1.2. Tanjant filtrasyon sonucunda filtrat olarak elde edilen serumun HPLC kromatogramı	98
5.2. Döner Kromatograf ile Sürekli Yöntemle Serumdan BSA Ayrılması ve Saflaştırılması Deneyleri	100
5.2.1. Beslemenin hazırlanması	100
5.2.2. Q Sepharose XL reçinesi ile doldurulmuş annular kromatograf yatağının yıkanması ve şartlandırılması	100
5.2.3. Spektrofotometrik yöntemle bovin serum albumin (BSA) konsantrasyon tayini için çalışma eğrisinin hazırlanması	101
5.2.4. Annular kromatograf cihazı ile serumdan BSA ayrılması ve saflaştırılması.....	103
5.3. Elde Edilen Bovin Serum Albuminin (BSA) Karakterizasyonu.....	106
5.3.1. Gözle muayene	107
5.3.2. FTIR spektroskopisi.....	108
5.3.3. Ticari BSA (Ambresco, Inc., A.B.D.) ile annular kromatografi cihazında saflaştırılan BSA'nın safiyetinin karşılaştırılması: HPLC kromatogramları..	110

6.	ANNULAR KROMATOGRAFTA SAFLAŞTIRILAN BSA İÇİN SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI.....	113
6.1.	Homojen (Katı) Difüzyon Katsayılarının Hesaplanmasında Yeni Bir Yöntem: Batch Sistemin (Batch Uptake) Denge-dışı Modellenmesi	113
6.1.1.	Sıvı film kütle aktarım katsayısının bulunması	115
6.1.2.	Homojen difüzyon katsayısının bulunması	117
6.2.	Batch Adsorpsiyon Deneyleri.....	120
6.2.1.	Materyal ve yöntem	120
6.2.2.	Langmuir izoterm sabitlerinin bulunması	121
6.3.	Kinetik Adsorpsiyon Deneyleri	123
6.3.1.	Film kütle aktarım katsayısı	124
6.3.2.	Homojen difüzyon katsayısı	126
6.4.	Simülasyonda Kullanılan Parametreler	127
6.5.	Simülasyon Sonuçları.....	133
7.	SONUÇLAR	138
8.	KAYNAKLAR.....	141
9.	EKLER	152
	EK-1. SMB YAZILIM PROGRAMI	152
	EK-2.SIĞIR KANI ÖN FİLTASYON İŞLEMLERİ.....	158
10.	ÖZGEÇMİŞ.....	160

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1.a. Karışımı oluşturan A ve B bileşenlerinin kromatografik yöntemle ayrılma diagramı.....	1
Şekil 1.1.b. Elüsyonun farklı evrelerindeki dedektör sinyali, kromatogram	1
Şekil 2.1. Ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tipine göre kromatografik yöntemler.....	6
Şekil 2.2. Adsorpsiyon ve partiyon kromatografik süreçlerinin şematik gösterimi ...	8
Şekil 2.3. Kolon kromatografi prensibi	10
Şekil 2.4. Klasik elüsyon kromatografisi çalışma prensibi.....	14
Şekil 2.5.a. Mekanik olarak dönen yatak ve radyal akış ile ayırma.....	16
Şekil 2.5.b. Akış yönü değiştirerek ayırma	16
Şekil 2.5.c. Manyetik olarak sabitlenmiş yatak ile ayırma	17
Şekil 2.6. Sürekli kromatografik sistemlerin çalışma yöntemi	18
Şekil 2.7. Hareketli yatak kromatografisi (TMB) çalışma prensibi	22
Şekil 2.8.a. TMB çalışma prensibi, klasik kromatografik kolonun yatay konuma getirilmiş hali	23
Şekil 2.8.b. TMB çalışma prensibi, katı faz hareketi	23
Şekil 2.8.c. TMB çalışma prensibi, rafinat ve ekstrat akımlarının iki ayrı fraksiyona ayrılması	23
Şekil 2.9. TMB yaklaşımından SMB prensibine geçiş.....	25
Şekil 2.10. Hareketli yatak benzetimli kromatografisi (SMB) çalışma prensibi.....	26
Şekil 2.11. SMB teknolojisinin tarihsel gelişim süreci	29
Şekil 2.12. Varicol prensibi, üç farklı zamanda port pozisyonlarının senkronize olmayan değişimi.....	31
Şekil 2.13. Powerfeed, bir periyot içinde akış hızı değişim örneği	33
Şekil 2.14. SMB ve Modicon prosesinde ürün konsantrasyon profilleri	34
Şekil 2.15. SMB-geri besleme yöntemi şematik gösterimi	35
Şekil 2.16. Sürekli annular kromatografi sistemi ile ayırma işlemi	39
Şekil 2.17. Sürekli annular kromatografi sisteminin şematik gösterimi	40
Şekil 3.1. SMB sisteminde deneysel ve simülasyon çalışmaları sonucu elde edilen ürün konsantrasyon profilleri	46
Şekil 3.2. Hareketli yatak kromatografi (TMB) prosesi	47
Şekil 3.3.a. Yerel denge adsorpsiyon modeli, c ile \bar{q} dengede olduğu durum.....	52
Şekil 3.3.b. Denge-dışı adsorpsiyon modeli, c^* ile q^* dengede olduğu durum	53
Şekil 3.4. Ekstrat ve rafinat bileşenlerinin bir periyot içindeki zone akış yönleri.....	62
Şekil 3.5. Lineer adsorpsiyon izotermine sahip sistemler için, (m_2, m_3) düzleminde dört farklı ayrılma bölgesi	64

Şekil 3.6.	Langmuir adsorpsiyon izotermine sahip sistemler için, (m_2 , m_3) düzleminde dört farklı ayrışma bölgesi	67
Şekil 3.7.	Langmuir adsorpsiyon izotermine sahip SMB sistemi için üçgen düzlemi.....	69
Şekil 3.8.	Altı ve sekiz kolondan oluşan SMB sisteminde kolon konfigürasyon seçenekleri	70
Şekil 3.9.	Sürekli annular kromatografi sisteminin şematik görünümü	74
Şekil 3.10.	Annular kromatografide matematiksel ifadelerin türetilmesi sırasında kullanılacak kontrol hacminin gösterimi	74
Şekil 4.1.	Hareketli yatak benzetimli kromatograf (SMB) akım şeması.....	82
Şekil 4.2.	Tasarımı yapıp, imal ettirilen hareketli yatak benzetimli kromatograf (SMB) cihazının önden görünüşü	86
Şekil 4.3.	SMB cihazının, kolon bağlantılarının yakından görünüşü	87
Şekil 4.4.	Tasarımı yapıp, imal ettirilen döner annular kromatograf cihazının önden görünüşü	89
Şekil 4.5.	Tasarımı yapıp, imal ettirilen döner annular kromatograf cihazına dair bazı detaylar.....	90
Şekil 4.6.	Sürekli annular kromatografte partikül yatağının şematik gösterimi	91
Şekil 5.1.	Normal akış ve tanjant akış filtrasyonunun şematik gösterilişi	95
Şekil 5.2.	Deneylerde kullanılan tanjant akış filtrasyon sistemi.....	96
Şekil 5.3.	Tanjant akış filtrasyonunda filtrat tarafına geçen sığır kan serumu kromatogramı	99
Şekil 5.4.	BSA çalışma grafiği	103
Şekil 5.5.	Annular kromatografte elüent çıkış konsantrasyonunun açısal değişimi.....	105
Şekil 5.6.	BSA içeren üç örneğin fotoğrafları	107
Şekil 5.7.	Ticari BSA'nın (Amresco Inc., A.B.D.) Amid I ve Amid II bölgesindeki FTIR spektrumu.....	109
Şekil 5.8.	Tez kapsamında sığır kan serumundan başlanılarak son basamak olan annular kromatografi cihazında sürekli bir şekilde ayrılıp saflaştırılan BSA'nın Amid I ve Amid II bölgesindeki FTIR spektrumu ..	110
Şekil 5.9.	Tez kapsamında saflaştırılan BSA ve ticari BSA, HPLC kromatogramların karşılaştırılması	112
Şekil 6.1.	Batch sistem deneylerinin (batch uptake) şematik gösterimi.....	114
Şekil 6.2.	Denge-dışı adsorpsiyon modeli, c_s^* ile q_s^* dengede olduğu durum	114
Şekil 6.3.	Batch uptake deneylerinden k_f değerinin hesaplanması	116
Şekil 6.4.	DeneySEL verilerle uyum sağlayan D_s değerinin model yardımıyla bulunması.....	120
Şekil 6.5.	Batch adsorpsiyon deneylerinin şematik gösterimi	121
Şekil 6.6.	DeneySEL olarak bulunan adsorpsiyon izoterm eğrisi.....	122
Şekil 6.7.	Adsorpsiyon izoterm eğrilerinin lineerleştirilmesi	122
Şekil 6.8.	Farklı başlangıç konsantrasyonlardaki BSA çözeltileri için tanktaki çözelti konsantrasyonunun zamanla değişimi.....	124

Şekil 6.9.	Batch sistem karıştırmalı kapta $-\ln(C/C_0)$ 'a karşı zaman (t) grafiği	125
Şekil 6.10.	Homojen difüzyon katsayısı hesaplanmasında model çıktısı ve deneysel verilerin karşılaştırılması	127
Şekil 6.11.	Kolon çıkışındaki sıvı konsantrasyonunun açısal yönde değişimi	133
Şekil 6.12.	Bir tam tur için yığın sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi	134
Şekil 6.13.	Bir tam tur için ortalama katı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi	135
Şekil 6.14.	Bir tam tur için ara yüzey sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi	136
Şekil 6.15.	Bir tam tur için ara yüzey katı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi	137

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1. Q Sepharose XL nin özellikleri.....	93
Çizelge 5.1. Tanjant akış filtrasyon çalışma parametreleri.....	97
Çizelge 5.2. HiPrep 16/10 Q XL kolon bilgileri	98
Çizelge 5.3. Üretilen BSA ile karşılaştırılacak ticari BSA'nın özellikleri.....	102
Çizelge 6.1. Simülasyonda kullanılan parametreler.....	132

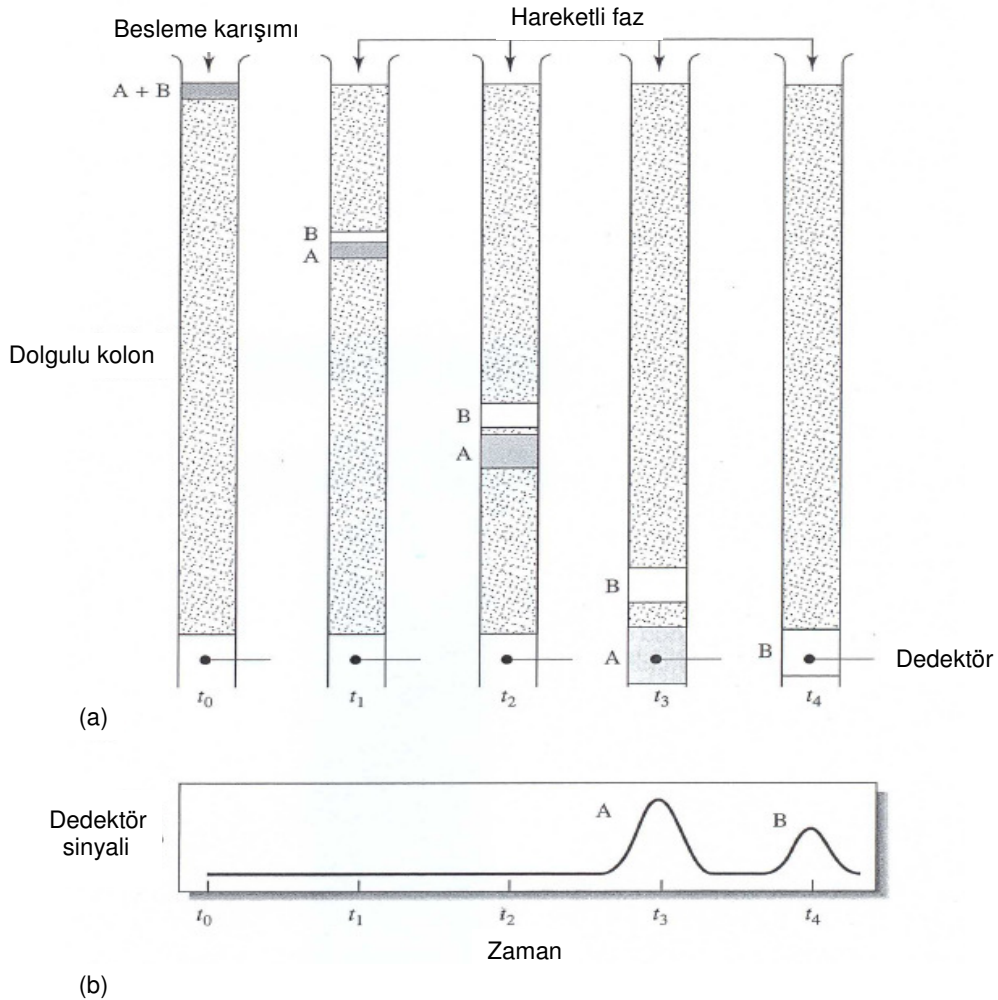
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Ekstrat akımını oluşturan bileşen
A_{C1}, A_{C2}	Kontrol hacmi için kesit alanları (cm^2)
B	Rafinat akımını oluşturan bileşen
Bi	Biot sayısı
c_o	Annular kolona verilen besleme çözeltisinin başlangıç konsantrasyonu (mg/cm^3)
c	Yatak boşluklarındaki yığın sıvı konsantrasyonu (mg/cm^3)
c_s^*	Adsorbent yüzeyindeki katı konsantrasyonu q_s^* ile dengedeki sıvı konsantrasyonu (mg/cm^3)
D	Elüent
D_a	Görünen eksenel dispersiyon katsayısı (cm^2/s)
D_x	Eksenel yöndeki moleküler difüzyon katsayısı (cm^2/s)
D_θ	Açısal yöndeki moleküler difüzyon katsayısı (rad^2/s)
D_s	Partikül içi kütle aktarım katsayısı (cm^2/s)
F	Besleme
H_i	i bileşenin Henry sabiti
i	Karışımı oluşturan ürünler ($i = A, B$)
j	Zone numararası ($j = 1, 2, 3, 4$)
k_f	Film kütle aktarım katsayısı (cm/s)
K	Langmuir sabiti (mg/cm^3)
L	Annular kolonun boyu (cm)
m_j	j zone'da sıvı faz akış hızı oranı
N_T	SMB sistemini oluşturan toplam kolon sayısı

q	Adsorbentin birim hacmi başına adsorplanan madde miktarı (mg/cm ³ katı)
q_m	Yüzeyde tek tabaka oluşturmak için adsorbentin birim ağırlığı başına adsorplanan en yüksek madde miktarı (mg/cm ³)
q_s^*	Adsorbent yüzeyine en yakın noktadaki sıvı konsantrasyonu c_s^* , ile dengedeki katı konsantrasyonu (mg/cm ³ katı)
\bar{q}	Ortalama hacimsel katı konsantrasyonu (mg/cm ³ katı)
r_p	Adsorbent partikülünün yarıçapı (cm)
R	Kolonun yarıçapı (cm)
ω_i	i bileşeni için denge teorisi parametresi
ω	Annular kolonun açısal dönüş hızı (rad/cm)
W	Adsorbent ağırlığı (g)
x	Annular kolonda aksenal koordinat (cm)
t	Zaman (s)
u	SMB kolon içerisindeki çözeltinin boş kolon hızı (cm/s)
u_s	Katı faz akış hızı (cm/s)
v	Annular kolon içerisindeki çözeltinin boş kolon hızı (cm/s)
ε	Yatağın boşluk kesri
ρ	Adsorbentin yoğunluğu (g/cm ³)
η	Belli bir θ açısına karşılık gelen yayın uzunluğu (cm)
θ	Annular kolonda açısal koordinat (rad)

1. GİRİŞ

Kromatografi, bir karışımı oluşturan bileşenlerin yapılarına veya kompozisyonlarına bağlı olarak birbirinden ayrılmasını inceleyen bilim dalıdır. Kromatografik yöntemlerde, genellikle bileşenler bir destek maddesi boyunca ilerlerler. Karışımı oluşturan her bir bileşenin, bu sabit faz ile ilişkisi farklı olacağından, ayırım gerçekleşir. Sabit faz ile ilişkisi kuvvetli olan moleküller, sabit faz boyunca yavaş ilerlerken; sabit faz ile daha zayıf ilişkisi olan moleküller, sabit faz üzerinde daha hızlı ilerler. Böylelikle farklı moleküllerin sabit faz boyunca ilerleme hızları farklı olacağından, sabit fazı farklı zamanlarda terk ederler ve farklı yapılarıdaki moleküllerin birbirinden ayrılması sağlanmış olur.



Şekil 1.1. (a) Karışımı oluşturan A ve B bileşenlerinin kromatografik yöntemle ayrılma diagramı. (b) Elüsyonun farklı evrelerindeki dedektör sinyali, kromatogram

Şekil 1.1.(a) 'da A ve B bileşenlerinin sabit faz (reçine) ile dolu kromatografik kolon boyunca ayrılması gösterilmektedir. Hareketli faz ile çözülmüş bir miktar besleme karışımının kolona verilmesi ile karışımı oluşturan bileşenler iki faz arasında dağılırlar. Hareketli fazın (elüent) kolona beslenmesi ile bileşenlerin kolon boyunca yıkanması sağlanır. Bileşenlerin elüent yardımıyla sabit faz üzerinden yıkanması sonucu kolonu terk ettikleri bu olaya elüsyon adı verilmekte ve bileşenlerin sabit faza olan ilgilerine bağlı olarak kolon boyunca farklı hızlarda ilerlemeleri ile ayırım gerçekleşmektedir. Kromatografik kolonun çıkışına, dedektör yerleştirildiği takdirde, kolonu terk eden bileşenlerin zamana bağlı konsantrasyon profilleri elde edilir. Elde edilen kromatogram ile besleme karışımının nitel ve nicel analizini yapmak mümkündür. Piklerin zamana bağlı pozisyonları ile karışımı oluşturan bileşenlerin tayini yapılabilmekte ve piklerin altında kalan alanın hesaplanması ile her bileşenin karışım içindeki miktarı belirlenebilmektedir.

Kromatografik ayırımlar çeşitli destek maddeleri (sabit faz) kullanılarak gerçekleşir. Bunlara örnek olarak, cam bir tabaka üzerine sabitlenmiş silika matris (ince tabaka kromatografisi), uçucu gaz (gaz kromatografisi), kağıt (kağıt kromatografisi) veya hidrofilik, çözünmeyen moleküllerden oluşan sıvılar (sıvı kromatografisi) verilebilir.

Çoğu zaman, karmaşık ve çok komponentli çözeltilerden komponentlerin ayrılmasında sıvı kromatografisi tek seçenek olarak ortaya çıkar. Bu duruma en güzel örneklerden birisi endüstriyel biyoteknolojidir. Sıvı kromatografisi ile esnek ve yüksek safiyette ayırma yapmak mümkündür. Proteinler, antikorlar, nükleik asit ve diğerleri karmaşık yapıdaki biyomoleküllerdir. Bu tür moleküllerin ayrılmasında elektrostatik, iyon değiştirme, hidrofobik ve diğer özelliklerden yararlanılır. Laboratuvar ölçeğindeki ayırma işlemlerinde dolgulu kolon tipi sistemler sıkça kullanılır. Bununla beraber dolgulu kolonlarda özellikle endüstriyel/preperatif ölçekteki ayırma işlemlerinde yatağın doyurulması, elüsyon ve diğer çözeltilerinin ilavesi gibi işlemlerin kesikli bir yapıda yürütülmesi sonucunda, kromatografik saflaştırmalarda kapasite açısından sınırlayıcı bir durum ortaya çıkar.

Hareketli Yatak Benzetimli Kromatografi (simulated moving bed chromatography , SMB) ve Sürekli Annular Kromatografi (continuous annular chromatography, CAC)

sürekli kromatografik prosesler olup, özellikle son 10 yıl içerisinde farmasötik kimya, gıda kimyası, biyokimya ve petrokimya alanlarında büyük boyutlu ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır. Hareketli yatak benzetimli kromatografi, besleme karışımının, iki ayrı akım halinde ürünlere ayrışmasını sağlayan, sürekli bir sistemdir. SMB prosesinde, kolon içindeki reçinenin kolon boyunca hareketi simule edilmiştir. Bu simulasyon sonucunda katı faza adsorpsiyon ilgisi fazla olan bileşen katı faz yönünde hareket ederken, adsorpsiyon ilgisi az olan bileşen ters yönde kolondan çıkmaktadır. Böylelikle, SMB teknolojisinde ürünler, kolonun farklı bölgelerinden, iki ayrı fraksiyona ayrılmış şekilde elde edilmektedir. Sürekli annular kromatografi ise, iç içe geçmiş iki silindirden oluşmaktadır. Annulus adı verilen bu iki silindir arasına, sabit fazı oluşturan adsorbent doldurulmakta ve ayırma işlemi sırasında annular yatak düşey eksenini etrafında sabit bir açısal hız ile sürekli olarak dönmektedir. Böylelikle karışımı oluşturan bileşenler besleme enjeksiyon noktasına göre farklı açısal konumlardan kolonu terk etmesi prensibi ile ayırım sağlanmaktadır.

Bu tezde, sürekli kromatografik sistemleri oluşturan, laboratuvar ölçekli “Hareketli Yatak Benzetimli Kromatografi” cihazı ile “Sürekli Annular Kromatografi” cihazının imalatı gerçekleştirilmiştir.

Deneysel çalışmalarda Bovin Serum Albumin (BSA) saflaştırılması amaçlanmaktadır. Preperatif batch kromatografik teknikleri kullanarak yüksek safiyette BSA elde etmek mümkündür. Ancak bu şekildeki kesikli preperatif kromatografinin en büyük dezavantajı elde edilen üstün nitelikli BSA'nın maliyetinin yüksek olmasıdır. İmalatı gerçekleştirilen sürekli annular kromatograf cihazında BSA'nın saflaştırılmasının performansının incelenmesi tezin bir diğer amacını oluşturmaktadır. Döner annular kromatografte saflaştırılan BSA karakterizasyonu, gözle muayene, FTIR spektroskopisi ve saflaştırılan BSA ile ticari BSA'nın HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması ile yapılmış ve sonuç olarak tez kapsamında saflaştırılan BSA'nın, % 98'in üzerinde bir safiyette olduğu belirlenmiştir.

İmalatı tamamlanan hareketli yatak benzetimli kromatograf ve sürekli annular kromatograf cihazlarının teorik analizi yapılmış, bu iki sistem için matematiksel ifadelerin türetilmesinde, denge-dışı (non-equilibrium) model yaklaşımı (Özdural et al., 2004) esas alınmıştır. Böylelikle işletme sırasında birbirlerinden çok farklı tepkiler

veren ve uyum içerisinde bulunmayan kütle aktarım dirençleri ve aksel dispersiyon terimi birbirlerinden ayrı ele alınmıştır. Bu nedenle, denge dışı adsorpsiyon kabulü ile kolon içerisinde varolan dinamik durum, gerçeği yansıtmaktadır. Bunun yanında, SMB sistemi için geliştirilen ve literatürde çalışmalarında sıkça bahsedilen optimizasyon tekniğine (üçgen teorisi) ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

Döner kromatograf için modifiye edilen non-equilibrium model ifadelerinin türetilmesi sonucu, BSA saflaştırılmasına yönelik deneysel çalışmaların simülasyonu yapılmıştır. Model parametrelerinden biri olan, annular kromatografte BSA adsorpsiyonunda kullanılacak olan “Q Sepharose XL” anyon değiştirici adsorbent sistemi için homojen difüzyon katsayısı, D_s bulunmuştur. Homojen (katı) difüzyon katsayısı, D_s değerinin bulunmasında, tarafımızca geliştirilen denge dışı (non-equilibrium) yaklaşımına dayanan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Simülasyon sonucu elde edilen üç boyutlu grafiklerde, döner kromatografte, BSA saflaştırma işlemi sırasında yığın sıvı konsantrasyonu, ortalama katı konsantrasyonu ve denge-dışı adsorpsiyon model tekniğine göre birbiri ile dengede olduğu kabul edilen, adsorbent yüzeyindeki sıvı konsantrasyonu, ile adsorbent yüzeyindeki katı konsantrasyonunun, açılal konuma ve kolon boyuna bağılı değişimi elde edilmiştir.

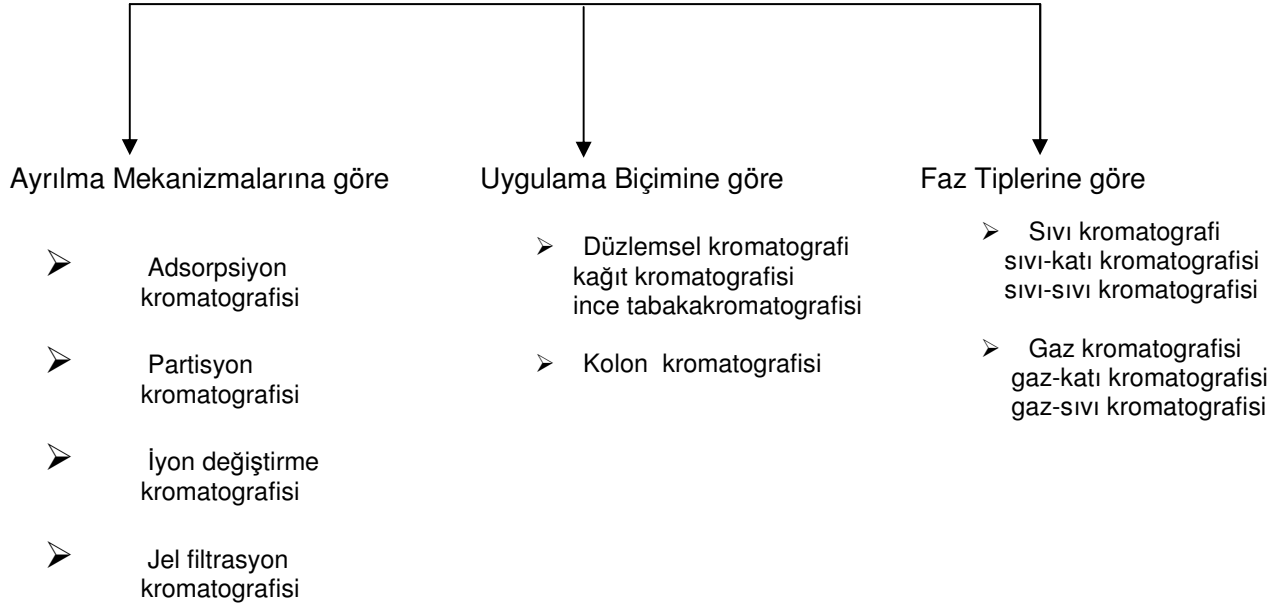
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) faz yardımıyla, sabit faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanan analitik bir ayırma yöntemidir. Kromatografik yöntemler ile, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımların birbirlerinden ayrılabilirdiği gibi aynı zamanda her bileşen için niceleyici tahminlerde bulunma imkanı da vardır. Bütün kromatografik tekniklerde, birbiri ile karışmayan hareketli ("mobile") ve sabit ("stationary") olmak üzere iki faz bulunmaktadır. Bileşenlerine ayrılmak istenen karışım, taşıyıcı akışkan faz içerisinde sabit fazdan geçirilir ve karışım içerisindeki maddeler sabit faza olan bağıl ilgilerine göre beslendikleri kolonu farklı sürelerde terk ederler. Böylelikle bileşenler birbirlerinden ayrılmış olur. Kromatografik tekniklerin kalitatif olması yanında kantitatif kullanım alanı da çok geniştir. Ayrıca preparatif kullanımı sonucu, saf madde elde etmek kromatografinin en yararlı özelliklerinden biridir.

Kromatografik ayırma yöntemi, ilk olarak Rus botanikçi Mikhail Semenovitch Tswett tarafından 1906 yılında ileri sürülmüştür. Tswett, bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırma amacıyla kullanmıştır. Kullandığı kolonda renkli bantlar oluşması sebebiyle de bu ayırma yöntemine, renk anlamına gelen "chroma" ve yazmak anlamına gelen "grafein" kelimelerinden türettiği kromatografi ("chromatography") adını vermiştir (Bussemas, Etre, 1994). Günümüzde bütün kimya ve biyoloji alanlarında geniş şekilde de kullanılmakta olan bu teknik sürekli olarak gelişmekte ve yeni uygulama alanları bulmaktadır.

Genel olarak kromatografi, karışımdaki bileşenlerin daha sonra kullanmak amacıyla ayrıldığı preparatif kromatografi ve düşük miktarda karışımlar ile çalışılan, karışımı oluşturan bileşenlerin miktarını ölçmeyi hedefleyen analitik kromatografi olmak üzere ikiye ayrılır. Geliştirilen kromatografik teknikler, Şekil 2.1.'de verildiği gibi ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tipine göre üç ana başlık altında incelenebilir.



Şekil 2.1. Ayrılma mekanizmalarına, uygulama biçimine ve faz tipine göre kromatografik yöntemler

2.2 Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografi Teknikleri

2.2.1. Adsorpsiyon kromatografisi

Adsorpsiyon bir karışımda bulunan sıvı veya gaz halindeki maddelerin katı faz üzerine tutunması olayıdır. En yaygın kullanılan kromatografik tekniklerden biri olan adsorpsiyon kromatografisi ise, örnek bileşenlerinin dolgu maddesinin (adsorban) yüzeyinde farklı olarak tutunmaları sonucu meydana gelen ayırma işlemidir. Bileşenler birbirlerinden, katı yüzeye olan farklı derecelerdeki adsorpsiyon ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun kalırken, küçük olan daha kısa sürede sabit faz yüzeyinde kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise kolonda hiç geciktirilmeden hareketli faz ile taşınarak dışarı çıkmaktadır. Yüzeye adsorplanan bileşenler ise yüzeye etkileşmelerine bağlı olarak kolon içinde farklı kalma sürelerinde kolonu terk ederler.

Adsorban yüzeyi ile tutunan madde arasında kimyasal bağ oluşumu söz konusu değildir. Sadece geçici olarak fiziksel bir bağ meydana gelir. Bu durumda madde adsorban yüzeyine elektrostatik kuvvetler, dipol-dipol çekimi veya Van der Waals

kuvvetleri ile geçici bir süre için tutunur. Yığın akışkandaki moleküllerin adsorbent yüzeyine adsorpsiyonu başlıca üç basamakta gerçekleşir (Alkan, 2003);

1. Moleküllerin yığın akışkandan, sıvı filmini geçerek, adsorbent yüzeyine taşınımı,
2. Moleküllerin adsorbent partikülü içerisine difüzyonu,
3. Moleküllerin adsorbent yüzeyine adsorpsiyonu.

İlk basamakta yığın akışkanda bulunan moleküller, adsorbent partikülünü saran sıvı filmini geçerek adsorbent yüzeyine aktarılırlar. Bu olay moleküllerin serbest sıvıdaki difüzivitesine ve adsorbent çevresindeki akışın hidrodinamiğine bağlıdır. İkinci basamakta, moleküller adsorbentin porları içerisine difüzlenirler ve tutunacak bölge bulmaya çalışırlar. Üçüncü ve son basamakta ise moleküllerin adsorbent yüzeyine adsorpsiyonu gerçekleşir. Genellikle bu basamağın oldukça hızlı yürümesi nedeniyle, ikinci ve üçüncü basamakların eş zamanlı gerçekleştiği kabul edilebilir.

Adsorpsiyon kromatografisinde seçilen adsorbent, ayrılması gereken maddeleri parçalamamalı, bu maddeler ile kimyasal reaksiyon vermemeli, adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalı ve aynı zamanda adsorpladığı maddeleri kolaylıkla geri vermeli, başka bir deyişle elüsyonu kolay olmalıdır.

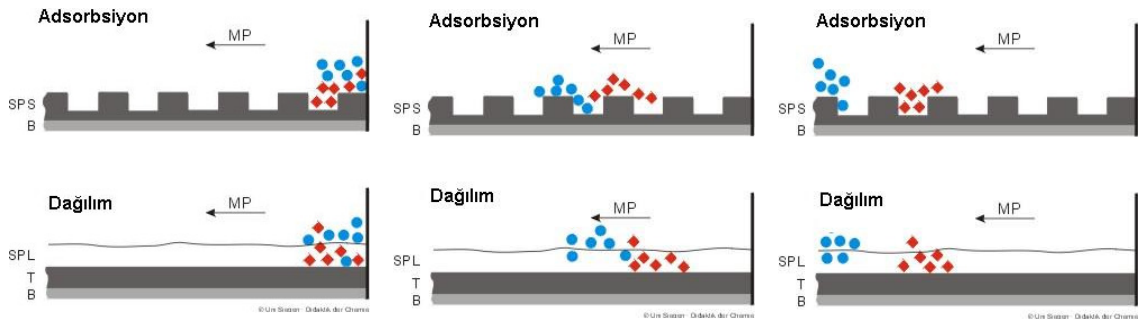
2.2.2. Partisyon kromatografisi

Partisyon kromatografi tekniği, birbiri ile karışmayan iki sıvıdan; yani iki fazdan oluşan bir faz sistemi içine konulan maddedin, bu sıvılardaki çözünürlüğüne bağlı olarak iki faz arasında dağılması ve dengeye ulaşması prensibine dayanır. Bu kromatografi türünde ayrılacak bileşenin, durgun sıvı ile çözücü arasındaki dağılım oranı ayrılmanın ne kadar başarılı olacağını belirler. Bu nedenle dağılım kromatografisi olarak da adlandırılır. Böyle bir sistemde maddelerin dağılması sabit olup, partisyon katsayısı (K_d) ile ifade edilir.

Partisyon kromatografisinde, hareketli faz gaz ya da sıvı; hareketsiz faz ise sıvı akışkandır. Partisyon mekanizmasının rol aldığı kromatografi tekniklerinde hareketsiz fazı teşkil eden sıvı (genellikle su) porlu bir destek maddesi üzerine kaplanır. Her iki

fazın da sıvı olduğu durumlarda sıvı-sıvı kromatografisinden, hareketli fazın gaz olduğu durumlarda ise gaz-sıvı kromatografisinde söz edilir. Partisyon kromatografisinde bir maddenin hareketi adsorpsiyona değil, hareketsiz fazdaki çözünürlüğüne bağlıdır. Çok çözünür maddeler, kromatografi sütununda, az çözünür maddelerden daha yavaş hareket ederler (gaz-sıvı kromatografisi). Bu geçiş sırasında maddeler iki faz arasında partisyona uğrarlar ve partisyon faktörleri arasındaki farktan dolayı birbirlerinden ayrılırlar.

Fiziksel olarak destek katısı üzerine tutturulmuş durgun sıvı, taşıyıcı sıvı tarafından kolayca sürüklenip götürülebilir ve destek katısı üzerindeki durgun fazın miktarı zamanla değişir. Bu kolonlarda yapılan ayırmaların tekrarlanabilirliği az olmakta, kolon kısa zamanda kullanılamaz hale gelmektedir. Bunu önlemek için sabit faz katı destek üzerine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Böylece kolonların ömrü uzun olmakta ve tekrarlanabilir ayırmalar gerçekleştirilmektedir.



Şekil 2.2. Adsorpsiyon veya partisyon kromatografi süreçlerinin şematik gösterimi

2.2.3. İyon değişirme kromatografisi

İyon değişirme kromatografisi, ayrılacak olan bileşenlerin iyonik grupları ile iyon değiştirici reçinedeki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı olarak yer değiştirmesi esasına dayanır. Bu yöntem, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değişirme kromatografisi veya katyon değişirme kromatografisi olarak adlandırılır. Analiz sırasında reçinenin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Karışım halindeki maddelerin ayrılması için önce bütün maddeler hareketsiz fazı meydana getiren iyon değiştiriciye bağlanır.

Daha sonra her bir iyon türünün teker teker ortamdan elüsyonu ile ayrılma gerçekleşir. Her bir iyon türünü hareketsiz fazdan sökmek için gerekli olan şartlar (pH, iyonik kuvvet), her bir türün elektriksel özelliklerine bağlı olduğundan ve türlerinin elektriksel özellikleri birbirinden farklı olduğundan ayırım sağlanmış olur. Bu teknik genellikle, ayrılmaları güç olan bazı iyon ve asitlerin, aminoasitlerin ve asit-baz eldesinde, seyreltik iyon çözeltilerini konsantre edilmesi amacıyla kullanılır.

2.2.4. Jel filtrasyon

Bu yöntem, karışımı oluşturan bileşenlerin molekül büyüklüklerine göre ayrılması prensibine dayanır. Jel filtrasyon kromatografisinde elek görevi üstlenen sabit faz, bir jel ya da gözenekli bir organik bileşiktir (selüloz, agar, dextran). Jel partikül gözeneklerinin hareketli faz ile doldurulması sonucu, bu partikül şişer ve porlu bir matriks oluşur. Karışımdaki moleküllerden çapı jel matriksindeki porlardan büyük olanlar jel parçacıklarının içine nüfuz etmeksizin, parçacıkların aralarından geçerek kolonu terkederler. Çapı, pordan geçebilecek büyüklükte olanlar partiküllerin yapısına nüfuz eder ve porlardan geçerek, difüzyon yoluyla kolon boyunca ilerlerler. En küçük yapıdaki moleküller kolonu en son terkederler.

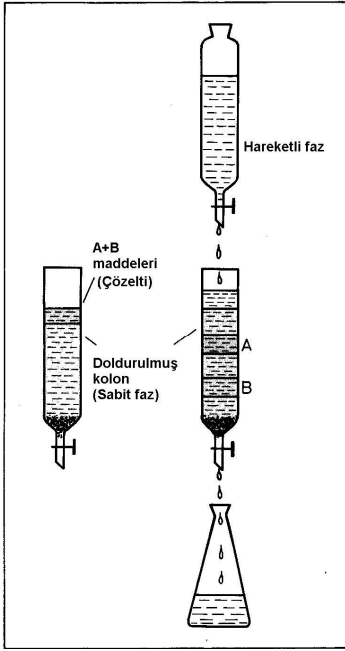
2.3. Uygulama Biçimine Göre Kromatografi Teknikleri

2.3.1. Düzlemsel kromatografi

Düzlemsel kromatografi, sabit fazın bir düzlem halinde ya da düzlem üzerinde bulunduğu kromatografik ayırma yöntemlerinden biridir. Düzlem, sabit faz olarak davranan bir kağıt (kağıt kromatografisi) veya cam bir yüzey üzerine yayılmış katı partikül (ince tabaka kromatografisi) olabilir. Kağıt kromatografisinde, kromatografi kağıdından kesilmiş şeritin ucuna ayrılması istenen karışımdan damlatılır ve bu kağıt kapalı bir kaptaki (yürütme tankı) çözücüye daldırılır. İnce tabaka kromatografisinde de üzerine ince katı bir faz sürülmüş cam plakanın bir ucuna karışımdan damlatılır ve yürütme tankına yerleştirilir. Kağıt veya ince tabaka üzerinde kılcal kanallardan ilerleyen çözücü, karışımdaki bileşenleri bunların sabit faza olan ilgileri ile ilişkili olarak farklı hızlarla sürükler ve birbirinden ayırır. Kağıt veya levha üzerinde, belli bir süre sonra, bileşenlerin yol aldığı uzaklık ile çözücünün ulaştığı uzaklığın oranı, R_f değeri olarak bilinir ve bu değerler kalitatif analizde kullanılır. Kağıt kromatografisine

benzemekle birlikte ince tabaka kromatografisinde bileşimler daha güçlü ayrılır, analiz süresi daha kısadır, küçük miktardaki bileşimleri ayırmada daha duyarlıdır; 1 µg dan daha az miktarlarda numunelerle çalışabilir. Ağırlıklı olarak analitik amaçlarla kullanılan bu yöntemde sabit faz (alüminyum oksit, selüloz) bir ara madde aracılığı ile (gibis) bir cam yüzey veya alüminyum veya polietilen folyo üzerinde ince bir tabaka halinde yayılır. Numune bu sabit faz üzerinde başlangıç bölgesine uygulanır.

2.3.2. Kolon kromatografisi



Şekil 2.3. Kolon kromatografi prensibi

Kolon kromatografisi, adsorpsiyon kökenli bir katı-sıvı kromatografi yöntemidir. Bu yöntemde elüent ve sabit fazın (silika jel, alumina, selüloz) karışımıyla hazırlanan çamur, kolon adı verilen ucu musluklu cam boru içine doldurulur. Sıvı karışım bu kolonun üstüne bir defada ilave edilir. Bu işlemden sonra musluktan bir miktar çözücü boşaltılarak, karışımın kolonun üst kısmına emdirilmesi sağlanır. Analiz için en az üç erlen gereklidir.

Birinci erlene çözücü, ikinci erlene kolondan ilk çıkan madde ve üçüncü erlene ise, kolonu en son terk eden hareketli faz durumundaki çözücü daha polar ise, polar nitelikli bileşenin, çözücü ile etkileşimi tercih eder. Bu nedenle bileşen, kolona tutunmadan (veya çok az tutunarak) yüksek bir geçiş hızına sahip olur. Sabit faz durumundaki katı dolgu maddesinin polar olması durumunda ise, polar nitelikli bileşen kolon ile sıkı bir etkileşim kurar. Bu nedenle kolondan geçiş hızı daha düşük olur.

2.4. Faz Tipine Göre Kromatografi Teknikleri

2.4.1. Sıvı kromatografisi

Kromatografik yöntemler, faz tipi esas alındığında sıvı ve gaz kromatografisi olmak üzere ikiye ayrılır. Sıvı ve gaz kromatografik yöntemleri de kendi içlerinde kullanılan

sabit fazın türüne göre çeşitlenir. Sabit fazın, bir dolgu maddesi üzerine yayılmış sıvı film olarak uygulandığı durumda yöntem, sıvı-sıvı kromatografisi adını alır. Bu yöntemde bileşenler, sabit ve hareketli fazlar arasındaki farklı dağılıma eğilimlerinden ötürü birbirlerinden ayrılır. Sıvı-sıvı kromatografisinde, birbiri ile karışmayan iki sıvı sabit ve hareketli faz olarak kullanılmakta ve bu nedenle polariteleri birbirinden farklı iki sıvı seçilmelidir. Sıvı kromatografisinde, sabit faz olarak polar (etilen glikol) ve hareketli faz olarak apolar (hekzan) sıvıların tercih edildiği yöntem normal faz sıvı kromatografisi, sabit faz olarak apolar ve hareketli faz olarak polar sıvıların tercih edildiği yöntem ters faz sıvı kromatografisi olarak adlandırılır. Sabit fazın, katı dolgu maddesi olduğu yöntem sıvı-katı kromatografisi adını alır. Bu yöntemde bileşenlerin birbirinden ayrılması, bunların katı yüzeyindeki farklı adsorpsiyon ilgilerine bağlı olarak gerçekleşir.

Sıvı kromatografisinde, hareketli fazın kolon içerisinde ilerlemesi genellikle çok yavaş olup, dolgu maddesinin tanecik çaplarının küçültülmesi veya kolon boyunun uzatılması kromatografik ayrılmanın süresini daha da uzatır. Bu tarz kromatografik analizlerde genellikle, dolgu maddesini oluşturan partikül çapı 100-250 µm ile 40-70 µm arasında değişim gösterir. Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan, yüksek performanslı/ basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi (5-15 µm) sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. İnce partiküller ile çok sıkı doldurulmuş olan kolondan hareketli fazın belirli bir hızda geçebilmesi için, sisteme basınç uygulanması gerekir. HPLC, genelde uçucu olmayan organiklerin tespitinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem amino asitlerin, proteinlerin, nükleik asitlerin, hidrokarbonların, yağ asitlerinin, karbonhidratların ve antibiyotiklerin belirlenmesinde tercih edilir. Burada taşıyıcı sıvı, sisteme yaklaşık 40 atm basınçta verilir. Bazen kolon öncesinde bir ön kolon bulunabilir. Bu ön kolon, mevcut analizin gerçekleştirildiği kolonun ömrünü uzatmak ve girişim yapabilecek kirletici parametreleri önlemek amacı ile kullanılmaktadır. HPLC yöntemi, bileşenlerin ayrışma performansını arttırması sebebiyle diğer kromatografi yöntemleri yerine tercih edilen bir ayırma tekniğidir.

2.4.2. Gaz kromatografisi

Bir karışımda gaz halinde bulunan veya kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla gaz kromatografisi yöntemi kullanılır. Bu yöntemde ayrılma, bileşenlerin farklı katı yüzeylerdeki farklı adsorpsiyon ilgilerine göre gerçekleşir. Hareketli faz olarak helyum, azot veya argon gibi inert bir gaz kullanılır ve bu gaza taşıyıcı gaz adı verilir. Kolon içinde kullanılan sabit faz; silika, alumina veya karbon gibi bir katı ise yöntem, gaz-katı kromatografisi adını alır. Eğer sabit faz kieselguhr gibi inert katı bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş uçucu olmayan bir sıvı film ise yöntem gaz-sıvı kromatografisi adını alır. Bu şekilde kullanılan kolonlara dolgulu kolonlar denilir. Gaz kromatografisi yönteminde ayrıca 0.2-0.5 mm iç çapında, 10-50 m boyunda kapiler kolonlar da kullanılabilir. Bu tür kolonlarda verimlilik, dolgulu kolonlara göre daha iyidir.

Gaz kromatografisinde, ilk olarak örneğin buharlaştırılması için ısıtılan bir bölme vardır. Hemen ardından sıcaklığı programlanabilen bir fırın içine yerleştirilmiş olan kolon gelmektedir. Sıvı örnekler bir şırıngayla bir septumdan kolon giriş kısmına enjekte edilirler. Kolon çıkışına yerleştirilen dedektörden sinyal izlenir ve bir integratör ile kaydedilir.

Gaz kromatografisi yönteminde incelenebilen maddeler için belli sıcaklıktaki alıkonma sürelerinin birbirinden farklı olmasından yararlanarak nitel analiz yapılabilir. Ancak, birçok bileşen için tek bir kolonla birbirine yakın alıkonulma süreleri elde edilebileceğinden, sonuçların güvenilir olması için birkaç değişik kolon kullanmakta yarar vardır. Bir maddenin alıkonulma süresi, belli bir kolon için, belli sıcaklıkta ve belli taşıyıcı gaz akış hızında sabit bir değerdir. Bu sebeple de, bir iç standart maddesinin analiz örneğine eklenmesi ve sonuçların bu maddeye bağlı olarak belirtilmesi daha çok tercih edilen bir yoldur.

Gaz kromatografisi yönteminde nicel analiz ise kromatogramdaki piklerin altında kalan alanların hesaplanması ile veya pik yüksekliğinin ölçülmesi ile yapılır. Örneğin, enjekte ettiğimiz bir karışımda başlangıçta eşit miktarlarda A ve B bileşenlerinin olduğunu varsaydığımız bir durumda, kromatogramda bu bileşenlere ait piklerin altında kalan alanlar da birbirine eşit olacaktır.

Bir bileşen kolondan ne kadar erken çıkarsa, o bileşene ait pik de o kadar keskin elde edilirken, kolondan geç çıkan bileşenlere ait pikler ise geniş ve yayvan olarak elde edilmektedir. Bu ise istenmeyen bir durumdur. Bu durumu önlemek için sıcaklık programlaması yöntemi uygulanır. Başlangıçta kolon sıcaklığı düşük tutulur ve zamanla doğrusal bir biçimde artırılır.

Gaz ve sıvı kromatografinin uygulama alanları farklıdır; ancak birçok bileşen her iki kromatografiyle de ayrılabilir. Amaca uygun seçim yapılır: Kromatografiyle ayrılan maddelerle daha başka işlemler yapılacaksa bunların toplanması istenir. Toplama işleminde, gaz kromatografisinde taşıyıcı faz gaz olduğundan ortamdan hemen uzaklaşır ve saf madde uygun bir soğutma sistemiyle kolayca sıvı veya katı halde elde edilebilir. Sıvı kromatografisinde, taşıyıcı faz sıvı olduğundan, saf madde ile birlikte gelen taşıyıcı sıvının uzaklaştırılması için ek işlemler yapılmalıdır. Bu koşulda gaz kromatografisi tercih edilir. Sıvı kromatografisi, genellikle ayrılacak bileşik ısıya karşı duyarlıysa veya büyük molekülüyse kullanılır.

2.4.3. Süperkritik akışkan kromatografisi

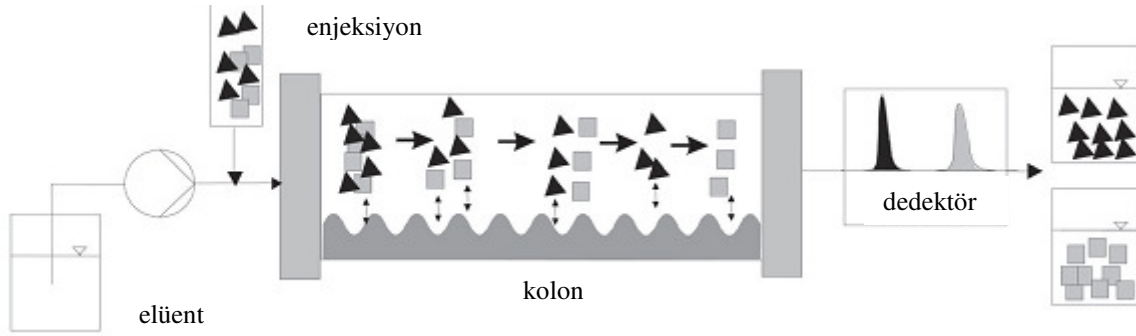
Süperkritik akışkan kromatografisi (SFC), sıvı ve gaz kromatografilerinin üstün özelliklerini birleştiren kromatografi tekniğidir. SFC tekniğinde, hareketli faz olarak kritik sıcaklığının üstünde ısıtılmış gaz seçilir. Süperkritik sıcaklığının üzerinde madde, sıvı fazına yoğunlaşamaz ve uygulanan basınçtan etkilenmez. Süperkritik akışkanlar, sıvıya benzer yoğunluğa ve gaza benzer vizkoziteye sahip olduklarından kromatografik saflaştırma işlemlerinde hareketli faz olarak özellikle organik solventlere tercih edilirler. Bu tarz akışkanların bir diğer önemi ise basınç değişimi ile solvent özelliklerinin değişebilmesidir. Genellikle hareketli faz olarak karbondioksitin seçildiği bu tarz uygulamalarda dolgulu kolonlar kullanılır.

Süperkritik akışkan kromatografisinde, hareketli fazın düşük vizkoziteye ve yüksek difüzyon hızına sahip olması nedeniyle sıvı kromatografisine göre ayırım daha çabuk gerçekleşmektedir. Bununla birlikte, süperkritik akışkan kromatografisinde, gaz kromatografisine göre bant genişlemesi daha az gözlenmektedir.

2.5. Elüsyon Kromatografisinden Sürekli Kromatografiye Geçiş

Kolon kromatografisinde, bütün ayırma işlemleri elüsyon modunda gerçekleşmekte ve hareketli faz kromatografik kolon boyunca sürekli olarak akış halinde bulunmaktadır.

Elüsyon kromatografisinde, belirli miktarda besleme karışımı, kromatografik yatak boyunca kesikli biçimde beslenmekte ve hareketli faz akımı ile yatak boyunca ilerlemesi sağlanmaktadır. Besleme akımını oluşturan her bir bileşenin, sabit faza ilgisi farklı olacağından, her bir bileşen kolondan farklı zamanlarda çıkmakta ve böylelikle ayırma gerçekleşmektedir (Şekil 2.4.). Sabit faza adsorpsiyon ilgisi fazla olan bileşenin kromatografik kolondan elüsyonu yavaş olurken, sabit faza adsorpsiyon ilgisi az olan bileşenin elüsyonu daha hızlı gerçekleşmektedir.



Şekil 2.4. Klasik elüsyon kromatografisi çalışma prensibi

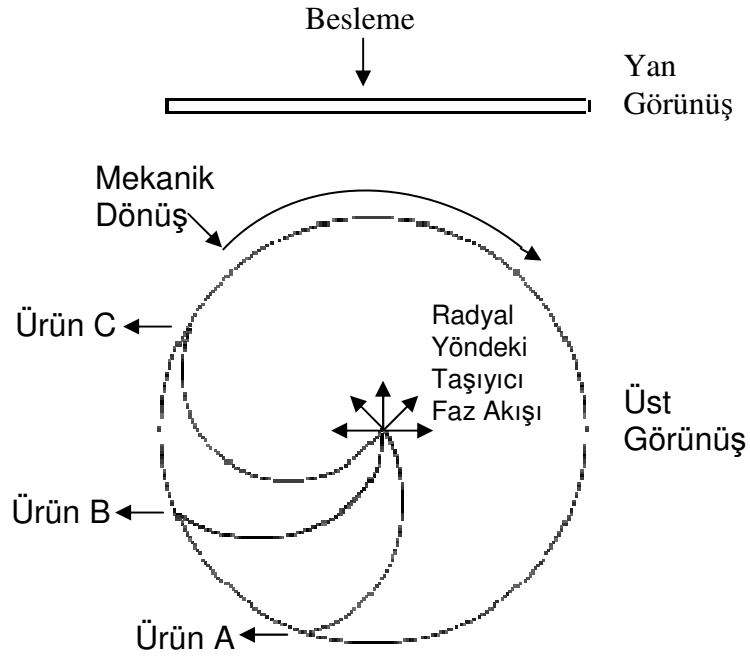
1970'lerin başında, HPLC' deki gelişmeler ile eser kimyasalların (fine chemicals) preparatif saflaştırılması hız kazanmıştır. Prosesi daha verimli hale getirmek için, ince sabit faz partikülleri (10 – 40 µm) ve yüksek basınç altında işletilen kısa kolonlar kullanılmıştır. Bu dönemlerde, FDA ve benzeri kuruluşlar tarafından getirilen, farmasötik ve gıda endüstrisinde ürün saflığını sağlama konusundaki kısıtlamalar ile kromatografik prosesler daha ilgi çekici hale gelmiştir. Buna örnek olarak, enantiyomerlerin ve biyoteknoloji endüstrisinde enzim, peptid, antibiyotik gibi aktif bileşiklerin ayrılması verilebilir. Elüsyon kromatografisindeki tüm ihtiyaçlara rağmen, bu tarz kromatografik saflaştırma işlemlerinde, ürün değerini düşüren bazı kısıtlamalar mevcuttur.

Elüsyon kromatografisindeki başlıca kısıtlamalar:

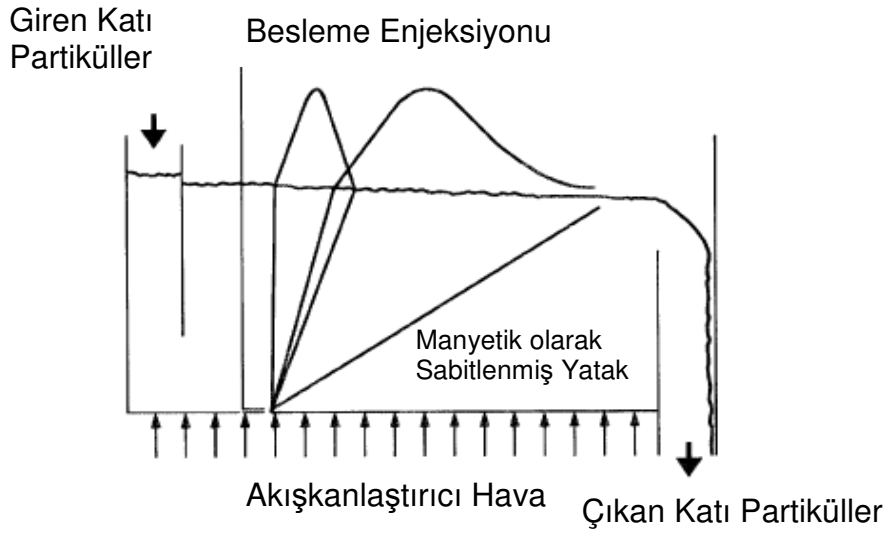
- yüksek miktarda elüent harcanması prosesi pahalı kılmaktadır.
- ayrışacak olan bileşenlerin sürekli hareketli faz ile elüsyonu nedeniyle, ürünler seyrelmiş halde kolondan çıkmakta ve bu nedenle ürünlerin derişik hale getirecek ikinci bir işlemde geçmesi gerekmektedir.
- kesikli bir sistem olması sebebiyle birim zaman başına ürün eldesi çok azdır.
- çok değerli olan katı fazın, kolon boyunca sadece bir kısmı (adsorpsiyonun gerçekleştiği alanlar) ayrışmada kullanılması sebebiyle, katı fazdan yararlanma oranı düşüktür.
- aynı anda hem yüksek saflık hem de yüksek verime ulaşmak imkansızdır.

Elüsyon kromatografisinin bu sınırlamaları, proses değişkenlerinin optimizasyonu ile azaltılabilmektedir. Örneğin besleme enjeksiyonu tekrarlanması ile elde edilen ürün miktarı veya kolona geri besleme ile ürün safiyeti artırılabilir. Ancak her iki durumda da seyreltik ürün eldesi ve kesikli sistem modunun dışına çıkılması mümkün değildir.

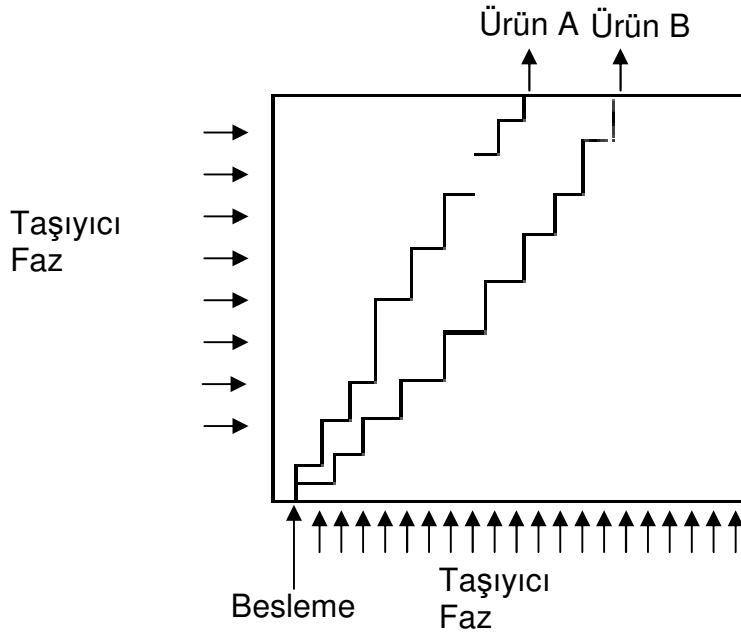
Yukarıda anlatılan kromatografik teknikler uygun kromatografik ortam ve elüentlerin rahatça bulunabilmesinden dolayı dünya çapında rahatça uygulanabilmektedir. Fakat bu tekniklerin hemen hepsi kesikli işlemlerdir. Diğer yandan, bazı endüstriyel uygulamalarda sürekli işlemler tercih edilebilir. Kesikli işlemlerin sebep olduğu problemlere maruz kalmayan sürekli kromatografi sistemini geliştirmek amacıyla geçmiş yıllarda çeşitli denemeler yapılmıştır (Tuthill, 1970). Sürekli veya yarı sürekli işlemleri gerçekleştirebilmek amacıyla denenen bazı yollar Şekil 2.5.(a), (b) ve (c)'de gösterilmiştir.



Şekil 2.5.(a). Mekanik olarak dönen yatak ve radyal akış ile ayırma (Koyuncu, 2007)



Şekil 2.5.(b). Akış yönü değiştirerek ayırma (Koyuncu, 2007)



Şekil 2.5.(c). Manyetik olarak sabitlenmiş yatak ile ayırma (Koyuncu, 2007)

Şekil 2.5.(a)'da sürekli ayırma radyal disk şeklindeki bir yatakta radyal yönde gerçekleştirilmiştir. Ayrılması istenen bileşenlerden oluşan karışım, diskin merkezinden sürekli olarak beslenir. Disk döndükçe farklı bileşenler, solvent içerisinde sahip oldukları farklı denge dağılım katsayılarından dolayı farklı açısall pozisyonlardan çıkarlar. Burada en az tutunan bileşen A, ilk önce çıkar ve onu sırasıyla B ve en çok tutunan C izler.

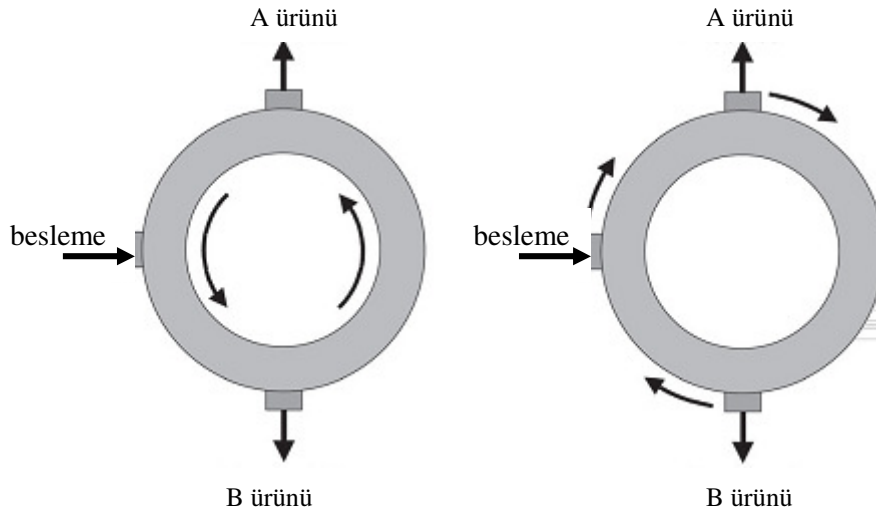
Şekil 2.5.(b)'de reçine, kenarları gözenekli olan katı ve düz iki plaka arasına doldurulmuştur. Besleme çözeltisi sürekli bir şekilde sol taraftaki alt köşeden sisteme beslenir. Elüent başlangıçta besleme ile aynı yönde verilir. Kısa bir süre sonra besleme ile aynı yöndeki elüent akışı durdurulur ve beslemenin yönüne ters yönde tekrar elüent akışı sağlanır. Bu şekilde sistem, sürekli çapraz akışa sahip sistemlere benzetilmiş olur.

Şekil 2.5.(c) gerçek bir hareketli yatağı tanımlamaktadır. Burada reçine olarak manyetik partiküller kullanılır ve bu partiküller dikdörtgen şeklindeki yatağın bir ucundan yatağa beslenir. Yatağı akışkanlaştırmak amacıyla hava kullanılır. Ayrıca sürekli olarak besleme noktasından geçen partikülleri sabitlemek amacıyla bir magnet kullanılır ve partiküller sürekli olarak geri beslenirler. Ayrılması istenen gaz

karişimini sürekli olarak sisteme vermek amacıyla sabit bir besleme noktası kullanılır. Gaz karişımının sürekli şekilde ayriştirilmesi, hava akışı, yatağın hareketi ve bileşenlerin sabit faza olan farklı afiniteleriyle (ilgileriyle) sağlanır.

Bu tür sistemlerde reēinin besleme noktasına göre sabit hareketi söz konusudur. Bu da ya yatağı hareket ettirip besleme noktasını sabit tutarak yada besleme noktasını hareket ettirip yatağı sabit tutarak sağlanabilir. Ayrıca bu hareket, besleme akışı ile yatak hareketi arasında paralel (crosscurrent) veya ters (countercurrent) bir ilişi olacak şekilde de tasarlanabilir.

Genel olarak sürekli kromatografik teknikler, sistemin giriş – ıkış portlarının katı faz boyunca değiştirildiği veya giriş - çıkış portlarının sabit, katı fazın ise hareket halinde olduğu sistemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.



şekil 2.6. Sürekli kromatografi tekniklerinin çalışma yöntemi (Brunner, 1994)

Tezin bu bölümünde sürekli kromatografik teknikleri oluşturan, hareketli yatak benzetimli kromatografi (SMB) ve sürekli annular kromatografi (CAC) cihazlarının çalışma prensibi ve uygulama alanları ile bu iki teknolojinin ilk ortaya atıldığı yıllardan günümüze gelinceye kadar gösterdiği gelişmelerden bahsedilmektedir

2.6. Hareketli Yatak Benzetimli Kromatografi (Simulated Moving Bed - SMB)

1960' ların başında, kromatografik kolonların birbirlerine seri bağlanarak, hareketli ve katı faz arasında sürekli, ters akış hareketi sağlayan alternatif bir ayırma yöntemi öne sürülmüştür. Hareketli yatak benzetimli kromatografi (SMB) adı verilen bu yöntem ilk olarak petrokimya ve şeker endüstrilerinde saflaştırma işlemlerinde ve özellikle son 10 yıl içerisinde hızla gelişme kaydederek biyokimya, farmasötik kimya gibi alanlarda büyük boyutlu ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılmaktadır.

Hareketli yatak benzetimli kromatografi, besleme karışımının, iki ayrı akım halinde ürünlere ayrışmasını sağlayan, sürekli bir sistemdir. SMB prosesinde, kolon içindeki reçinenin kolon boyunca hareketi simule edilmiştir. Bu simulasyon sonucunda katı faza adsorpsiyon ilgisi fazla olan bileşen katı faz yönünde hareket ederken, adsorpsiyon ilgisi az olan bileşen ters yönde kolondan çıkmaktadır. Böylelikle, SMB teknolojisinde ürünler, kolonun farklı bölgelerinden, iki ayrı fraksiyona ayrılmış şekilde elde edilmektedir.

Klasik elüsyon kromatograf cihazları, birim sabit faz ve birim zaman başına az miktarda ürünün saflaştığı, düşük prodüktiviteye sahip ve ürünün ancak seyreltik halde elde edilebildiği, kesikli sistemlerden oluşmaktadır. Elüsyon kromatografisinde karşılaşılan bu engelleri yenmek için SMB kavramı geliştirilmiştir. SMB kromatografi teknolojisinde, klasik elüsyon kromatografi teknikleri ile karşılaştırıldığı zaman, tüm sabit fazın sürekli olarak karışım ile kaplanmasına bağlı olarak elde edilen yüksek prodüktivite ve kimi uygulamalarda çözücüde % 90 a kadar ulaşabilen tasarruf özellikleri öne çıkmaktadır (Schulte et al., 1996)

SMB prosesinin, elüsyon kromatografisine göre üstünlükleri:

- Elüsyon kromatografisinde, kütle transfer sürücü kuvveti, besleme karışımındaki bileşenlerin katı faza farklı adsorpsiyon ilgileridir. SMB prosesinde ise katı faz ile sıvı fazın simule edilmiş ters akış (countercurrent flow) prensibi ile bu sürücü kuvvet artmaktadır (Gomes et al., 2006).
- Ters akış prensibi nedeniyle SMB prosesinde prodüktivite, elüsyon kromatografisine göre çok daha yüksektir. Literatür çalışmalarında, SMB

prosesi ile kesikli kromatografik sistemlerin performansı karşılaştırılmış ve SMB saflaştırma işleminde elde edilen produktivitenin kimi uygulamalarda 4 kat daha fazla olduğu belirlenmiştir (Francotte, 1996).

- SMB prosesinde, elüent sisteme sürekli geri beslendiği için, elüent gereksinimi azalmakta; ayrıca buna bağlı olarak, elde edilen ürünler, elüent ile seyrelmediğinden ürünleri derişik hale getirecek ikinci bir işlemden geçmesi gerekmemektedir. Literatürde SMB, kesikli kromatografik sistemler ile karşılaştırıldığında, SMB de seyrelme oranının kimi uygulamalarda 2-5 kat daha az olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Nagamatsu, 1999).
- SMB teknolojisi sürekli bir prosesdir. Yatak sürekli besleme karışımı ile beslenirken, ürünler iki ayrı fraksiyon halinde kolondan sürekli olarak toplanmaktadır. Bu nedenle, kesikli olarak çalışılan elüsyon kromatografik sistemlere göre saflaştırılan ürün kapasitesi artmaktadır.
- SMB kromatografisinde katı fazın kolon boyunca hareketi simule edildiğinden, reçinenin besleme karışımını oluşturan bileşenleri adsorplama alanı artmaktadır. Başka bir deyişle reçinede adsorpsiyonun gerçekleştiği aktif hacim, toplam yatak hacminin yaklaşık 50 - 70%' ini oluşturmaktadır.

Schulte et al. (1999), SMB ile yapılan çalışmalarda, en temel sorunun SMB optimizasyonu olduğunu bildirmektedir. Prosesi etkin kılmak için, saflaştırılacak olan her ürüne göre özel, simulatif proses optimizasyonu gerekmektedir. SMB teknolojisi fikri ortaya atıldığı yıllardan itibaren model yaklaşımları ve proses optimizasyonu üzerine çalışmalar yapılmış ve özellikle son 5 yıl içerisinde literatür çalışmaları SMB modelleme ve proses simulasyonu üzerine ağırlık kazanmıştır (Helfferich and Klein, 1970; Rhee et al., 1970; Storti et al. 1989, 1993; Mazzotti et al., 1997; Chiang, 1998; Migliorini et al., 2000).

SMB prosesinde karşılaşılan bir diğer problem ise, prosesin sadece iki bileşenli karışımlar için uygun olmasıdır. İki den fazla bileşenli karışımlarda, ürünler birbirlerini içinde dağılmakta ve birbirlerini kirletmektedir. Bu sorunu yenmek için, birbirine seri bağlı iki SMB prosesi geliştirilmiştir. Böylelikle ilk prosesden çıkan ürün, ikinci

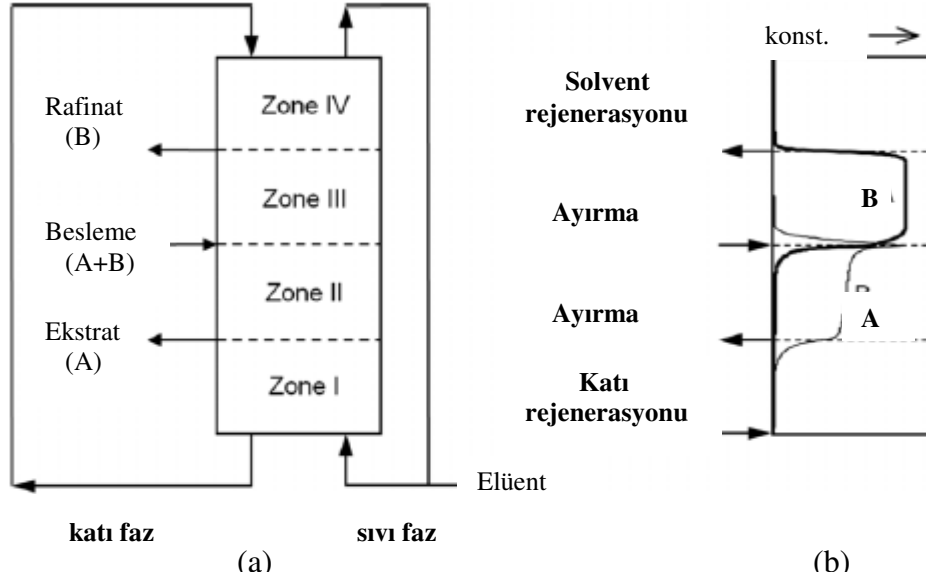
prosesin beslemesi olarak kullanılmaktadır ve saf ürün eldesi mümkün kılınmaktadır. Geliştirilen bir başka çözüm ise geri besleme yöntemidir. Bu yöntemde elde edilen ürün, SMB prosesine besleme akımı olarak geri beslenmektedir. Bu iki çözüm yolu ile SMB prosesi ikiden fazla bileşenli karışımları ayırıştırma amacıyla kullanılabilir.

Hareketli yatak benzetimli kromatografi çalışma prensibine giriş yapmadan önce "benzetimli (simulated)" kavramını açıklamak için ilk olarak hipotetik hareketli yatak kromatografisi (TMB) yaklaşımını açıklamakta yarar vardır.

2.6.1. Hareketli yatak kromatografi (True Moving Bed- TMB) çalışma prensibi

Hareketli yatak benzetimli kromatografi (SMB) kavramı, hareketli yatak kromatografisi (TMB) yaklaşımından doğmuştur. TMB, dört bölgeden (zone) oluşan, hareketli faz ve katı faz arasında ters akışın gerçekleştiğini varsayan hipotetik bir prosesdir (Şekil 2.7.).

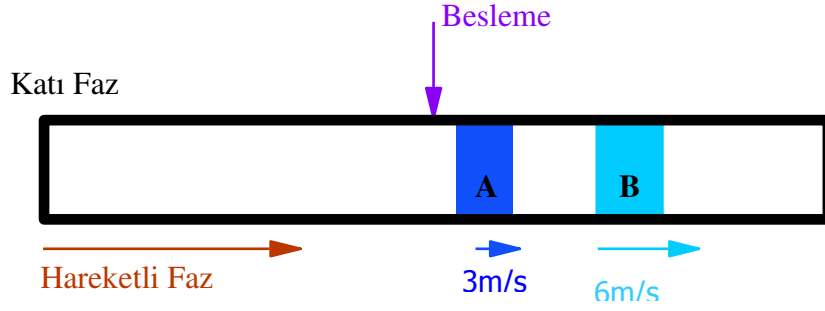
TMB prosesi, sisteme giren iki akım ile karakterize edilmiştir. Bunlar, ayrışacak bileşenleri içinde bulunduran besleme akımı ve elüent akımıdır. Klasik TMB prosesi, besleme akımı içerisindeki iki bileşenin, A ve B' nin, iki ayrı fraksiyona ayrılmasını sağlamaktadır. Başarılı saflaştırma işlemi, iki çıkış akımından birinin (rafinat akımı), adsorpsiyon ilgisi düşük olan bileşence (B bileşeni) zenginleşmesi ve diğer akımın (ekstrat akımı) ise, adsorpsiyon ilgisi yüksek olan bileşence (A bileşeni) ile zenginleşmesi ile mümkündür.



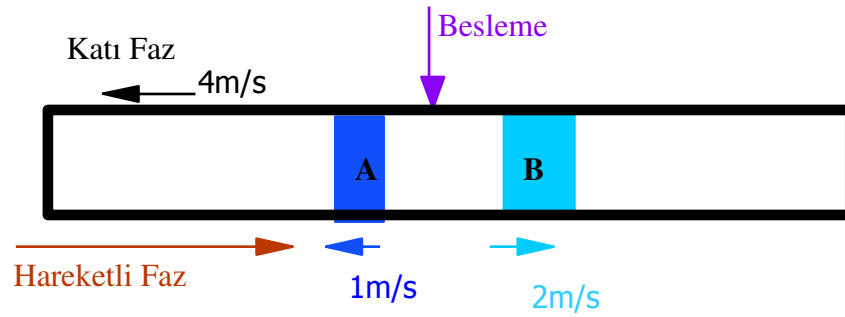
Şekil 2.7. Hareketli yatak kromatografisi (TMB) çalışma prensibi. (a) TMB aparatının şematik gösterimi (b) iki bileşenli karışımların ayrışmasını gösteren tipik konsantrasyon profili (Seidel-Morgenstern et al., 2008)

Yukarıda bahsedilen bu dört akım, sistemi toplam dört bölgeye bölmüştür. "Zone I, II, III ve IV" olarak adlandırılan her bir bölgenin saflaştırma işleminde ayrı bir görevi bulunmakta ve SMB işletimi sırasında adsorpsiyon – desorpsiyon fenomeni aynı anda gerçekleşmektedir. Besleme akımındaki iki bileşenin ayrışması, merkez bölgeler olan II ve III de gerçekleşmektedir. Bu bölgelerde, B bileşeninin rafinat toplama noktasına ve A bileşeninin ekstrat toplama noktasına doğru taşınması için net akış hızlarının ayarlanması gerekmektedir. Elüent, A bileşeninin desorpsiyonu ve katı fazın rejenerasyonu için zone I den sisteme beslenmektedir. Elüent rejenerasyonu için ise, B bileşeninin katı faza adsorpsiyonu zone IV de gerçekleşmektedir.

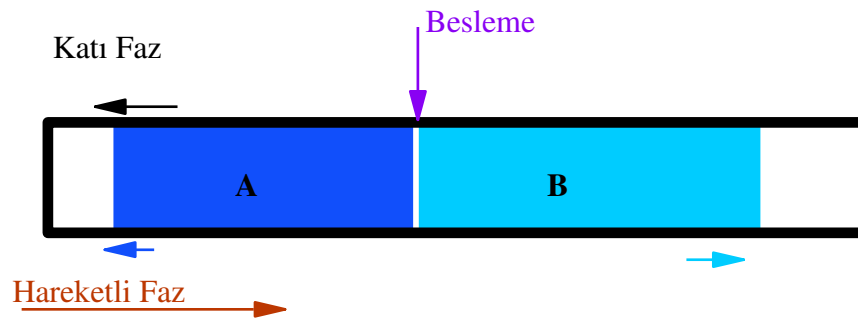
TMB prosesinin çalışma prensibi, aşağıda Şekil 2.8. (a), (b) ve (c) ile daha açık bir şekilde gösterilmiştir.



Şekil 2.8.(a) TMB çalışma prensibi, klasik kromatografik kolonun yatay konuma getirilmiş hali



Şekil 2.8.(b) TMB çalışma prensibi, katı faz hareketi



Şekil 2.8.(c) TMB çalışma prensibi, rafinat ve ekstrat akımlarının iki ayrı fraksiyona ayrılması.

Şekil 2.8.(a)' da sabit faz ile doldurulmuş, klasik kromatografik kolon yatay konuma getirilmiş ve besleme akımı, kolon merkezinden sisteme beslenmektedir. Besleme akımı içerisinde bulunan ayrıştırılacak olan iki bileşenin (A ve B), katı faza adsorpsiyon ilgileri farklı olduğundan kolon boyunca farklı hızlarla ilerlemektedir. Katı faza adsorpsiyon ilgisi düşük olan B bileşeni, katı faz tarafından yeterince tutulmadığından kolon boyunca daha hızlı ilerlemektedir. Katı faza adsorpsiyon ilgisi yüksek olan A bileşeni ise, katı faz tarafından tutulması sebebiyle kolon boyunca daha yavaş ilerlemektedir. Bu nedenle A ve B bileşenlerinin kolon içindeki hızları sırasıyla, 6 m/s ve 3 m/s olarak kabul edilebilir.

Şekil 2.8.(b)' de katı fazın, B bileşeninin kolon içindeki hızından küçük, A bileşeninin hızından büyük bir hız değeriyle, hareketli fazın akış yönüne ters yönde hareket ettirilmesi görülmektedir. Katı fazın kolon içindeki hızı 4 m/s olarak kabul edildiği takdirde, vektörel olarak A bileşeni katı faz yönünde, B bileşeni ise hareketli faz yönünde kolon içindeki hareketini sürdürecektir. Başka bir deyişle, katı faza adsorpsiyon ilgisi yüksek olan A bileşeni, katı faz tarafından tutulduğundan, katı faz yönünde, ilgisi düşük olan B bileşeni ise hareketli faz yönünde ilerleyecektir.

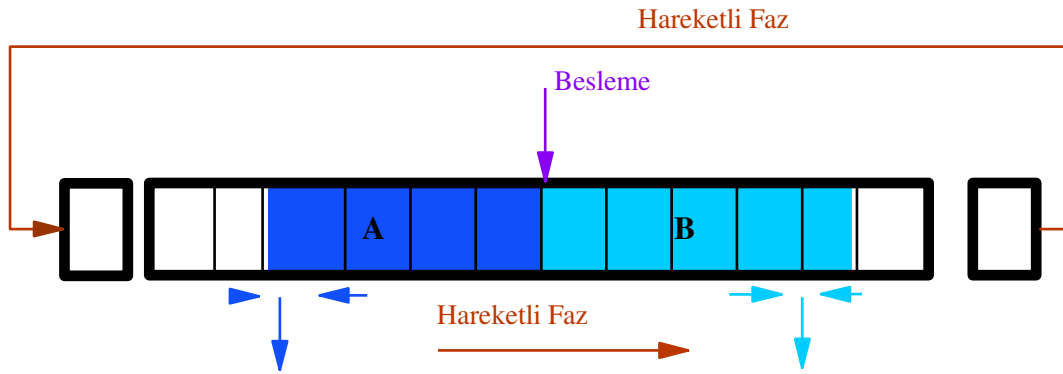
Şekil 2.8.(c)' de, katı faza adsorpsiyon ilgileri farklı olan iki bileşen kolon içinden iki ayrı fraksiyona ayrılmış şekilde çıkmaktadır. Besleme akımı ve hareketli faz prosese sürekli beslenmekte ve katı faz ise hareketli fazın tersi yönde kolon içerisinde sürekli olarak hareket ettirilmektedir. Bunun sonucu olarak, adsorpsiyon ilgisi fazla olan A bileşeni katı faz yönünde ilerleyerek kolondan çıkmakta ve ekstrat akımını oluşturmaktadır. Adsorpsiyon ilgisi düşük olan B bileşeninin ise hareketli faz ile desorpsiyonu gerçekleşmekte ve ekstrat akımını oluşturarak hareketli faz yönünde kolondan çıkmaktadır.

TMB, hareketli faz ile katı fazın ters akışı prensibi nedeniyle yüksek safiyette ürün eldesi sunan, sürekli bir prosesdir. TMB prosesi, katı fazın kolon boyunca sürekli hareketini gerektirmesi sebebiyle doğan dezavantajlar (sürekli katı faz hareketi sonucu kolonda aşınmalar, verim kaybı) ve teknik açıdan katı faz hareketini sağlayacak düzeneğin kurulmasındaki zorluklar nedeniyle sadece yaklaşımdan ibaret kalmış, pratiğe dökülememiş hipotetik bir saflaştırma tekniğidir.

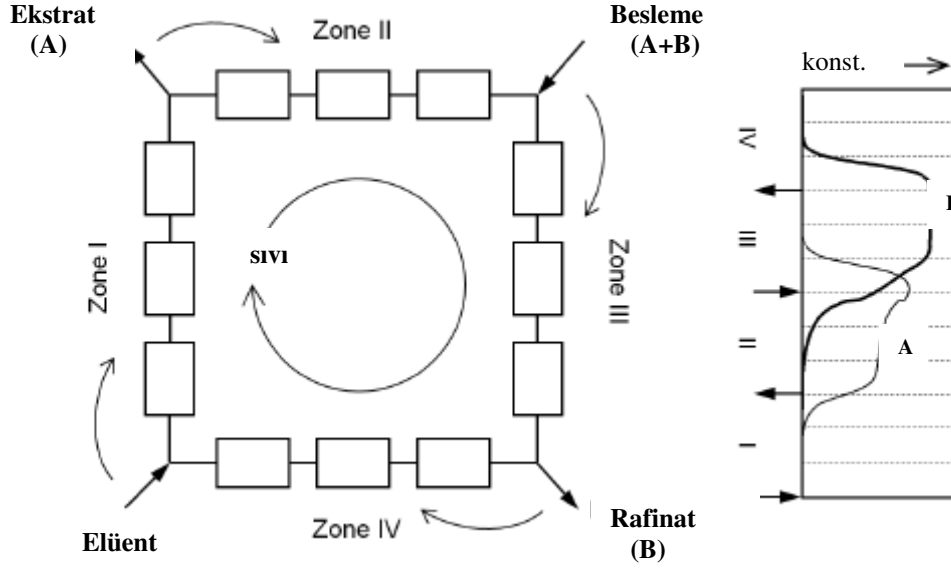
Bu soruna çözüm ilk olarak, 1961 yılında Broughton ve Gerhold tarafından getirilmiştir. Böylelikle, TMB prensibine alternatif olarak, hareketli yatak benzetimli kromatografisi (SMB) hayata geçirilmiştir.

2.6.2. Hareketli yatak benzetimli kromatografi (SMB) çalışma prensibi

TMB yaklaşımında tek bir kolonda katı faz hareketi yerine, SMB prosesinde sabit yataklı kromatografik kolon birbirine seri bağlı parçalara bölünmüştür (Şekil 2.9). TMB kavramındaki, katı faz ile hareketli faz arasındaki ters akış prensibi ise, parçalara bölünmüş kolonun, her bir parçasındaki giriş (besleme, elüent akımı) ve çıkış (rafinat, ekstrat akımı) portlarının, hareketli faz yönünde, periyodik olarak, belirli zaman aralıklarında, yer değiştirilmesi ile simüle edilmiştir (Şekil 2.10.a). Sisteme giren ve çıkan akımların senkronize olarak yer değiştirildiği bu zaman “değiştirme zamanı (switching time)” olarak adlandırılmış ve SMB prosesinin en önemli parametrelerinden birini oluşturmaktadır. Başarılı saflaştırma işlemi için, diğer proses parametreleri ile birlikte değiştirme zamanının optimizasyonu şarttır.



Şekil 2.9. TMB yaklaşımından, SMB prensibine geçiş



Şekil 2.10. Hareketli yatak benzetimli kromatografisi (SMB) çalışma prensibi. (a) SMB aparatının şematik gösterimi (b) iki bileşenli karışımların ayrışmasını gösteren tipik konsantrasyon profili (Seidel-Morgenstern et al., 2008)

TMB prosesinde katı faz hareketinin, SMB prosesinde simüle edilmesi değiştirme zamanı, t_s , ile sağlanmaktadır. Değiştirme zamanı, "Eş. 2.1" ile ifade edilmektedir.

$$t_s = \frac{V_{col} (1 - \varepsilon)}{Q_s} \quad (2.1)$$

Eşitlikte V_{col} kolon hacmi, ε kolon porozitesi, Q_s ise TMB prosesinde katı faz hacimsel akış hızıdır. SMB ve TMB proseslerini birbirine bağlayan ikinci önemli ifade ise her bir zone (j) için, iki sistemin sıvı faz hacimsel akış hızlarını birbirine bağlayan "Eş. 2.2" de verilmiştir.

$$Q^{SMB}_j = Q^{TMB}_j + \frac{Q_s \varepsilon}{1 - \varepsilon} \quad (2.2)$$

"Eş. 2.1 ve 2.2" sağlandığı ve SMB prosesinde seri bağlı kolonların sayısı artırıldıkça, SMB prosesi, TMB kavramını yaklaşımaktadır.

SMB prosesinin, periyodik karakteri sebebiyle, proses hiçbir zaman yatışkın duruma gelmez. Buna rağmen, belirli değiştirme zamanı sonunda, proses, periyodik yatışkın

duruma ("cyclic steady state") ulaşmaktadır. Periyodik yatışkın durumda, her bir çevrimde, özdeş rafinat ve ekstrat konsantrasyon profillerine rastlanmaktadır (Şekil 2.10.b).

TMB prosesindeki zone kavramı, SMB prosesi için de geçerlidir. SMB prosesinde her bir zone farklı bir görev üstlenmekte ve saflaştırma işlemi boyunca SMB' de, adsorpsiyon – desorpsiyon fenomeni aynı anda gerçekleşmektedir. Zone I'de adsorbentin (katı faz) rejenerasyonu gerçekleşmekte, zone II'de adsorpsiyon ilgisi düşük olan B bileşeninin (rafinat akımı), ekstrat portuna karışarak ekstrat akımını kirlenmesi engellenmekte, zone III'de rafinat akımının, adsorpsiyon ilgisi yüksek olan A bileşeni (ekstrat akımı) tarafından kirlenmesi engellenmekte ve zone IV'de hareketli faz rejenerasyonu gerçekleşmektedir (Pais et al., 1997).

Yukarıda anlatılanlar kısaca özetlenirse, klasik ve başarılı bir SMB prosesi için gerekli başlıca koşullar:

- A) Sabit işletme koşulları (besleme konsantrasyonu, akış hızları, değiştirme zamanı, kolon konfigürasyonu) uygulanmalıdır.
- B) Dört zone için, en az dört kolon olmalıdır.
- C) İzokratik koşulda çalışılmalıdır. Başka bir deyişle, bütün sistem boyunca, aynı elüsyon şiddeti uygulanmalıdır.
- D) Kolonlar arasında direkt bağlantı olmalıdır.
- E) SMB uygulamalarında en büyük amaç, yüksek ürün safiyetidir.
- F) Besleme ve elüent akımları uygun portlardan sisteme sürekli olarak verilmelidir.
- G) Ürünler, rafinat ve ekstrat portlarından sürekli olarak toplanmalıdır.

2.6.3. SMB teknolojisinin uygulanması

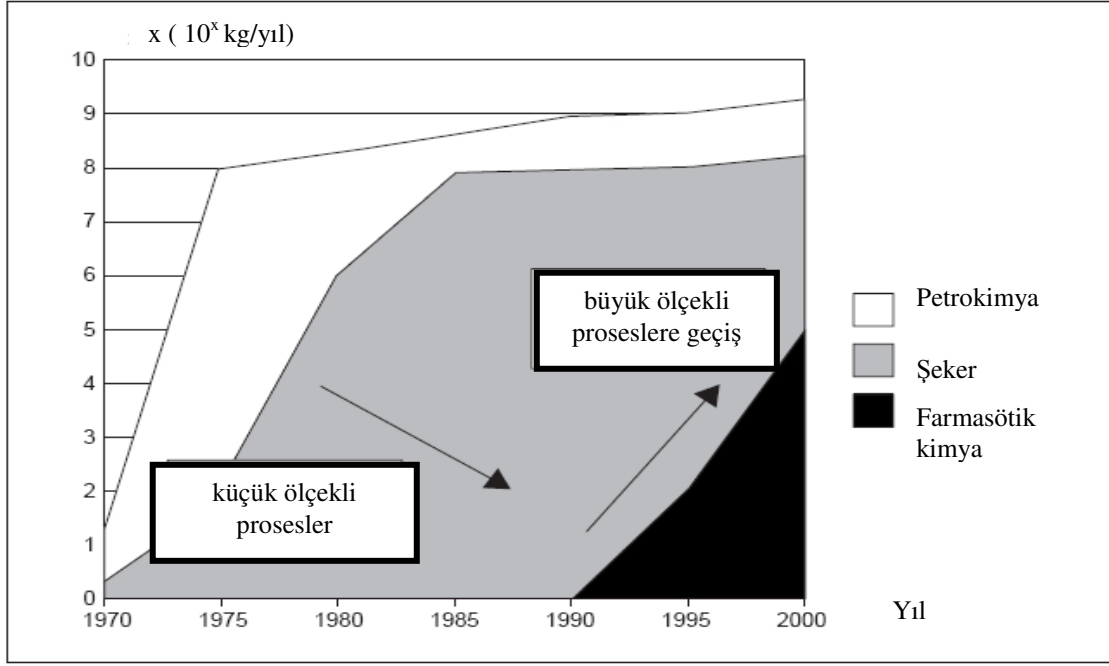
SMB kavramı ilk ortaya atıldığı yıllarda, sadece belirli saflaştırma işlemlerinde uygulama alanı bulmuştur. "Universal Oil Products (UOP, USA)" 1961 yılında, SMB prosesini çok güçlü bir ayırma teknolojisi olarak betimlemiştir. Bu teknoloji ilk olarak UOP tarafından, Sorbex adı altında kullanılmıştır. Sorbex teknolojisi, ilk büyük ölçekli, ticari, sürekli ayırma prosesidir ve kullanılan adsorbent/desorbent ikilisine göre belirli proseslere ayrılmıştır. Bunlardan ilk Sorbex birimi olan Molex prosesi 1964 yılında,

hidrokarbonlardan parafin saflaştırmasında; 1971 yılında uygulamaya geçen Parex prosesi, C₈ aromatik izomerlerinden (m-xylene, o-xylene, ethylbenzene) para-xylene saflaştırmasında; Sarex prosesi, şeker karışımından glukoz ve fruktoz saflaştırmasında kullanılmıştır. Şimdiye kadar, UOP dünya çapında 130'dan fazla Sorbex prosesinin lisansını elinde bulundurmaktadır. Sorbex SMB birimi elüent, besleme, rafinat ve ekstrat akımlarının pozisyonlarını adsorbent yatağı boyunca periyodik olarak değiştiren bir döner vanadan oluşmaktadır. Bununla beraber akımların pozisyonlarını senkronize olarak değiştiren her kolon arasına yerleştirilmiş bireysel çalışan vanalar da (Novasep, Fransa) alternatif bir SMB uygulama tekniği olarak kullanılmaktadır.

SMB teknolojisi, tarihsel açıdan bakılırsa, petrokimyasal ve şeker endüstrilerindeki uygulamalar, kiral bileşikler enantiyomerlerine ayırmaya yönelik uygulamalar ve prosesi geliştirmeye yönelik uygulamalar olmak üzere üç döneme ayrılmıştır (Şekil 2.11.).

UOP tarafından geliştirilen SMB prosesi, ilk olarak petrokimyasal endüstrisinde uygulama alanı bulmuş ve günümüzde genellikle katı faz olarak zeolitlerin kullanıldığı yılda milyon tonlara kadar varan ürün elde edildiği birçok SMB tesisi kurulmuştur. Bunlardan en büyüğü, iç çapı 9.0 metre, yüksekliği 1.0 metreyi bulan ve 24 kolondan oluşan Güney Kore'de ki SMB tesisidir. Bu tesisde, "Eluxyl Proses" adı altında SMB ile p-xylene saflaştırılmaktadır (Pavone, Hotier, 2000).

1990' ların başından itibaren, başta enantiyomerler olmak üzere eser kimyasalları saflaştırmak amacıyla, laboratuvar ölçekli ve pilot tesis SMB çalışmaları başlamıştır. Bu bağlamda, kesikli kromatografik işlemlerle gram bazında elde edilebilen kiral bileşiklerin, SMB uygulamaları ile ton bazında saflaştırılması mümkün kılınmaktadır. Günümüzde laboratuvar ölçekli çalışmaların yanında Novasep, Merck, Sandoz, UCB Pharma gibi birçok kuruluş SMB prosesi ile çeşitli kiral bileşiklerin saflaştırmasını gerçekleştirmektedir. SMB teknolojisi ile kiral bileşikler ayırtmak amacıyla kurulan ilk endüstriyel tesis ise Novasep tarafından 1999 yılında, UCB Pharma, Belçika'da kurulmuştur.



Şekil 2.11. SMB teknolojisinin tarihsel gelişim süreci (Ditz et al., 1998)

Tezin bu bölümünde, literatürde yer alan SMB prosesi kullanılarak yapılan çeşitli saflaştırma uygulamalarına yer verilmektedir.

Literatürde, SMB prosesi ile glukoz-fruktoz ayrıştırma yönelik çalışmalara sıkça rastlanmaktadır. Glukoz ve fruktoz lineer adsorpsiyon izotermine sahip olduklarından, daha çok SMB modelleme, simülasyon ve optimizasyon çalışmaları ile üçgen teorisinin uygulanmasında tercih edilmiştir (Ching ve Ruthven, 1985; Lameloise ve Viard, 1993; Hassan et al., 1995; Ma ve Wang, 1997; Rodrigues et al., 2001).

Literatürde, hareketli yatak benzetimli kromatografi ile biyo-saflaştırma çalışmalarına da yer verilmiştir. Gottschlich ve Kasche (1997), SMB ile hücre kültür ortamından, monoklonal antikoru %90 verimle elde etmiş, Wu et al (1999), PVP reçine ile dolu, 10 kolondan oluşan SMB birimi ile iki aminoasiti ayırmıştır. Bunlardan L-fenilalanin rafinat akımında %96.7, L-triptofan ise ekstrat akımında %99.7 verimle elde edilmiştir. Paredes ve Mazzotti (2006), plasmid DNA saflaştırmasında, kolon ve SMB kromatografik tekniklerini kullanmış ve bu iki tekniğin performansını karşılaştırmıştır. Sonuç olarak, SMB tekniğinin, kolon kromatografisine göre produktivitesinin 2 kat üstün olduğunu bildirmiştir.

Son zamanlarda, SMB uygulamaları, rasemik karışımlardan kiral bileşiklerin ayrıştırılmasına odaklanmıştır. Kiral bileşiklerin biyolojik özelliklerinin farklı olması sebebiyle yüksek safiyette ayrıştırılması özellikle farmasötik endüstri için önem teşkil etmektedir. SMB saflaştırma çalışmalarında, çoğunlukla selüloz ve amiloz tabanlı kiral sabit fazlar kullanılmaktadır (Schulte et al., 2001). Yayımlanmış çalışmalar, iç çapı 16 mm-200 mm arasında değişen kromatografik kolonlarda değişmektedir. Proses optimizasyonu ile birim kilogram kiral sabit faz başına günde 10 gramdan 1000 grama kadar değişen enantiyomer prodüktivite eldesi mümkün kılınmaktadır. Pais et al. (1997) ve Silva et al. (2002) 12 kolondan oluşan SMB biriminde, her zone başına düşen kolon sayılarını değiştirmiş ve farklı SMB konfigürasyonlarında enantiyomerlerin saflığını incelemiştir. Bunun yanında, Ludemann et al. (2000) kiral bileşiklerin SMB ile ayrışmasında, sistemi oluşturan kolonlarda basınç düşmesini esas alarak sabit faz partikül boyutu optimizasyonuna yönelik çalışmalar yapmıştır.

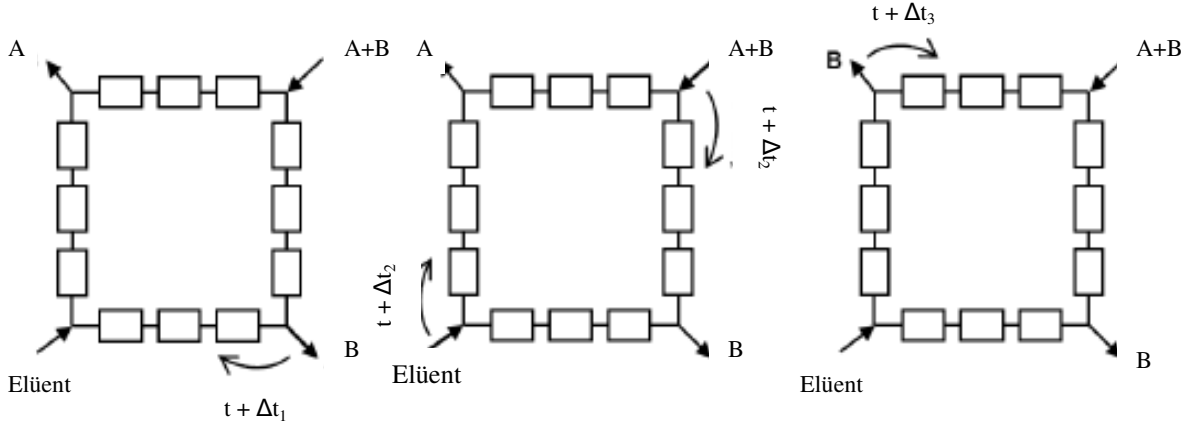
Andreev et al. (2000), 6 cm yüksekliğinde, 9 kolondan oluşan SMB sisteminde hidrojen izotopları olan trityum ve döteryumu birbirinden ayırmıştır. İzotop saflaştırması için adsorbent olarak paladyumu kullanmış ve sonuçta elde edilen trityum izotopunun %99' u geri kazanılmıştır. Bunun yanında Kruglov et al. (1996), yaptığı literatür çalışmasında nitrojen izotoplarını, iyon değiştirme reçinesi kullanarak SMB ile ayıştırmıştır.

2.6.4. SMB proses modifikasyonları

Klasik SMB işletiminde hareketli faz bütün SMB birimi boyunca aynı (izokratik çalışma), akış hızları ve besleme konsantrasyonu gibi çalışma parametreleri ise sabit tutulurken, sisteme giren ve çıkan akımlar senkronize olarak yer değiştirmektedir. Bunun yanında, kolon sayısı, sistem konfigürasyonu, çalışma sıcaklığı sabit tutulmaktadır. SMB kromatografisinin uygulama alanını genişletmek ve performansını arttırmak amacıyla her zone başına düşen sabit kolon sayısı, sabit akış hızı ve sabit değiştirme zamanı ile işletilen klasik SMB çalışma modunun dışına çıkan sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerin ortak amacı, sabit faz kullanım kapasitesini, ürün safiyetini ve prodüktiviteyi arttırmak bunun yanında solvent gereksinimini en aza indirmektir. SMB prosesini diğer saflaştırma işlemlerinden üstün tutmak ve prosesi bir adım daha ileriye taşımak adına geliştirilen bu farklı işletim türlerinden en göze

çarpanları Varicol, Powerfeed, Modicon, SMB – geri besleme, gradient uygulama yöntemleri ve reaktif SMB prosesidir.

Varicol prosesi, Novasep (Fransa) tarafından önerilmiş ve ticarileştirilmiş bir SMB uygulamasıdır (Adam et al., 2002). Varicol prosesinde, "switching time" (değiştirme zamanı) parametresi alt aralıklara bölünmüştür. Başka bir deyişle bu prosese giren besleme ve elüent ile sistemden toplanan rafinat ve ekstrat akımları senkronize olmayan biçimde yer değiştirmektedirler. Proses giren ve çıkan akımların birbirlerine eş zamanlı olmayan biçimde yer değiştirmesi ile zone uzunlukları farklılık göstermektedir. Böylelikle, Varicol prosesi ile kolon konfigürasyonunun (her zone başına düşen kolon sayısı) ve zone uzunluklarının sabit olduğu SMB uygulamasının dışına çıkılmaktadır.



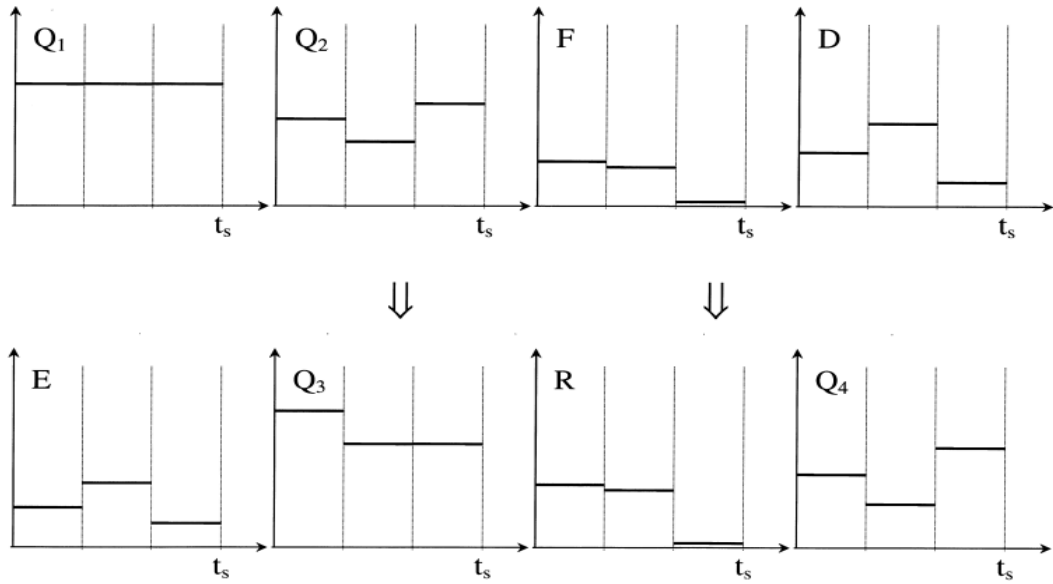
Şekil 2.12. Varicol prensibi, üç farklı zamanda port pozisyonlarının senkronize olmayan değişimi, Δt_i portların değişme aralığını ifade etmektedir. (Ludemann et al., 2000)

Şekil 2.12.'de değiştirme zamanı ile Δt_i gösterilen alt aralıklara bölünmüştür. Adsorpsiyon ilgisi düşük olan B bileşeni toplama noktası Δt_1 zaman sonra sıvı faz hareket yönünde pozisyon değiştirmiş ve bu esnada diğer portlar (ekstrat, elüent ve besleme noktaları) sabit kalmıştır. Akabinde, Δt_2 zaman sonra besleme ve elüent giriş portları yer değiştirmiş, bir sonraki kolona atlamıştır. Δt_3 zaman sonra ise adsorpsiyon ilgisi yüksek olan A bileşeni toplama noktası yine sıvı faz hareket yönünde yer değiştirmiştir. Şekil 2.12.'de başlangıçta 3/3/3/3 olan kolon konfigürasyonu, Δt_1 zaman sonra 3/3/4/2, Δt_2 zaman sonra 2/4/2/4, Δt_3 zaman sonra ise 4/2/3/3 olmak üzere değişmiştir.

Varicol prensibi, saf ürün eldesi için gerekli sabit faz miktarı ve kolon sayısında azalma sağlamakta; ancak optimum çalışma parametrelerinin bulunması için proses modellenmesini de gerektirmektedir.

Literatürde, genellikle Varicol ve SMB performanslarını karşılaştırmaya yönelik çalışmalara yer verilmiştir (Nicoud et al., 2003; Gomes et al., 2006; Toumi et al., 2007; Rajendran et al., 2008). Pais ve Rodrigues (2003), yaptıkları çalışmada değişik SMB konfigürasyonlarını (1/2/1/1, 1/1/2/1 ve 1/2/2/1), 5 kolondan oluşan Varicol prosesi (1/1.5/1.5/1) ile karşılaştırmış ve sonuç olarak Varicol prosesinin ürün safiyeti ve prodüktivite açısından SMB performansına üstün geldiğini göstermiştir.

SMB ayrıştırma performansını arttırmanın diğer bir yolu ise her bir switching periyodu süresince sıvı akış hızlarını değiştirmektir. Morbidelli ve Mazzotti (2002) ile Zhang et al. (2003) tarafından önerilen bu çalışma modu "Powerfeed" olarak adlandırılmıştır. Varicol prosesi gibi Powerfeed işletimi de klasik SMB birimine göre daha çok bağımsız değişkene sahip olduğundan bu proses modunda işletim sırasında optimizasyon zorluğu yaşanmaktadır. Klasik SMB uygulamasında sisteme giren besleme (F) ile elüent (D) ve sistemden çıkan rafinat (B) ile ekstrat (A) akımları akış hızları ile sistem içi akış hızları olarak adlandırılan her bir zone akış hızının (Q_1 , Q_2 , Q_3 ve Q_4) sabit olmasına rağmen, Powerfeed işletim koşulunda dört bağımsız akış hızı (Q_1 , Q_2 , F ve D) zamanla değişmekte, diğer dört akış hızı değişimi ise kütle denkleğinden ($Q_3=Q_2+F$, $Q_4=Q_1-D$, $R=Q_3-Q_4$, $E=Q_1-Q_2$) hesaplanabilmektedir.



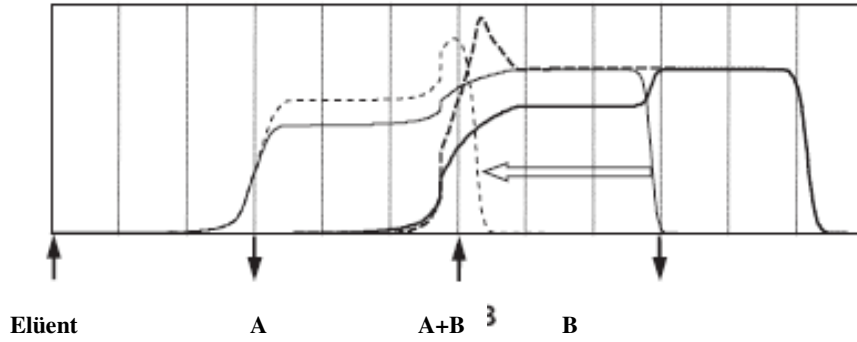
Şekil 2.13. Powerfeed, bir periyot içinde akış hızı değişim örneği (Morbidelli et al., 2003)

Şekil 2.13'de verilen Powerfeed modunda çalıştırılan, SMB saflaştırma işlemi sırasında bir switching periyodu sırasında uygulanan üç farklı sıvı faz akış hızları görülmektedir. Bunlardan Q_1 sabit tutulurken, Q_2 , F ve D akış hızları bir switching periyodunun üç alt aralığında değişmekte ve bunlara bağlı olarak da E , Q_3 , R ve Q_4 akış hızları değişim göstermektedir.

Bu tekniğin arkasındaki strateji, ürünlerin konsantrasyon profilinin zamana bağlı değişimi bilgisine dayanarak, sistem içi akış hızlarını değiştirerek SMB kolonu boyunca konsantrasyon profillerini etkilemek ve böylece ürün akımlarını daha yüksek safiyette elde etme olasılığıdır.

Seidel – Morgenstern et al. (2003) tarafından geliştirilen Modicon tekniğinde, besleme konsantrasyonu, her switching periyodu aralığında modüle edilmektedir. Besleme konsantrasyonu değişimi, besleme akımının biri yüksek diğeri düşük konsantrasyona sahip iki farklı rezervuardan oluşması ile gerçekleşmektedir. Beslemeyi oluşturan bileşenlerin adsorpsiyon izotermi lineer olmadığı takdirde, besleme konsantrasyonu, bu bileşenlerin kolon boyunca taşınma hızlarını ve konsantrasyon profillerini etkilemektedir. Bu nedenle Modicon tekniğine dayalı SMB işletmesi sadece lineer olmayan adsorpsiyon izotermine sahip sistemler için uygundur.

Şimdiye kadar, Modicon prensibi ile saflaştırma işlemleri için genel modelleme tekniği bulunmamakta ve sadece Langmuir izotermine uyan sistemler için modelleme geliştirilmiştir (Lübke et al., 2007). Buna rağmen, Langmuir adsorpsiyon izotermine sahip bileşenlerde, başlangıç durumunda bir süre beslemeyi çok düşük konsantrasyonda veya sıfır konsantrasyonda (sadece elüent enjeksiyonu ile) sisteme verip, switch periyodunun sonuna doğru konsantrasyonu olabildiğince yükseltme ile ürün saflığının arttığı bilinmektedir (Zhang et al., 2004). Ayrıca, Schramm et al. (2005), Langmuir adsorpsiyon izoterm durumunda Modicon prosesinin, Powerfeed tekniği ile karşılaştırıldığında, prodüktivite, solvent gereksinimi ve ürün konsantrasyonu yönünden üstün geldiğini literatür çalışmasında belirtmiştir.

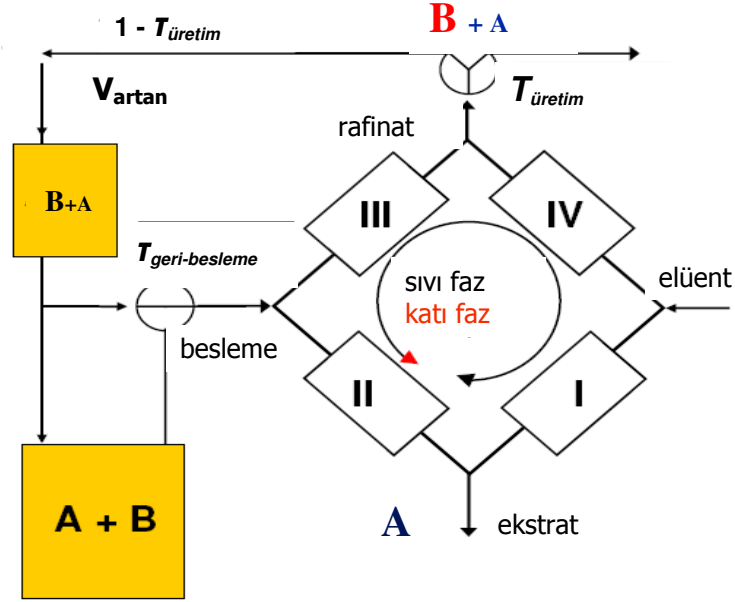


Şekil 2.14. SMB prosesinde (düz çizgi) ve Modicon prosesinde (kesikli çizgi) ürün konsantrasyon profilleri (Seidel – Morgenstern et al., 2008)

Şekil 2.14.'de klasik SMB prosesi ile Modicon prosesinin konsantrasyon profillerini karşılaştırılmaktadır. Buna göre, Modicon modunda, adsorpsiyon ilgisi yüksek olan bileşenin (ekstrat akımı), rafinat akımından uzaklaştığı böylelikle aynı prodüktivite ile daha yüksek saflıkta ürün elde edildiği görülmektedir.

SMB teknolojisindeki en yeni gelişme, Seidel-Morgenstern et al. (2007) tarafından patenti alınan SMB-geri besleme (Feed-back SMB, FF-SMB) tekniğidir. Bu teknik rafinat veya ekstrat akımında istenilen saflığa ulaşılmadığı zaman, ürün saflığını artırmak amacıyla geliştirilmiştir. Şekil 2.15.'de görüldüğü üzere ekstrat tarafından kirletilen rafinat akımı, matematiksel modelleme sonucu belirlenmiş, $\tau=t/t_s$ ifadesi ile belirtilen, $\tau_{\text{üretim}}$ anında üç-yollu vana kullanılarak toplanmakta ve bir kısmı sistemden dışarı atılmaktadır. Geriye kalan akım ise $1-\tau_{\text{üretim}}$ süresi boyunca tampon tankına gönderilmekte ve buradan besleme akımına alternatif olarak üç-yollu vana ile tekrar

SMB birimine verilmektedir. Her switching periyodunda tekrarlanan bu işlem ile istenilen ürünün safiyeti artarken, ürün prodüktivitesinde herhangi bir düşüş yaşanmamaktadır.



Şekil 2.15. SMB – geri besleme yöntemi şematik gösterimi

Seidel – Morgenstern et al. (2008) literatür çalışmasında, FF-SMB tekniğinin matematiksel modellemesini geliştirmiş ve bu tekniği klasik SMB ile sisteme geri besleme yapılmadan ürün akımlarından birinin sistemden kısmi olarak atıldığı, bu nedenle ürün saflığı artarken prodüktivitenin düştüğü "Kısmi Atım (Partial Discard)" stratejisi ile karşılaştırmıştır.

Analitik kromatografi çalışmalarında, sıkça kullanılan gradient uygulamasında sıcaklık, solvent kompozisyonu, pH gibi değişkenler geçici olarak değiştirilmektedir. Bu uygulamanın amacı, adsorpsiyon özellikleri farklı olan bileşenlerin kolon içinde çözünürlüğünü arttırmak ve elüsyonlarını sağlamaktır. Bu konsepti SMB prosesinde özellikle farklı görevleri olan zone I ve zone IV için uygulamakta yarar vardır. Sabit faz rejenerasyonunun gerçekleştiği zone I'de alıkonma zamanının kısa (Henry sabitinin düşük), hareketli faz rejenerasyonunun gerçekleştiği zone IV'de ise alıkonma zamanının uzun (Henry sabitinin yüksek) olması, sistem performansını önemli ölçüde arttırmaktadır. Kısaca uygun bir gradient uygulamasında, bileşenlerin

alıkonma zamanı zone I- IV arası giderek artmalıdır. SMB uygulamalarında gradient, sıcaklık, solvent kompozisyonu ve basınç değişimi ile gerçekleştirilmektedir.

Sıcaklık gradient (değişim) uygulamasında, bileşenlerin Henry sabiti sıcaklık artışıyla dūřmektedir. Bu nedenle SMB prosesinde zone I- IV arası sıcaklık azaltılmalıdır. Sistemde sıcaklık değişimi, SMB ünitesini oluşturan kolonların etrafı ceketlenerek gerçekleştirilmektedir. Migliorini et al. (2001), SMB ile saflaştırma işleminde sıcaklık değişimi uygulandığı takdirde prodüktivite artışı, SMB optimizasyon yöntemlerinden biri olan üçgen diyagramı üzerinde göstermiştir. Buna karşı, sıcaklık gradient uygulaması pratik açıdan incelenirse bazı kısıtlamalar göze çarpar. Kolon duvarının ve sabit fazın ısı aktarımı önem kazanmakta ve bu nedenle kolon içerisinde termal dengeye ulaşılması için gereken zaman, bileşenlerin alıkonma zamanlarından daha uzun sürebilmektedir.

SMB – gradient uygulamasında ikinci yöntem solvent kompozisyonu değişimi ile bileşenlerin elüsyon profillerini değiştirmektir. Solvent gradient uygulaması, besleme akımını oluşturan bileşenlerin Henry sabitinin solvent kompozisyonuna bağlı olduğu durumlarda kullanılmaktadır. Aumann et al. (2006), tarafından patenti alınan bu yöntem, SMB prosesi ile biyomolekül ayrışmasında kullanılmıştır.

Clavier et al. (1996), SMB prosesinde süperkritik elüent kullanımı (SF-SMB) ile basınç gradienti uygulanabileceğini önermiştir. En çok kullanılan süperkritik akışkanlardan karbondioksit ucuz, toksik özellik taşımayan ve kolay elde edilebilirliği ile öne çıkmakta ayrıca ayrışan bileşenlerden kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi ile konsantre ürün eldesini mümkün kılmaktadır. Süperkritik akışkanlar, sıvıya benzer yoğunluğa ve gazıya benzer vizkoziteye sahip olduklarından kromatografik saflaştırma işlemlerinde hareketli faz olarak özellikle organik solventlere tercih edilirler. Bu tarz akışkanların bir diğer önemi ise basınç değişimi ile solvent özelliklerinin değişebilmesidir. SMB ünitesinde ekstrat desorpsiyonunun gerçekleştiği zone yüksek yoğunluğa sahip, rafinat adsorpsiyonunun gerçekleştiği zone ise düşük yoğunluğa sahip elüent ile beslenmelidir. Elüent olarak süperkritik akışkan kullanmak bu koşulları sağlamaktadır. Böylelikle SMB uygulamalarında, bileşenlerin ayrıştırma işlemi daha hızlı gerçekleşmekte ve kolon boyunca basınç dūřmesi azalmaktadır.

SF-SMB saflaştırma çalışmalarına literatürde sıkça rastlanmaktadır (Mazzotti et al., 2001; Depta et al., 2002; Rajendran et al., 2005; Taylor, 2008).

SMB prosesinde, kimyasal reaksiyon sonucu oluşan bileşenlerin ayrışması yöntemi "reaktif SMB (SMBR)" olarak adlandırılmıştır. SMBR prosesinde kimyasal reaksiyon ve adsorpsiyona bağlı ayrışma prensipleri birlikte uygulanmaktadır. Bu uygulama özellikle dengeye ulaşması zaman alan dekompozisyon reaksiyonlarında eser kimyasallar ile farmasötik kimyasalların eldesinde sistem performansını önemli ölçüde arttırmaktadır. Örneğin $A \leftrightarrow B+C$ tepkimesinde, reaktant A besleme akımını oluşturmakta ve ürünler B ve C ayrışarak SMBR biriminden farklı akımlar halinde çıkarlar. Bu tarz uygulamalarda reçine seçimi önem kazanmaktadır; çünkü reçine hem katalizör hem de bileşenleri adsorbe etme özelliği ile sabit faz görevini üstlenmektedir. Bu nedenle reçine olarak polimerler seçilmektedir. Literatürde yer alan SMBR uygulamaları ilk dönemlerde genellikle enzimatik şeker hidrolizi ve izomerizasyonuna (Azevedo ve Rodriques, 2001) yönelik olmakla beraber laktoz-maltoz hidrolizi (Hashimoto et al., 2001), büyük molekül kütleli dekstran üretimi (Barker et al., 1993), katalizör olarak SO_2 bazlı iyon değiştirme reçinelerini eşliğinde asetik asit esterleşme tepkimelerinin (Mazzotti et al., 1996) ve sistem modellemesinin (Schmidt-Traub et al., 1999; Lode et al., 2001) yer aldığı birçok çalışma mevcuttur.

SMB teknolojisinin sadece iki bileşenli karışımları ayırmaya uygun olması sebebiyle ortaya çıkan kısıtlamaları engellemek için geliştirilen tekniklerden ilki, iki SMB birimini seri bağlayarak üç bileşenli karışımları ayırmaya yönelik çalışmalar (Rodrigues ve Mata, 2001; Kurup et al., 2006) bir diğeri ise "Pseudo-SMB" adı altında işletilen uygulama yöntemidir (Silva ve Rodriques, 2005). Bu yöntemde, SMB uygulaması iki ayrı basamağa ayrılmıştır. İlk basamakta elde edilen yan ürün ikinci basamakta besleme akımı yerine sisteme verilmektedir.

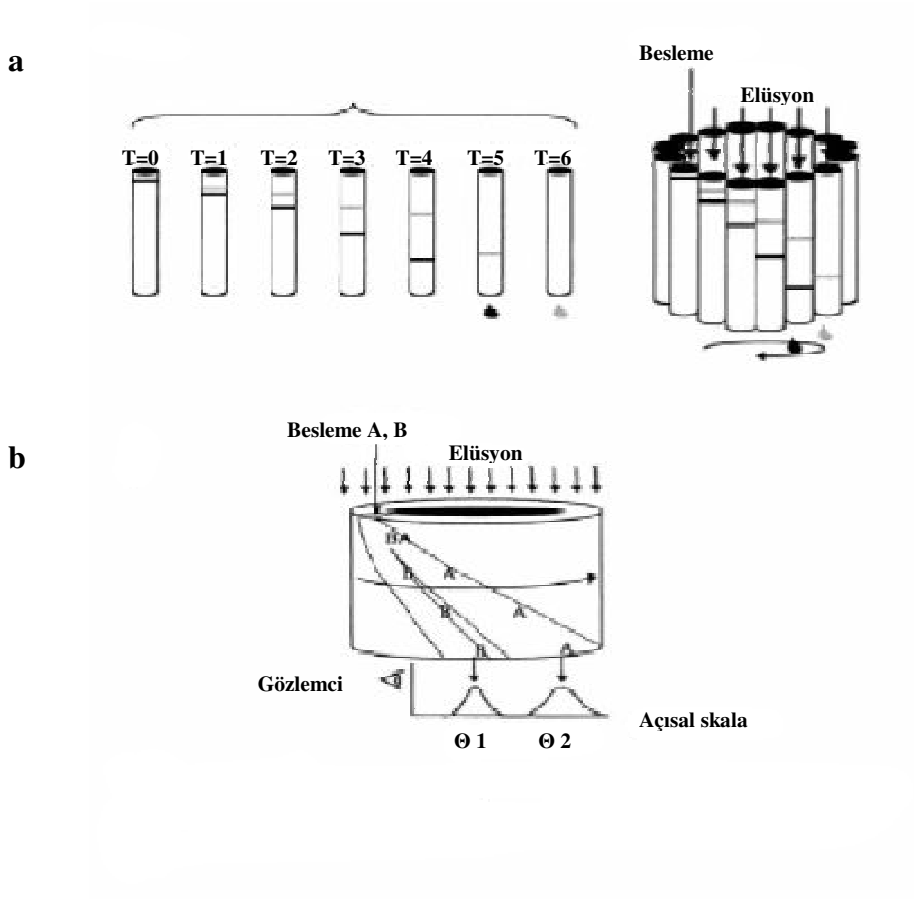
2.7. Sürekli Annular Kromatografi

Sürekli annular kromatografi (CAC) prensibinin ortaya atılmasından önce elüsyon kromatografisi, çok bileşenli kompleks karışımları birbirinden ayırmak için tek yol olarak kabul edilmiştir. Özellikle biyoteknoloji alanında protein, antikor veya nükleik asit gibi kompleks yapıları biyomoleküllerin izolasyonunda kolay uygulanabilirliği, çok yönlülüğü ve yüksek ayırma kapasitesi nedeniyle elüsyon kromatografisi tercih edilmektedir. Buna rağmen, kesikli olması sebebiyle preparatif ölçekte kolonun kapasite/yüklenebilirlik durumu ve dolayısıyla verimi kromatografik işlemler için kısıtlayıcı faktör teşkil etmektedir. Kromatografik ayırma proseslerinin büyük ölçeğe adaptasyonu ve besleme enjeksiyonu ile ürün uzaklaştırma işlemlerinin sürekli hale getirilmesi fikri ile kromatografi endüstride daha iddialı hale gelmiştir.

Sürekli Annular Kromatografi fikri ilk kez 1949 yılında Dr. A. J. P. Martin (1952 Nobel Kimya Ödülü) tarafından Dr. A. W. K. Tiselius (1948 Nobel Kimya Ödülü, 1952 Nobel Kimya Ödülü Sunuş Konuşmacısı) ve Dr. R. L. M. Synge (1952 Nobel Kimya Ödülü'nü Dr. Martin ile paylaşmıştır) ile yaptığı tartışmalardan sonra endüstriyel uygulamalarda kullanılmak üzere ortaya atılmış (Brooks Cole, 2003) ve o zamandan bu yana bu sistemle ilgili çok çeşitli kavramsal tasarımlar ileri sürülmüştür. Martin yazısında, kromatografinin sürekli bir proses haline getirilebileceğini, farklı yarıçaplı eş eksenli iki silindir aralığındaki yatağa sabit fazın doldurulması ile elde edilecek kolonun üst kısmına, ayrılmak istenen besleme karışımının sabit bir noktadan yavaşça beslenmesi gerektiğini açıklamıştır. Bununla beraber Martin silindirler yavaşça ve eş zamanlı olarak döndürülürken yatağa sürekli olarak verilen elüent çözeltisinin, beslemedeki bileşenlerin karakteristiklerine bağlı olarak farklı helis bantlar yaparak silindirlerin alt kısmında belli noktalardan çıkacağını belirtmiştir (Uretschlager ve Jungbauer, 2002).

1949 yılında Martin sürekli kromatografiyi temsil eden ve o zamanlar için bilinen tüm kromatografi türleri için uygulanabilir olan annular kromatografi sistemini tasarlamıştır. Bununla birlikte Martin annular kolona alternatif olarak dairesel şekilde sıralanmış kolon dizilerini düşünmüştür. Aynı yıllarda Svensson (1955) da Martin'den bağımsız olarak tam tarif edilen bu sistemi yapmaya başlamıştır. Sistem 36 adet tüpün (11 mm I.D.) geniş ve yavaşça dönen bir daire etrafına sıralanmasından oluşmaktadır. Bu

kolon topluluğu dönerken özel olarak tasarlanmış sıvı akış dağıtıcısı bir yandan yerçekimi kuvvetinin de yardımıyla her kolona eşit miktarda elüent girmesini ve akışını sağlamakta diğer yandan da kolonların arasına sıvı fazın kaçmasına engel olmaktadır. Bunların aksine besleme noktası ve ürün toplama noktaları sabit kalmakta ve kromatografik olarak ayrılmış bileşenler belirlenen toplama noktalarından sürekli şekilde toplanmaktadır.



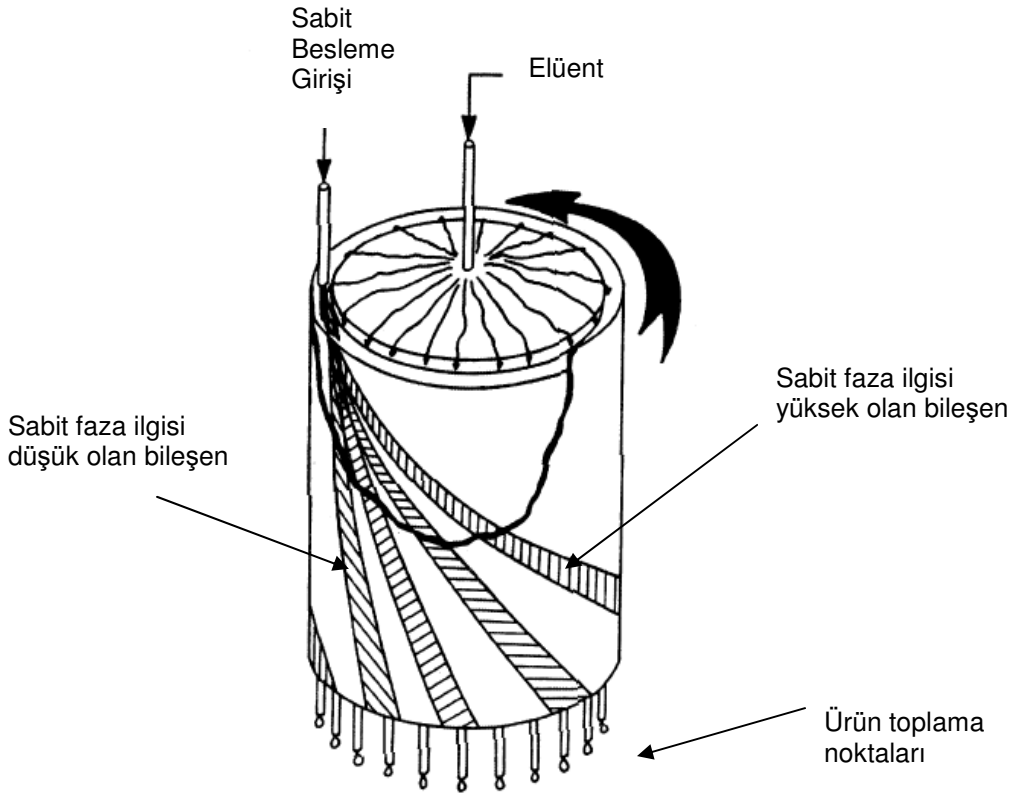
Şekil 2.16. Sürekli annular kromatografi sistemi ile ayırma işlemi. (a) kolon tabanlı ayırma. (b) annular kolon. (Hilbrig ve Freitag, 2003)

Şekil 2.16.'de, annular kromatografi ayırma tekniği şematik olarak gösterilmektedir. Ayrılması istenen bileşenleri içeren besleme akımı, seri halde bulunan kesikli kromatografik kolon dizisine sabit bir noktadan sürekli olarak beslenmektedir. Döner bir silindir üzerinde bulunan kolonlardan her biri besleme noktasından geçtiğinde belli miktarda karışım kolonlara beslenmiş olmaktadır. Böylece, her kolon için ayırma prosesi başlamış olmakta ve belli bir süre sonra ayrılan bileşenler kolonu terk

etmektedirler. Bileşenlerin kolonu terk etme olayı, elüsyon süresine bağlı olarak kolon belli bir açıya kadar hareket ettiğinde gerçekleşmektedir (Şekil 2.16.(a)). Dizi halinde bulunan kolonlar, tek bir kolona indirildiği takdirde de aynı mekanizma geçerli olmaktadır (Şekil 2.16.(b)).

2.7.1. Sürekli annular kromatografi çalışma prensibi

Günümüzde ayırma işlemlerinde sıkça kullanılan sürekli annular kromatografi cihazında, sabit fazı oluşturan adsorbent iç içe geçmiş iki silindir arasında doldurulmaktadır. Sabit fazın doldurulduğu bu kısma annulus adı verilmekte ve tekniğin ismi buradan gelmektedir.



Şekil 2.17. Sürekli annular kromatografi sisteminin şematik gösterimi.

Ayrılmak istenen besleme karışımı, annular kolonun üst kısmından sabit bir noktadan verilirken, elüent annular kolonun üst kısmından bütün noktalardan sisteme beslenmektedir. Ayırma işlemi esnasında, annular yatak düşey eksenini etrafında sabit

bir açısal hız ile sürekli olarak dönmektedir. Besleme karışımındaki bileşenler, kolon dolgu maddesi olan sabit faza ilgilerine göre kolon içerisinde farklı yollar izleyerek, besleme enjeksiyon noktasına göre farklı açısal konumlardan kolonu terk etmektedirler. Kolon içerisinde en az alıkonan başka bir deyişle sabit faza ilgisi en az olan bileşen, elüsyon sonucu kolonu besleme noktasına en yakın açısal noktadan terk etmektedir. Bunun yanında, alıkonması fazla olan başka bir deyişle sabit faza ilgileri daha yüksek olan bileşenler kolonu dönüş yönünde artan açılarla terk etmektedirler (Şekil 2.17.).

Sürekli Annular Kromatografi, geleneksel kromatografinin tek boyutlu ve değişkin durumda çalışan proseslerinin yerini iki boyutlu ve yatışkın durumda çalışan proseslerin almasını sağlamaktadır. Geleneksel kromatografide ayrıştırılan bileşenler kolonu farklı zamanlarda terk ederken, annular kromatograf sisteminde bileşenler kolonu farklı açılardan terk etmektedirler. Aynı zamanda, kesikli çalışan klasik elüsyon kromatografik sistemler ile kıyaslandığında, annular kromatografinin sürekli bir proses olması ve yatağın sabit bir hızla dönmesine bağlı olarak bileşenlerin kolon içerisinde helis bantlar oluşturarak kolonu terk etmeleri sonucu yüksek safiyette ürün eldesi özellikleri öne çıkmaktadır. Bu avantajlarına bağlı olarak, annular kromatografi büyük ölçekli ayırma işlemlerinin gerçekleştirildiği endüstriyel alanlarda tercih edilmektedir.

Sürekli annular kromatografi, çok bileşenli karışımları ayırmada elverişli bir sistem olması sebebiyle, sadece iki bileşenleri karışımların ayrılabilirdiği hareketli yatak benzetimli kromatografi (SMB) cihazından, ayrılan bileşen sayısı açısından üstün gelmektedir. Bunun yanında, annular kromatografi de hareketli faz ile sabit faz arasında paralel (crosscurrent) akış gerçekleşirken, SMB sisteminde hareketli faz ile sabit faz arasında ters (countercurrent) akış prensibi mevcuttur. Buna bağlı olarak, SMB sisteminde prodüktivite, annular kromatografi ile kıyaslandığında çok daha yüksektir. Seidel-Morgenstern (1998) çalışmasında, elüsyon kromatografisi, geri döngülü kromatografi, hareketli yatak benzetimli kromatografi ve annular kromatografik ayırma yöntemlerini karşılaştırmış ve sonuç olarak SMB sistem prodüktivitesinin diğer üç ayırma tekniğinden çok daha üstün olduğunu kanıtlamıştır.

Annular ve SMB arasındaki bir diğer farkı ortaya koyan çalışma da Wankat (1997) tarafından yapılmıştır. Wankat, annular kromatografik ayırma işlemlerinde, çalışma parametrelerinin optimizasyon kolaylığından bahsetmiş ve bunun için kesikli kromatografik sistemde zaman skalasının, annular kromatografide açılı skalasına dönüştürüldüğü takdirde yeterli olacağını ileri sürmüştür. Bunun yanında, birçok çalışma parametresine sahip, SMB sisteminde optimizasyon problemi yaşanmaktadır. Ayrıca birden fazla kolon içeren SMB işletimi, sisteme ait pompa ve vanaların kontrolünü gerektirdiğinden, annular kromatografiye kıyasla çok daha zordur (Heuer et al., 1998).

2.7.2. Sürekli annular kromatografi teknolojisinin uygulanması

Martin (1949) tarafından geliştirilen annular kromatografi prensibine alternatif yöntem Sevansson (1950) tarafından geliştirilmiştir. Bu teknik, birden fazla kolon kullanarak çoklu karışımların ayrılmasını amaçlamaktadır. Birden fazla kolon içeren bu tarz sistemlerde, kolonların aynı akış dirençlerine sahip olabilmeleri için her bir kolonun sabit faz ile eş özellikte doldurulması gerekmektedir. Sevansson ve grubu bu nedenle kurdukları sistemde, bekledikleri düzenli akış elde edememişler ve çok sayıda kolonu eş değer şekilde doldurmaktansa, tek bir kolonu doldurmanın hata yapma olasılığını önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir.

Dairesel seri şeklindeki kolon sistemiyle organik solventlerin preparatif amaçlı ilk başarılı gaz kromatografik ayırma işlemine imza atan Dineli ve ekibi (1962) olmuştur. Dineli, preparatif boyuttaki gaz kromatografi sistemi için dönen bir silindirik tabaka üzerine monte edilmiş 100 adet sabit kolondan oluşan bir cihaz geliştirmiştir. Gaz karışımlarının ayrılması için döner kromatografi sisteminin kullanılması ve tasarımı üzerine daha ileri boyuttaki teorik çalışmalar Giddings tarafından gerçekleştirilmiştir. Giddings (1962) özellikle ticari uygulamalar için aynı hacimde çalışan döner annular kolonun sabit yatağa olan üstünlüğünü teorik olarak göstermiştir. Ayrıca çoğu endüstriyel dolgu kolon uygulamalarının büyük çaplardaki akışlarda düzensizlikler sergilediğini ve bunun da plaka yüksekliğinin artmasına ve çözünürlük kaybına sebep olduğunu kanıtlamıştır. Akış düzensizliklerinin önüne geçecek kadar küçük annulus aralığına sahip olmak şartıyla, sabit yatak ile aynı kesit alanına ve yatak yüksekliğine sahip bir döner kolon kullanılarak, proses için hiçbir çözünürlük kaybına uğramadan

ölçek büyütme işlemi gerçekleştirilebilmektedir. Giddings ayrıca kolon geometrisinden ve benzetilmiş (simulated) sürekli işlemlerde olduğu gibi besleme enjeksiyonu ile ürün uzaklaştırma gibi zamana son derece bağlı değişkenlerin etkisinin olmamasından dolayı sürekli bir işlemde proses kontrolün çok daha kolay olduğuna dikkati çekmiştir.

Büyük ölçekli çalışmalara izin veren asıl büyük gelişme ise yerçekimi ile akış sağlayan önceki cihazlara basınçlandırma sistemlerinin takılması ile sağlanmıştır. İlk başarılı prototip 1976 yılında Scott ve diğerleri tarafından ORNL'de (Oak Ridge National Laboratory) geliştirilmiştir. İlk deneylerde mavi dekstran 2000 (molekül ağırlığı 2 000 000 olan çözünen bir dekstran) ile kobalt klorür büyüklükçe ayırma reçinesinde, nikel-kobalt iyonları iyon değiştirme reçinesinde birbirinden ayrılmıştır. Günümüze kadar sürekli annular kromatografi sistemi ve bu sistemle gerçekleştirilen prosesler ile ilgili çok çeşitli ilerlemeler kaydedilmiştir. Canon ve Sisson (1978) besleme akışkanlarının birbiri ile karışmasını önlemek amacıyla kromatografi cihazının üst kısmında cam boncuklar kullanarak besleme çözeltisinin güzel bir biçimde dağılımını sağlamışlardır. Bu ikili ayrıca nikel-kobalt sistemi için adımsal (stepwise) elüsyonun kullanımını gösteren ve doğrulayan ön deneyleri başarıyla gerçekleştirmişlerdir. Canon (1978) demir-alüminyum ve zirkonyum-hafniyum karışımlarının ayrılması için adımsal elüsyonun kullanımını göstermiştir. Bir sonraki büyük gelişme, annulus genişliğinin ve yatak çapının artırılması sonucunda sistemin nasıl etkilendiğini görebilmek amacıyla Begovich (1983) tarafından yapılan araştırmalarla sağlanmıştır. Ayrıca Begovich ve Sisson (1984) besleme hızı, besleme konsantrasyonu, yatağın dönüş hızı ve elüent hızı gibi parametrelerin döner annular yatağın ayırma performansı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Bakır-nikel ve nikel-kobalt karışımlarının çözünürlüğü farklı annular kromatografi ünitelerinde çalışılmıştır. Howard (1988) tarafından yapılan çalışmalarda seyreltik glikoz-fruktoz-sükroz karışımlarının ayrılmaları gösterilmiştir. Bu çalışmalar modelleme konusunda bilinen kromatografik teorilerle de tutarlı olan daha temel yaklaşımlar sağlamıştır.

De Carlil et al. (1990), aminoasitleri; Bloomingburg et al. (1991) protein yapılarını ve Reissner et al. (1997) bovine serum albumin (BSA) saflaştırmak için annular kromatografiyi tercih etmiştir.

Sürekli annular kromatografi, aynı zamanda uranyum izotoplarını birbirinden ayırmak için kullanılmıştır. Sabit faz olarak anyon değiştirici reçine içeren sistemde işlem sonunda uranyum 235, uranyum 238 ve safsızlık içeren fraksiyonlar elde edilmiştir (Synder et al., 1992) .

3. SÜREKLİ KROMATOĞRAFİK SİSTEMLERİN TEORİK ANALİZİ

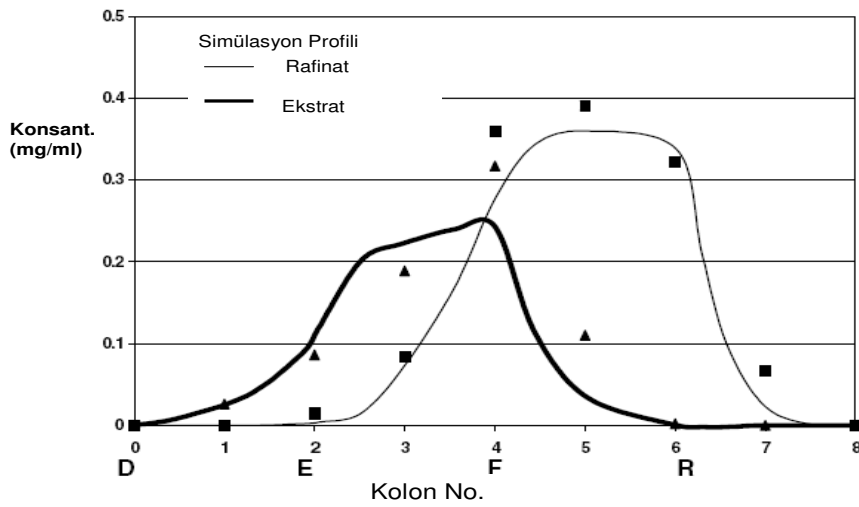
3.1. Hareketli Yatak Benzetimli Kromatograf Sistemi için Matematiksel İfadelerin Türetilmesi

Hareketli yatak benzetimli kromatografisi çalışma prensibine bağlı olarak birçok parametreye sahip bir sistem olması sebebiyle, sisteme ait uygun tasarım parametrelerinin, işletme koşullarının, kolon performansının ve ürün özelliklerinin en doğru şekilde belirlenmesi ancak sistemin modellenmesi ile mümkündür.

SMB işletimi sırasında yüksek prodüktivite ve saflık elde etmek için model simülasyonları yardımıyla optimizasyonu gereken parametrelerin başında değiştirme zamanı (t_s), besleme konsantrasyonu (c_F) ile sistem içi ve sistem dışı akış hızları gelmektedir (Pedefferri et al., 1999). Sistem içi akış hızları, dört zone akış hızıdır ve Q_1 , Q_2 , Q_3 ve Q_4 olarak ifade edilmektedir. Sistem dışı akış hızları ise SMB birimine giren ve birimden çıkan akış hızlarıdır. Sisteme dışı akış hızları, besleme akımı için Q_F , elüent akımı için Q_D , rafinat ve ekstrat akımları için ise sırasıyla Q_R ve Q_E terimleri ile belirtilmektedir.

SMB proses modellenmesinde "hareketli yatak kromatografisi (TMB) model yaklaşımı" ve "hareketli yatak benzetimli kromatografisi (SMB) model yaklaşımı" olmak üzere iki temel yaklaşım esas alınmaktadır. SMB model yaklaşımı ile TMB model yaklaşımı arasındaki en temel fark, SMB sistemine bağlı modellemede değiştirme zamanı parametresinin varlığıdır. SMB model yaklaşımında, ürün konsantrasyon profili her değiştirme zamanı periyodu boyunca bir önceki konsantrasyona bağlı olarak hesaplanmalıdır. TMB model yaklaşımına göre katı faz ile sıvı faz birbirlerine zıt yönde hareket ettiğinden, değiştirme zamanı parametresi TMB sistem modeli için geçerli değildir. Bu nedenle TMB model yaklaşımı esas alınarak sistemin çözümlenmesi, değiştirme zamanı parametresine bağlı SMB model yaklaşımı ile çözüme kıyasla çok daha kolay olmakta ve daha az nümerik hesaplama gerektirmektedir. Bu nedenle genellikle SMB model yaklaşımı yerine TMB model yaklaşımı tercih edilmekte ve TMB modellemesi ile SMB optimum çalışma parametreleri, ürün konsantrasyon profilleri simülasyon sonucu elde edilebilmektedir.

SMB sistemi periyodik, TMB sistemi ise yatışkın durumda çalışması sebebiyle benzer yatışkın durum performansına sahiptirler. Bununla beraber, SMB sisteminde kolon sayısı arttıkça, TMB prensibine yaklaşılmaktadır. Bu nedenlerle, SMB modellemesinin TMB model yaklaşımı ile yapılması çok büyük hatalar getirmemektedir. Şekil 3.1.'de, TMB yaklaşımı ile modellenmiş SMB sistemi için rafinat ve ekstrat konsantrasyon profillerinin simülasyon ve deneysel sonuçları görülmektedir. SMB sistemi deney ve TMB model yaklaşımı ile elde edilen simülasyon sonuçlarının birbirine çok yakın çıkması, TMB yaklaşımı esas alınarak SMB modellemesinin gerçeğe çok yakın sonuçlar vereceğini kanıtlamaktadır.



Şekil 3.1. SMB sisteminde, deneysel (nokta) ve simülasyon (düz çizgi) çalışmaları sonucu elde edilen ürün konsantrasyon profilleri (Yu ve Ching, 2003)

Özellikle 1990'lı yıllardan sonra literatürde yer alan SMB çalışmalarının çoğu sistem tasarımı ve optimizasyonu üzerinedir. Yerel denge kabulü (Storti et al., 1993; Mazzotti et al., 1997; Migliorini et al., 1998) ile yapılan SMB modellemesi "Üçgen Teorisi (Triangle Theory)" adı verilen formülasyonun geliştirilmesini sağlamıştır. Üçgen teorisi, lineer ve lineer olmayan izotermli sistemlerde tam ayrışmanın gerçekleştiği olası sistem parametrelerinin belirlenmesini mümkün kıldığından SMB tasarım alanında çok önemli bir metodoloji teşkil etmektedir. Buna rağmen üçgen teorisi yerel denge kabulüne dayandığından bütün kütle aktarım dirençleri ve aksenel dispersiyonun ihmal edilmiştir.

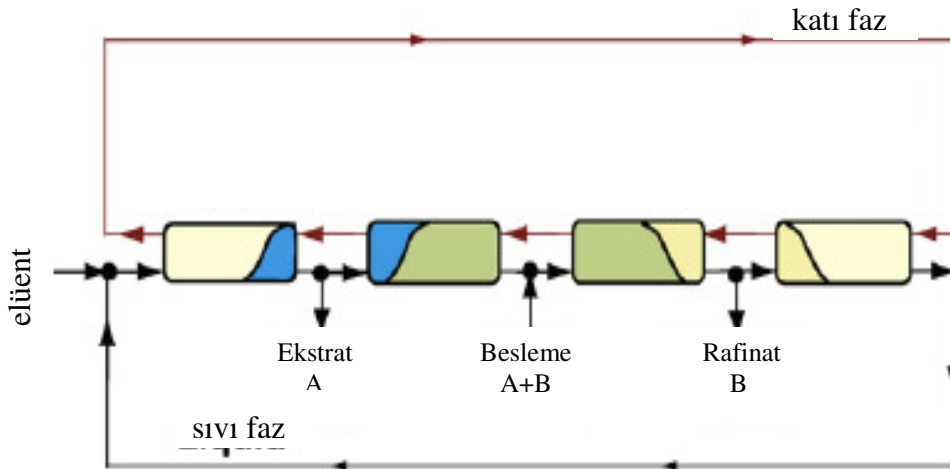
TMB ve SMB model yaklaşımında kabul edilen varsayımlara ise aşağıda yer verilmektedir (Minceva ve Rodrigues, 2005).

- Termal etkiler ihmal edilmiştir.
- Kolon boşluk kesri, partikül çapı ve porozitesi kolon boyunca sabittir.
- Her bir zone akış hızı sabittir.
- Kütle aktarım katsayıları, çözelti kompozisyonundan ve akış hızından bağımsızdır.
- Kolon boyunca basınç düşmesi ihmal edilmiştir.

3.1.1. TMB model yaklaşımı esas alınarak matematiksel ifadelerin türetilmesi

SMB modellemesine ilişkin literatür çalışmalarının çoğu, TMB model yaklaşımını ele alarak çözümlenmiştir (Pais et al., 1996; Haag et al., 2001; Rodrigues et al., 2005;). Bununla beraber, birçok çalışmada SMB prosesinin periyodik davranışının, eşdeğer TMB proses yaklaşımı dikkate alınarak tahmin edilebileceği gösterilmiştir (Storti et al., 1988; Pais et al., 1998). TMB model yaklaşımının, SMB model yaklaşımına tercih edilmesinin başlıca nedeni TMB modelin yatışkın durum performansına ve SMB prensibine kıyasla daha az değişkene sahip olmasıdır.

TMB sisteminin yatışkın durum simülasyonu için geliştirilen matematiksel modelde, sıvı faz için "eksenel dispersiyon akış" ve katı faz kütle aktarım hızı için "doğrusal sürücü kuvvet (LDF)" yaklaşımı ele alınmaktadır. Bununla beraber adsorpsiyon denge durumu uygun adsorpsiyon izoterm ifadesi esas alınarak türetilmektedir.



Şekil 3.2. Hareketli yatak kromatografi (TMB) prosesi

TMB prosesini tanımlamak için, şekil 3.2.'de görülen prosesi oluşturan her bir kolon, sıvı faz "interstitial" akış hızı, v_j ve katı fazın sıvı faz hareketinin tersi yöndeki akış hızı u_s ile ifade edilerek modellenmektedir. Sıvı faz içinde hareket bileşenlerin kütle denkliği Eş. (3.1) ile ifade edilmektedir. Eşitlikte, karışımı oluşturan ayrıştırılacak bileşenler i ($i=A, B$), her bir zone ise j ($j=1, 2, 3, 4$) alt indisi ile belirtilmektedir. Bunun yanında $c_{i,j}$ ve $q_{i,j}$ sırasıyla i bileşeninin j zone'daki sıvı faz içindeki konsantrasyonu ile katı faz içindeki ortalama konsantrasyonu, D_L aksenal dispersiyon katsayısı, ε kolon boşluk kesridir.

$$\frac{\partial c_{i,j}}{\partial t} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} + v_j \frac{\partial c_{i,j}}{\partial z} - \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} u_s \frac{\partial q_{i,j}}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 c_{i,j}}{\partial z^2} \quad (3.1)$$

Eş. (3.1)'de sol taraftaki ilk terimde i alt indisi ile belirtilen bileşenin sıvı fazdaki birikiminin zamanla değişimi, ikinci terimde katı fazda biriken i bileşeninin zamanla değişimi, üçüncü terimde bileşenin sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi, dördüncü terimde katı faz konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi, sağ taraftaki terimde ise kolon boyunca görülen aksenal dağılım ifade edilmektedir. Eşitlikte, j zonedaki "interstitial" akış hızı v_j , hacimsel akış hızı cinsinden, $v_j = Q_j / (A \cdot \varepsilon)$ olarak ve katı faz akış hızı u_s , kolon uzunluğu ile değiştirme zamanı cinsinden, $u_s = L/t_s$ olarak tanımlanmaktadır.

Katı fazda bulunan bileşenler için kütle denkliği Eş. (3.2)'de verilmektedir. Eşitlikte k_f film kütle aktarım katsayısı, $q_{i,j}^*$ sıvı faz ile dengede olan katı faz konsantrasyonudur.

$$\frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} = u_s \frac{\partial q_{i,j}}{\partial z} + k_f (q_{i,j}^* - q_{i,j}) \quad (3.2)$$

Eş. (3.2)'de sol taraftaki terimde katı fazda biriken bileşenin zamanla değişimi, sağ taraftaki ilk terimde katı faz konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi, ikinci terimde ise katı faz için adsorpsiyon sürücü kuvveti ile ifade edilmektedir.

Sıvı faz ile dengede olan katı faz konsantrasyonu, $q_{i,j}^*$ sisteme uygun adsorpsiyon izotermi ile ifade edilmektedir. Model her tür izoterm tipine uygun olması sebebi ile Eş.(3.3)'de genel izoterm ifadesine yer verilmektedir.

$$q_{i,j}^* = f_A(c_{A_j}, c_{B_j}) \quad (3.3)$$

Klasik SMB ve hipotetik TMB prosesinde elüent ve besleme giriş ile rafinat ve ekstrat toplama noktaları için denge eşitlikleri sistem içi (Q_1, Q_2, Q_3, Q_4) ve sistem dışı akış hızları (Q_D, Q_F, Q_R, Q_E) ile ilişkilendirilmektedir. Her bir zone akış hızını temsil eden Q_j ($j=1, \dots, 4$), Eş.(3.4)'de sırasıyla elüent, besleme, rafinat ve ekstrat akış hızları olan sistem içi akış hızları cinsinden türetilmiş ifadesi verilmektedir.

$$Q_1 = Q_4 + Q_D \quad (3.4a)$$

$$Q_2 = Q_1 - Q_E \quad (3.4b)$$

$$Q_3 = Q_2 + Q_F \quad (3.4c)$$

$$Q_4 = Q_3 - Q_R \quad (3.4d)$$

Eş.(3.4) ile verilen sistem içi ve sistem dışı akış hızları ilişkilerinden, her bir zone için A ve B bileşenlerinin konsantrasyon ifadelerini türetmek mümkündür (Yu ve Ching, 2003)

$$c_{i,1}^{in} Q_1 = c_{i,4}^{out} Q_4 + c_{i,D} Q_D \quad (3.5a)$$

$$c_{i,E} = c_{i,1}^{out} = c_{i,2}^{in} \quad (3.5b)$$

$$c_{i,3}^{in} Q_3 = c_{i,2}^{out} Q_2 + c_{i,F} Q_F \quad (3.5c)$$

$$c_{i,R} = c_{i,3}^{out} = c_{i,4}^{in} \quad (3.5d)$$

Eş.(3.5)'de verilen ifadelerden her dört zone için bileşenlerin giriş konsantrasyonları tekrar düzenlenirse Eş.(3.6) elde edilmektedir.

$$c_{i,1}^{in} = \frac{(Q_4 \cdot c_{i,4}^{out} + Q_D \cdot c_{i,D})}{Q_1} \quad (3.6a)$$

$$c_{i,2}^{in} = c_{i,1}^{out} \quad (3.6b)$$

$$c_{i,3}^{in} = \frac{(Q_2 \cdot c_{i,2}^{out} + Q_F \cdot c_{i,F})}{Q_3} \quad (3.6c)$$

$$c_{i,4}^{in} = c_{i,3}^{out} \quad (3.6d)$$

Eş.(3.6)'da bulunan "in" ve "out" üst indisleri sırasıyla sisteme giren ve sistemden çıkan akımları temsil etmektedir. Son olarak TMB modeli için sisteme ait sınır koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu sınır koşulları, kolon girişi ($z=0$), kolon sonu ($z=L$) ve başlangıç durumu ($t=0$) için, bileşen konsantrasyonları genel ifadelerinden türetilmektedir. TMB sistemine ait sınır koşulları Eş.(3.7)'de verilmektedir.

$$t = 0 \quad \text{için} \quad c_{i,j} = q_{i,j} = 0 \quad (3.7a)$$

$$z = 0 \quad \text{için} \quad c_{i,j}^{in} = c_{i,j} - \frac{D_L}{v_j} \frac{\partial c_{i,j}}{\partial z} \quad (3.7b)$$

$$z = L \quad \text{için} \quad \frac{dc_{i,j}}{dz} = 0 \quad \text{ve} \quad q_{i,j} = q_{i,j+1}^{in} \quad (3.7c)$$

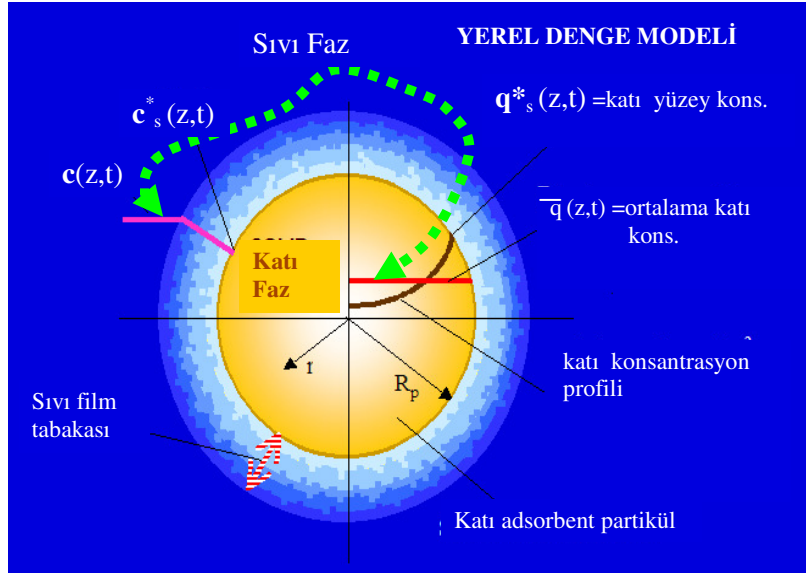
TMB matematiksel modeli, Eş.(3.1) ve (3.2)'de verilen bileşenlerin sıvı ve katı faz içindeki kütle denklikleri, Eş. (3.3) sisteme uygun adsorpsiyon izoterm denkliği, Eş.(3.6) ve (3.4) zone denklikleri, Eş.(3.7) başlangıç ve sınır koşulları ile birlikte çözülebilmektedir.

TMB modeli, katı faz hareketinin de model eşitliğine katıldığı, yatışkın durum performansına sahiptir. Bu nedenle, sistem analizi periyodik yatışkın durum performansına sahip SMB model yaklaşımına göre daha kolaydır. Bunun yanında, SMB sistemini oluşturan kolonlar, TMB modelde dört bölgeye bölünmüş tek bir kolon yaklaşımı esas alınmaktadır. SMB modelde ise her bir kolon birbirinden bağımsız olarak ayrı incelenmekte ve her değiştirme zamanı (periyot) sonunda sistemin sınır koşulları güncelleştirilmelidir.

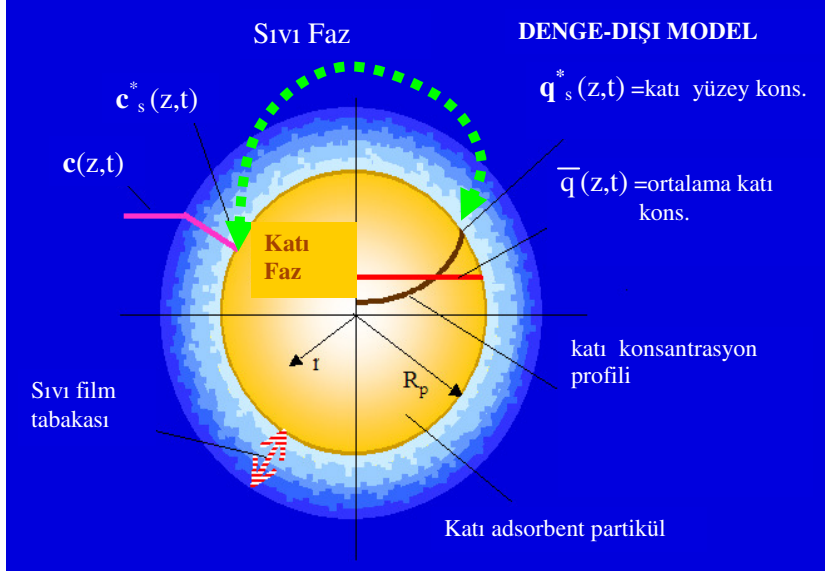
3.1.2. Denge-dışı adsorpsiyon kabulü ile SMB model yaklaşımının modifikasyonu

Hareketli yatak benzetimli kromatografi cihazının simülasyonunda alışıl gelmiş yerel denge (local equilibrium) kabulü kullanılmaktadır. Yerel denge kabulüne göre sabit fazın partikül (adsorbent) içerisindeki ortalama konsantrasyonu (\bar{q}) ile kolon içerisindeki yığın sıvı konsantrasyonu (c) dengededir. Bu varsayım partikül etrafındaki sıvı film ve partikül içerisindeki olası kütle aktarım dirençlerini yok sayarak dengenin bir anda gerçekleştiğini kabul etmektedir. Yerel denge kabulü yapılan modelleme çalışmalarında band genişlemesine neden olan aksel dispersiyon terimi ve kütle aktarım dirençleri tek bir terim altında birleştirilmekte ve bu terime görünür aksel dispersiyon terimi (apparent axial dispersion term) adı verilmektedir. Buna rağmen, aksel dispersiyon ve kütle aktarım mekanizmaları tek bir terim içerisinde toplanamayacak kadar ayrı olgulardır. İşletme parametrelerinde yapılan değişiklikler sonucu kütle aktarım dirençleri ve aksel dispersiyon aynı şekilde etkilenmeyecek ve yanlış sonuçlar doğuracaktır. Yapılan kolon dinamiği analizlerinde de sistemin aksel dispersiyondan çok kütle aktarım dirençlerine hassas olduğu ortaya çıkmış (Ruthven, 1984), Skoog et al. (2003) ve Özdural ve diğerleri (2004) tarafından kromatografik kolonlarda kütle aktarım etkilerinin ihmal edilemeyeceği kanıtlanmaktadır. Başka bir deyişle, kromatografik kolonlarda kütle aktarım dirençleri, aksel dispersiyon etkilerinden çok farklı kütle aktarım mekanizmalarına sahip olmaları sebebiyle yerel denge kabulü geçerli değildir. Buna rağmen birçok araştırmacı tarafından model eşitliklerini basitleştirmesi nedeniyle yerel denge varsayımı kabul edilmektedir (M. S. Smith, G. Guichon, 1998; Jörg Brozio, Thiele et. al., 2001).

Kütle aktarım dirençlerinin varlığını kabul eden varsayım ise denge dışı modeldir (Özdural ve diğerleri, 2004). Denge dışı (non-equilibrium) adsorpsiyon modelinde katının yüzey konsantrasyonu (q_s^*) ile sıvı film tabakasının iç yüzey konsantrasyonunun (c_s^*) birbiri ile dengede olduğu varsayımı geçerlidir (Şekil 3.3b). Denge dışı adsorpsiyon modelinde kolon içerisindeki kütle aktarımı, hem katı faz hem de sıvı faz için birbirinden ayrı tanımlanmaktadır. Böylelikle işletme sırasında birbirlerinden çok farklı tepkiler veren ve uyum içerisinde bulunmayan kütle aktarım dirençleri ve aksel dispersiyon terimi birbirlerinden ayrı ele alınmaktadır. Bu nedenle, denge dışı adsorpsiyon kabulü ile kolon içerisinde varolan dinamik durum, gerçeği yansıtmaktadır. Yerel denge ve denge dışı model kabulleri arasındaki farklar Şekil 3.3'de verilmektedir.



Şekil 3.3.a. Yerel denge adsorpsiyon modeli, c ile \bar{q} dengede olduğu durum



Şekil 3.3b. Denge dışı adsorpsiyon modeli, c_s^* ile q_s^* dengede olduğu durum

Yerel denge modeline göre ortalama katı konsantrasyonu (\bar{q}) ve yığın sıvı konsantrasyonu (c) dengede iken denge dışı modele göre katı faz yüzey konsantrasyonu (q_s^*) ve sıvı filmin iç yüzeyindeki sıvı konsantrasyonu (c_s^*) dengededir. Denge dışı modele göre hem katı fazın hem de partikül etrafında oluşan sıvı film tabakasının neden olduğu kütle aktarım dirençleri göz önüne alınmaktadır; bu nedenle denge dışı model, yerel denge modeline göre çok daha gerçekçi bir yaklaşımı temsil etmektedir.

Bu bölümde, Langmuir adsorpsiyon izotermine sahip sistemlerde, SMB denge dışı model tekniğinin geliştirilmesine ve SMB için matematiksel denklemlerin türetilmesine yer verilmektedir.

Literatürde yer alan SMB yaklaşımı ile sistem modellemesine ilişkin çalışmalar genellikle yerel denge modelini esas almaktadır. Böylelikle bütün kütle aktarım dirençlerinin görünür aksenal dispersiyon (D_a) terimi altında toplanması ile sistem modellemesi daha basite indirgenmekte ve buna bağlı olarak çözümü kolaylaşmaktadır.

Bu bölümde, SMB kromatografik kolonları için türetilen model eşitlikleri gerçekçi bir yaklaşım olan denge dışı adsorpsiyon prensibi esas alınarak çözümlenmiştir. Geliştirilen modelde, SMB kolon içerisindeki kütle aktarımı hem katı faz hem de sıvı faz için ayrı ayrı tanımlanmıştır.

Katı faz için D_s katı faz yüzey difüzyon katsayısı (cm^2/s), sıvı faz için ise k_f film kütle aktarım katsayıları, kütle aktarım dirençlerini ifade etmek için kullanılmıştır.

SMB model yaklaşımında i bileşenin, k kolonu boyunca aktarımı, Eş.(3.8) ile verilmektedir.

$$\frac{\partial c_{i,k}}{\partial t} + \frac{1 - \varepsilon}{\varepsilon} \frac{\partial \bar{q}_{i,k}}{\partial t} + v_k \frac{\partial c_{i,k}}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 c_{i,k}}{\partial z^2} \quad (3.8)$$

$$(i = A, B) \quad (k = 1, \dots, N - 1, N_T)$$

Eş. (3.8)'de türetilen ifadede i ile k alt indisleri sırasıyla bileşeni ve kolon sayısını temsil etmektedir. TMB model yaklaşımının esas alındığı modelleme tekniğinde matematiksel ifadeler dört zone için türetilirken, SMB model yaklaşımında, zone kavramı yerine kolon kavramı vardır ve her bir kromatografik kolon için kütle denkleği yapılmaktadır. Bu kütle denkleğinde sol taraftaki ilk terimde bileşenin sıvı fazdaki birikiminin zamanla değişimi, ikinci terimde katı fazda biriken bileşenin zamanla değişimi, üçüncü terimde bileşenin sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi, sağ taraftaki terimde ise kolon boyunca görülen aksel dağılım ifade edilmektedir. Eşitlikte k sayılı kolondaki interstitial akış hızı v_k , hacimsel akış hızı cinsinden, $v_k = Q_k / (A \cdot \varepsilon)$ olarak ifade edilmektedir.

Eş. (3.8)'de ifade edilen, $\frac{\partial \bar{q}}{\partial t}$ terimi, ortalama katı faz konsantrasyonunun zaman ile değişimini göstermektedir. Burada çözünen maddenin, hareketli fazdan katı faza aktarım hızı, yığın sıvı konsantrasyonu ile katı faz yüzeyindeki sıvı konsantrasyonu ile denge halinde bulunan sıvı faz konsantrasyonu arasındaki fark $(c(z, t) - c_s^*(z, t))$ ile doğru orantılı olup bu ilişki aşağıdaki eşitlikte gösterilmektedir. (Alkan, 2003)

$$\frac{\partial \bar{q}}{\partial t} = k_f \frac{3}{r_p} [c(z, t) - c^*_s(z, t)] \quad (3.9)$$

Bu ifadede, r_p partikül yarıçapı, k_f sıvı film kütle aktarım katsayısı, c hareketli faz yığın sıvı konsantrasyonu ve c^*_s partikül yüzeyindeki katı konsantrasyonu (q^*_s) ile dengede olan sıvı konsantrasyonudur. Eş (3.9), Eş (3.8)'de yerine konulursa,

$$\frac{\partial c_{i,k}}{\partial t} + F k_f [c(z, t) - c^*_s(z, t)] + v_k \frac{\partial c_{i,k}}{\partial z} = D_L \frac{\partial^2 c_{i,k}}{\partial z^2} \quad (3.10)$$

$$F = \frac{3}{r_p} \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \text{ ifadesi türetilmiş olur.}$$

Eş. (3.10) incelendiğinde, denklemin iki adet bağımlı (c , c^*_s) ve iki adet bağımsız değişken (z, t) içerdiği görülmektedir. Denklemin çözülebilmesi için bağımlı değişkenlerden c^*_s 'in, c cinsinden ifade edilmesi gerekmektedir.

Partikül yüzeyindeki katı konsantrasyonunun dengede bulunduğu sıvı konsantrasyonu (c^*_s) ile sıvı faz yığın konsantrasyonu (c) arasındaki ilişkiyi kurabilmek için partikül yüzeyindeki katı konsantrasyonu (q^*_s) ile katı faz ortalama konsantrasyonu (\bar{q}) arasındaki bağıntıdan yararlanılmaktadır. (Yao ve Tien, 1992). Bu bağıntı Eş.(3.11) ile verilmektedir.

$$q^*_s = \bar{q} + \frac{Bi}{5} (c - c^*_s) \quad (3.11)$$

Eşitlikteki, Bi ifadesi boyutsuz Biot sayısını göstermektedir. Biot sayısı, içerisinde sıvı faz ve katı faz için kütle aktarım direnç ifadelerini bulundurmakta ve aşağıdaki eşitlik ile gösterilmektedir.

$$Bi = \frac{k_f r_p}{D_s} \quad (3.12)$$

Biot sayısı ifadesinde, katı faz yüzey difüzyon katsayısı D_s terimi ve sıvı film kütle aktarım katsayısı ise k_f terimi ile gösterilmektedir.

Katı faz yüzey konsantrasyonunun (q_s^*) katı ve sıvı faz ara yüzeyindeki sıvı konsantrasyonu (c_s^*) ile dengede olduğu varsayımı oldukça gerçekçi bir yaklaşımı temsil etmektedir. Bu iki konsantrasyon birbiri ile tam olarak temas halindedir ve adsorpsiyon mekanizmasının bu basamağı çok hızlı gerçekleşmektedir. q_s^* ile c_s^* arasındaki denge durumu Langmuir adsorpsiyon izotermi ifadesi ile açıklanmaktadır. Langmuir izotermi genel formülasyonu Eş.(3.13)'de görülmektedir.

$$q_s^*(z,t) = \frac{q_m K c_s^*(z,t)}{1 + K c_s^*(z,t)} \quad (3.13)$$

Bu eşitlikte q_m ve K , Langmuir İzoterm sabitleridir. Eş. (3.11) ve Eş (3.13)'ün beraber çözülmesiyle ikinci dereceden aşağıdaki eşitlik elde edilmektedir.

$$(c_s^*)^2 + \left[\frac{5q_m}{Bi} - \frac{5\bar{q}}{Bi} + K - c \right] c_s^* - \left[c + \frac{5\bar{q}}{Bi} \right] K = 0 \quad (3.14)$$

Eş.(3.14)'de c_s^* için çözülmesi sonucunda elde edilen iki kökten sadece birisi fiziksel anlam ifade etmektedir ve bu kök aşağıda verilmektedir. (Özdural ve diğerleri, 2004).

$$c_s^* = \frac{-M + \sqrt{M^2 + 4 \left[c + \frac{5\bar{q}}{Bi} \right] K}}{2} \quad (3.15)$$

Eş.(3.15)'de yer alan M terimi eşitliği basitleştirmek adına türetilmiş ve açılımı Eş. (3.16) ile aşağıda verilmektedir.

$$M = \left[\frac{5q_m}{Bi} - \frac{5\bar{q}}{Bi} + K - c \right] \quad (3.16)$$

Eş. (3.15)'de yer alan c_s^* ifadesi yukarıda elde edilen Eş. (3.10)'da yerine koyulursa aşağıdaki denkleme ulaşılmaktadır.

$$\begin{aligned} & \frac{\partial c_{i,k}}{\partial t} + F k_f \left[c_{i,k} - \left(\frac{-M + \sqrt{M^2 + 4 \left[c_{i,k} + \frac{5\bar{q}}{Bi} \right] K}}{2} \right) \right] + v_k \frac{\partial c_{i,k}}{\partial z} \\ & = D_L \frac{\partial^2 c_{i,k}}{\partial z^2} \end{aligned} \quad (3.17)$$

Böylelikle Eş. (3.17) iki adet bağımsız değişkene (z, t) ve tek adet bağımlı değişkene ($c_{i,k}$) sahip eliptik diferansiyel eşitliğe dönüşmüştür. Ancak bu eşitliğin sayısal yöntemler yardımıyla çözülebilmesi için $\bar{q}_{i,k}$ teriminin ($k=k$) için $c_{i,k}$ türünden ve bir önceki kolon ($k=k-1$) için geçerli olan $\bar{q}_{i,k-1}$ türünden ifade edilmesi gerekmektedir.

Son olarak SMB modeli için sisteme ait sınır koşullarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu sınır koşulları, kolon girişi ($z=0$), kolon sonu ($z=L$) ve başlangıç durumu ($t=0$) için, bileşen konsantrasyonları genel ifadelerinden türetilmektedir. TMB sistemine ait sınır koşulları Eş.(3.18)'de verilmektedir.

$$t = 0 \quad \text{için} \quad c_{i,k} = q_{i,k} = 0 \quad (3.18a)$$

$$z = 0 \quad \text{için} \quad c_{i,j}^m = c_{i,j} - \frac{D_L}{v_j} \frac{\partial c_{i,j}}{\partial z} \quad (3.18b)$$

$$z = L \quad \text{için} \quad \frac{dc_{i,j}}{dz} = 0 \quad \text{ve} \quad q_{i,j} = q_{i,j+1}^m \quad (3.18c)$$

SMB sistemi N adet kolondan oluşmaktadır. Sistemde giriş ve çıkış noktalarının belirli zamanlarda değişimi sonucu, her bir kolonun konumuna (zone) bağlı olarak bir periyot içinde farklı fonksiyonları vardır. SMB modeli, sistemi oluşturan N adet kolon için kütle denklikleri serilerinden meydana gelmektedir. Bu N adet kütle denkliğinin birbirleri ile bağlantısı, SMB birimi bağlantı nodları için türetilen basit eşitlikler sayesinde gerçekleşmektedir. Sistemdeki giriş ve çıkış noktalarının her değiştirme zamanı sonunda senkronize olarak değişimine bağlı olarak, her bir kolondaki akış hızı ve besleme giriş konsantrasyonu değiştirme zamanı sonunda yenilenmelidir. Her kolondaki akış hızı, kolonun konumuna (bulunduğu zone'a) göre, sistem giriş ve çıkış noktaları için yapılan kütle denkliklerinden hesaplanabilmektedir. Sistemin giriş noktalarını oluşturan besleme ve elüent ile çıkış noktalarını oluşturan rafinat ve ekstrat akımlarında bileşen konsantrasyonları Eş. (3.19) ile verilmektedir (Minceva et al., 2003)

Elüent giriş noktası için:

$$c^{out}_{i,k} Q_4 = c^{in}_{i,k+1} Q_1 \quad (3.19a)$$

Ekstrat toplama noktası için:

$$c^{out}_{i,k} = c^{in}_{i,k} \quad (3.19b)$$

Besleme noktası için:

$$c^{out}_{i,k} Q_2 + c_{i,F} Q_F = c^{in}_{i,k+1} Q_3 \quad (3.19c)$$

Rafinat toplama noktası için:

$$c^{out}_{i,k} = c^{in}_{i,k} \quad (3.19d)$$

Matematiksel açıdan bakıldığında, SMB prosesinin bağımlı değişkenlerin eksene pozisyona (z) ve zamana (t) bağlı olarak değişen çok parametrelili bir sistemden oluştuğu görülmektedir. SMB matematiksel modeli, seri halinde bulunan kısmi diferansiyel denklemler (N adet kütle denkliği) ve cebirsel denklemlerden (adsorpsiyon denge izoterm ifadesi ve giriş-çıkış noktaları için kütle denklemlerinden) meydana gelmektedir. Bu nedenle modelin analitik çözümü mümkün değildir. SMB proses simülasyonu ancak modelin nümerik olarak analizi sonucu gerçekleştirilmektedir.

3.2. SMB Optimizasyon Tekniğinin Geliştirilmesi - Üçgen Teorisi

Hareketli yatak benzetimli kromatograf cihazının TMB veya SMB yaklaşımı ile modellenmesi, sistemin periyodik yataşkın durum doğası ve birden fazla kolon içermesinden kaynaklanan kompleks dinamik yapısı nedeniyle sadece SMB simülasyonunu ve optimizasyonunu mümkün kılmaktadır. Ancak, modelleme proses tasarımı için uygun bir kriter geliştirilmesi için yeterli değildir. Sistemde yüksek verimlilik ve ürün saflığı elde etmek için tasarım parametrelerinin yanında işletme parametrelerinin de en doğru biçimde belirlenmesi gerekmektedir. Bu işletme parametrelerinin başında sistem içi akış hızları (Q_1, Q_2, Q_3 ve Q_4) ve değiştirme zamanı (t_s) gelmektedir. Lineer ve lineer olmayan kolonlarda kabul edilen denge teorisi (equilibrium theory) yirmi yılı aşkın süredir çok kolonlu SMB kromatografisinde, proses tasarımı kullanılmaktadır ve sistem parametrelerini belirlemede başarılı sonuçlar getirdiği birçok literatür çalışması ile kanıtlanmıştır (Migliorini et al., 1998; Mazzotti, 2006).

SMB sisteminin yataşkın durum, denge kabulü ile çözümü ele alınırsa, model eşitliği basitleşmektedir. Bunun yanında, sonsuz sayıda teorik kademeli kolon varsayımı yapılırsa bu eşitlik herhangi bir adsorpsiyon izotermi için analitik olarak çözülebilir hale gelmektedir. SMB sistemi için denge kabulü ile türetilen kütle denkliği Eş.(3.20)'de verilmektedir.

$$\frac{\partial c_{i,j}}{\partial t} + \frac{(1 - \varepsilon)}{\varepsilon} \frac{\partial q_{i,j}}{\partial t} + v_j \frac{\partial c_{i,j}}{\partial z} = 0 \quad (3.20)$$

Eş. (3.20)'deki ifade, denge teorisi kabulü, SMB yaklaşımı ele alınarak türetilmektedir. Denge kabulü sebebiyle, sistemi oluşturan kromatografik kolon içerisindeki bütün kütle aktarım dirençleri ve eksenel dispersiyon katsayısı ihmal edilmekte ve kolonların sonsuz verimlilikte olduğu varsayımı yapılmaktadır. Sisteme ait başlangıç ve sınır koşullarının belirlendiği takdirde, bu denkleğin birinci dereceden kısmi diferansiyel eşitliklerin çözümü yönteminden (Helfferich et al., 1970; Rhee et al., 2001) her türlü izoterm tipi için analitik olarak elde edilmesi mümkündür.

Sıvı faz içindeki bileşenlerin, katı faza olan ilgilerini gösteren adsorpsiyon izoterm ifadeleri Henry sabiti ile gösterilmektedir. (Pedferri et al., 1999). Henry sabiti, çözeltinin adsorpsiyon izotermi belirlenmek için yapılacak kesikli kap deneylerinden veya aşağıda verilen eşitlikten bulunabilmektedir.

$$H_i = \frac{(t_i^R - t_0)}{t_0} \frac{\varepsilon}{(1 - \varepsilon)} \quad (i = A, B) \quad (3.21)$$

Eş. (3.21)'de t_i^R A ve B bileşenlerinin kolon içindeki alıkonma zamanları, kolon porozitesi, ε ise $\varepsilon = t_0 Q/V$ olarak ifade edilmektedir. Eşitlikte, Q sıvı akış hızı, V kolon hacmidir. SMB sistemini oluşturan her bir kolon için yapılacak kolon boşluk kesri deneylerinden farklı t_0 ve dolayısıyla farklı ε değerleri elde edileceğinden, her kolon için farklı bir H_i değeri bulunmaktadır. Bu değerlerin ortalaması alınarak SMB birimi için sabit bir H_i değerinin belirlenmesi mümkündür.

3.2.1. Lineer adsorpsiyon izoterm durumu için üçgen teorisinin geliştirilmesi

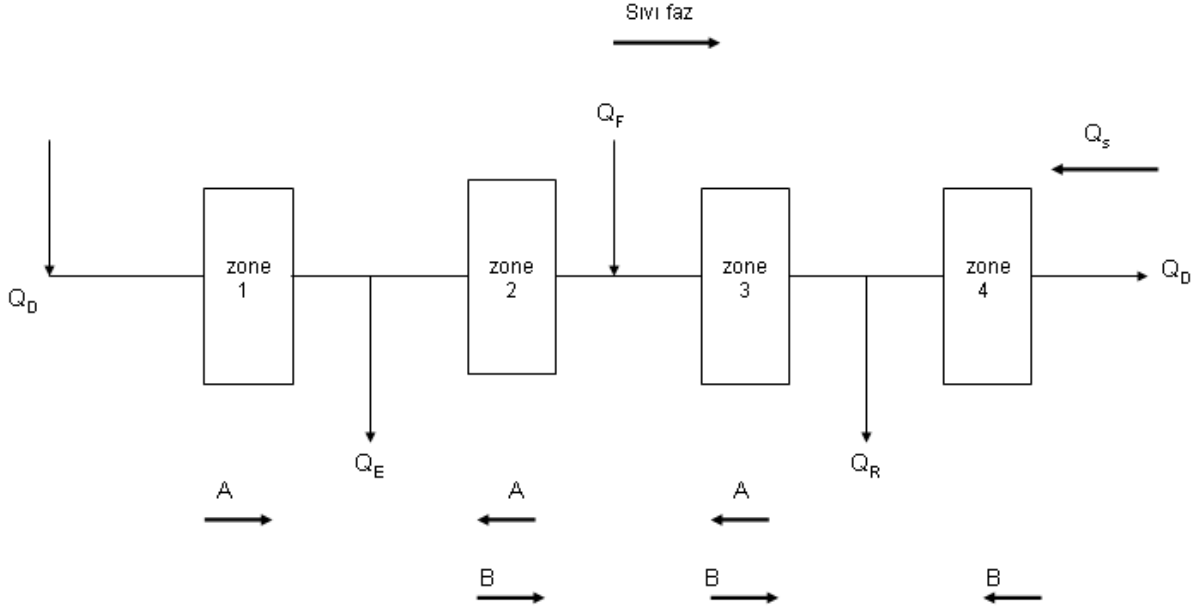
Lineer adsorpsiyon izotermi,

$$q_i = H_i c_i \quad i = A, B \quad (3.22)$$

eşitliği ile ifade edilmektedir. Henry sabiti, bileşenin katı faza olan ilgisinin bir derecesi olması sebebiyle katı faza ilgisi yüksek olan ekstrat bileşenin Henry sabiti, katı faza ilgisi az olan rafinat bileşenin Henry sabiti değerinden büyüktür ($H_A < H_B$). Eş. (3.20),

Eş.(3.22) ve sisteme ait uygun sınır koşullarıyla beraber iki bileşen için de çözülebilmektedir.

Lineer izoterm durumunda, SMB prosesinde tam ayrışma kriteri, SMB birimini oluşturan ve farklı görevleri olan dört zone'un sistem içinde oynadığı rollerden türetilenmektedir. Zone 2 ve zone 3 bileşenlerin birbirinden ayrıştığı en önemli bölgelerdir. Zone 3'de, değiştirme zamanı rafinat (B) bileşeninin alıkonma zamanından büyük, ekstrat bileşeninin (A) alıkonma zamanından küçük olmalıdır. Böylelikle, B bileşeni rafinat toplama noktasına ulaşabilmekte ve bu sırada A bileşeni tarafından kirletilmesi engellenmektedir. Aynı mantıkla, zone 2'de, değiştirme zamanı rafinat (B) bileşeninin alıkonma zamanından büyük, ekstrat bileşeninin (A) alıkonma zamanından küçük olmalıdır. Böylelikle, B bileşeni kolondan tamamen atılmış olmakta ve bir sonraki değiştirme zamanında ekstrat toplama noktasına ulaşması engellenirken, A bileşeni ekstrat toplama noktasında bulunmaktadır. Zone 1'in görevi A bileşeninin tamamen kolondan toplanmasını sağlamaktır. Başka bir deyişle, zone 1'de A bileşeninin elüsyonu ile katı faz rejenerasyonu gerçekleşmektedir. Bu prensibe bağlı olarak, zone 1'de değiştirme zamanı, A bileşeninin alıkonma zamanından büyük olmalıdır. Son olarak, zone 4'de B bileşeninin uzaklaştırılmasıyla sıvı faz rejenerasyonu gerçekleşmektedir. Bunun için değiştirme zamanı B bileşeninin alıkonma zamanından küçük olmalıdır. A ve B bileşenlerinin tam ayrışmasını sağlayacak bu faktörlere sistem çalışma parametrelerinin belirlenmesi açısından göz önüne alınmaktadır. Yukarıda anlatılan koşullar Şekil 3.4. ve Eş. (3.23) ile gösterilmektedir.



Şekil 3.4. Ekstrat (A) ve rafinat (B) bileşenlerinin bir periyot içindeki zone akış yönleri

Katı faza ilgisi yüksek olan A bileşenini ekstrat akımında, ilgisi düşük olan B bileşenini rafinat akımında toplayabilmek için, hipotetik TMB prensibi ele alındığı takdirde, A bileşeni zone 1' de sıvı faz yönünde, zone 2 ve zone 3'de katı faz yönünde ilerleyerek ekstrat akımında; B bileşeni ise zone 4'de katı faz, zone 2 ve zone 3'de sıvı faz yönünde ilerleyerek rafinat akımında toplanmalıdır. Bu nedenle, dört zone akış hızı belli bu mantık çerçevesinde belirlenmelidir.

$$t_{A,1}^R \leq t_s \quad (3.23a)$$

$$t_{B,2}^R \leq t_s \leq t_{A,2}^R \quad (3.23b)$$

$$t_{B,3}^R \leq t_s \leq t_{A,3}^R \quad (3.23c)$$

$$t_s \leq t_{B,4}^R \quad (3.23d)$$

Eş. (3.20)'nin çözümü ile, i bileşeninin SMB kolonunda alıkonma zaman ($t_{i,j}^R$) ifadesi türetilmektedir.

$$t_{i,j}^R = \frac{V \varepsilon}{Q_{SMB_j}} \left(1 + \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} H_i \right) \quad (3.24)$$

Eş. (3.24)'ün, Eş.(3.23)'de verilen eşitsizliklerde yerine konulması ile aşağıda verilen tam ayrışmayı gerçekleştirecek sınır koşulları belirlenmektedir.

$$H_A \leq m_1 \quad (3.25a)$$

$$H_B < m_2 \leq H_A \quad (3.25b)$$

$$H_B \leq m_3 \leq H_A \quad (3.25c)$$

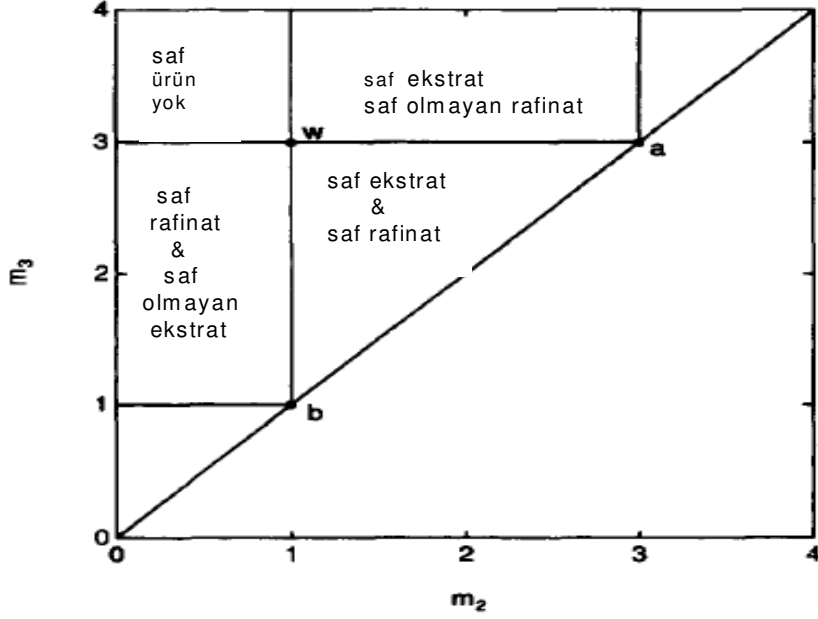
$$m_4 \leq H_B \quad (3.25d)$$

Yukarıdaki eşitsizliklerde yer alan birimsiz m_j terimi, sıvı faz akış hızının katı faz akış hızına oranı olup Eş.(3.26)'da ifade edilmektedir.

$$m_j = \frac{Q^{SMB}_j t_s - V \varepsilon}{V (1 - \varepsilon)} = \text{sıvı faz akış hızı/ katı faz akış hızı} \quad (3.26)$$

SMB periyodik yatışkın durum konsantrasyon profili besleme kompozisyonuna ve m_j ($j = 1,2,3,4$) ile ifade edilen dört zone akış hızı oranlarına bağlıdır. Besleme konsantrasyonu belirlendiği takdirde, SMB için tasarım problemi sadece bu dört zone akış hızının ve değiştirme zamanı parametresinin belirlenmesine indirgenmektedir.

Eş. (3.25a) - (3.25d) ile ifade edilen dört zone için birimsiz akış hızı oranlarına ve bileşenlerin Henry sabitine bağlı eşitsizlikler, kordinatları m_j ($j=1,\dots,4$) olan dört boyutlu bir alanı tanımlamaktadır. Bu alan içerisinde, bileşenlerin birbirinden tamamıyla ayrıştığı bölgede bulunmaktadır. Bu bölgenin projeksiyonu (m_2, m_3) veya (m_1, m_4) düzlemlerinde gösterilebilmektedir. SMB prosesinde bileşenlerin birbirinden ayrıştığı bölgeler zone 2 ve zone 3 olması sebebiyle genellikle sistem işletme parametrelerini belirlemek için (m_2, m_3) düzlemi, (m_1, m_4) düzlemi yerine tercih edilmektedir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Lineer adsorpsiyon izotermine sahip sistemler için, (m_2, m_3) düzleminde dört farklı ayrışma bölgesi (Mazzotti et al., 1997) $H_A = 3$; $H_B = 1$

Düzlemde, Eş. (3.25b) ve (3.25c) ile verilen koşullar görülmektedir. Düzlemi oluşturan bölgelerde de görüldüğü üzere bu iki koşul sağlanmadığı takdirde rafinat veya ekstrat çıkış akımlarında safsızlıklara rastlanmaktadır. Burada önemli bir diğer nokta ise, sistem içi akış hızları pozitifdir. Başka bir deyişle, $Q_3 > Q_2$ akış hızı oranı cinsinden ise $m_3 > m_2$ koşulu da beraberinde sağlanmalıdır.

Bu sonuçlara göre, denge kabulü çerçevesinde akış hızı oranları, m_1 ve m_4 Eş. (3.25a) - (3.25d) koşullarını sağladığında, (m_2, m_3) diagramındaki dört bölgeden SMB prosesi için ayrıştırma performansı tahmin edilebilmektedir. (m_2-m_3) düzleminde, SMB prosesinde bileşenlerin tam ayrışmasını sağlayan zone akış hızlarının ve dolayısıyla çalışma parametreleri olan besleme, elüent, ekstrat ve rafinat akış hızlarının belirlenmesini mümkün kılan karakterisitk bölge üçgen şeklinde olması sebebiyle bu yönteme “üçgen teorisi (triangle theory)” adı verilmektedir.

Lineer izotermler için üçgen teorisi ilk olarak Ruthven ve Ching (1989) tarafından bulunmuştur. Lineer olmayan, langmuir, anti-langmuir, bi-langmuir gibi daha

kompleks izotermli sistemler için bu teörinin uygulanması ise Storti et al., (1993) ve Mazzotti et al., (1994) tarafından geliştirilmiştir.

3.2.2. Langmuir adsorpsiyon izoterm durumu için üçgen teörisinin geliştirilmesi

Langmuir Adsorpsiyon İzotermi Durumu

Farklı ayrışma bölgelerinin şekillerini ve pozisyonlarını oluşturan sınırlar sadece adsorpsiyon parametrelerine değil, besleme konsantrasyonlarına da bağlıdır. Genel ifadesi $q_i = H_i c_i$ olan lineer adsorpsiyon izotermi genellikle çok seyreltik çözeltiler için geçerli olması sebebiyle tam ayrışma bölgesi, sadece adsorpsiyon parametresine (H_i) bağlı olup üçgen şeklinde sınırlara sahip olan karakteristik bir bölgeden oluşmaktadır. Besleme konsantrasyonunun artırılması, ayrışmadaki lineerliği de bozacağından tam ayrışmayı veren üçgen bölgesinin sınırlarını keskinleştirmekte ve üçgen köşegenini yerinden kaydırmaktadır. Langmuir izotermi durumu buna bir örnek teşkil etmektedir. Adsorpsiyon denge durumu, iki bileşenin birbiri ile yarış halinde bulunduğu iki bileşenli sistemlerde Langmuir izotermi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilebilmektedir.

$$q_i = \frac{H_i c_i}{1 + K_A c_A + K_B c_B} \quad (i = A, B) \quad (3.27)$$

Bu eşitlikte, q_i katı faza adsorbe olan i bileşenini katı faz konsantrasyonu, c_i sıvı faz konsantrasyonu, H_i ve K_i sırasıyla i bileşeninin Henry sabiti ve denge sabitidir.

Denge kabulüne dayanan analiz kriteri sonucu, Eş. (3.28) ile verilen ve her tür izoterm tipine uygun, bileşenlerin birbirinden tam ayrışmasını sağlayacak genel koşullar gösterilmektedir (Mazzotti, 2006).

$$m_{1,\min} \leq m_1 \quad (3.28a)$$

$$m_{2,\min} < m_2 \leq m_{2,\max} \quad (3.28b)$$

$$m_{3,\min} \leq m_3 \leq m_{3,\max} \quad (3.28c)$$

$$m_4 \leq m_{4,\max} \quad (3.28d)$$

Yukarıdaki bu dört koşul, Eş. (3.20)'de verilen SMB sisteminin, Langmuir izoterminde sahip sistemler için denge kabulü prensibi ile türetilen matematiksel ifadesinden bulunabilmektedir. Bu kısmi diferansiyel denklemin çözümü ile Eş. (3.28) düzenlenirse;

$$m_{1,\min} = H_A \quad (3.29a)$$

$$m_{2,\text{cr}}(m_2, m_3) < m_2 < m_3 < m_{3,\text{cr}}(m_2, m_3) \quad (3.29b)$$

$$m_{4,\max} = \frac{1}{2} \left\{ m_3 + H_B + K_B c_B^F (m_3 - m_2) - \sqrt{[m_3 + H_B + K_B c_B^F (m_3 - m_2)]^2 - 4m_3 H_B} \right\} \quad (3.29c)$$

Burada F üst indisi, besleme çözeltisini simgelemektedir. Langmuir izoterminde sahip sistemlerde tam ayrışma için belirtilen koşullar yalnız m_1 ve m_4 , akış hızı oranlarını içermektedir. Bunlardan m_1 diğer akış hızı oranlarından bağımsızken, m_4 , m_2 ile m_3 akış hızı oranlarının ve besleme konsantrasyonunun bir fonksiyonudur. Eş. (3.29b) ile ifade edilen m_2 ve m_3 ise diğer akış hızlarından bağımsız bir koşuldur.

(m_2, m_3) düzleminde a, b, f, r ve w noktalarının koordinatları aşağıda verilmektedir (Migliorini et al., 1998)

$$\text{a noktası: } (H_A, H_A) \quad (3.30a)$$

$$\text{b noktası: } (H_B, H_B) \quad (3.30b)$$

$$\text{f noktası: } (\omega_2, \omega_2) \quad (3.30c)$$

$$\text{r noktası: } \left(\frac{\omega_2^2}{H_A}, \frac{\omega_2 [\omega_1 (H_A - \omega_2) (H_A - H_B) + H_B \omega_2 (H_A - \omega_1)]}{H_A H_B (H_A - \omega_1)} \right) \quad (3.30d)$$

$$\text{w noktası: } \left(\frac{H_B \omega_2}{H_A}, \frac{\omega_2 [\omega_1 (H_A - H_B) + H_B (H_B - \omega_1)]}{H_B (H_A - \omega_1)} \right) \quad (3.30e)$$

Yukarıdaki eşitliklerde yer alan ω_1 ve ω_2 ifadeleri besleme konsantrasyonuna bağlı olup, denge teorisi parametreleridir. ω_1 parametresi aşağıda verilen ikinci dereceden denklemin köklerinden bulunabilmektedir.

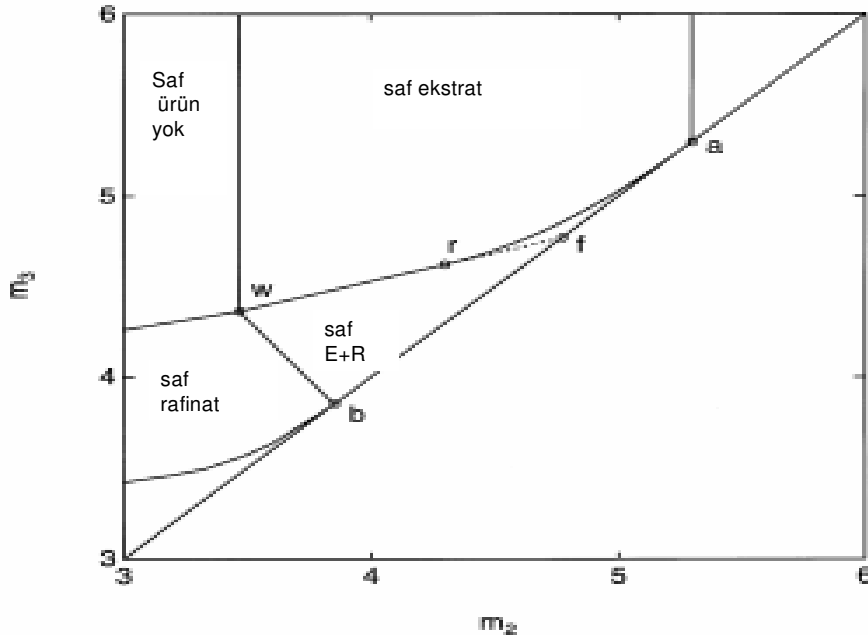
$$\omega_2 > \omega_1 > 0$$

$$(1 + K_A c^F_A + K_B c^F_B) \omega^2 - [H_A (1 + K_B c^F_B) + H_B (1 + K_A c^F_A)] \omega + H_A H_B = 0 \quad (3.31)$$

Eş.(31)'deki ifade incelendiği takdirde, ω_1 parametresi aşağıdaki eşitsizliği sağladığı görülmektedir (Ching ve Yu, 2003).

$$0 < \omega_1 \leq H_B \leq \omega_2 \leq H_A \quad (3.32)$$

Yukarıda ifade edilen bu sınır şartları birleştirildiğinde, (m_2, m_3) düzleminde üçgen şeklinde bir tam ayrışma bölgesi oluşturmaktadır (Şekil 3.6.)



Şekil 3.6. Langmuir adsorpsiyon izotermine sahip sistemler için, (m_2, m_3) düzleminde dört farklı ayrışma bölgesi (Mazzotti et al., 1997)

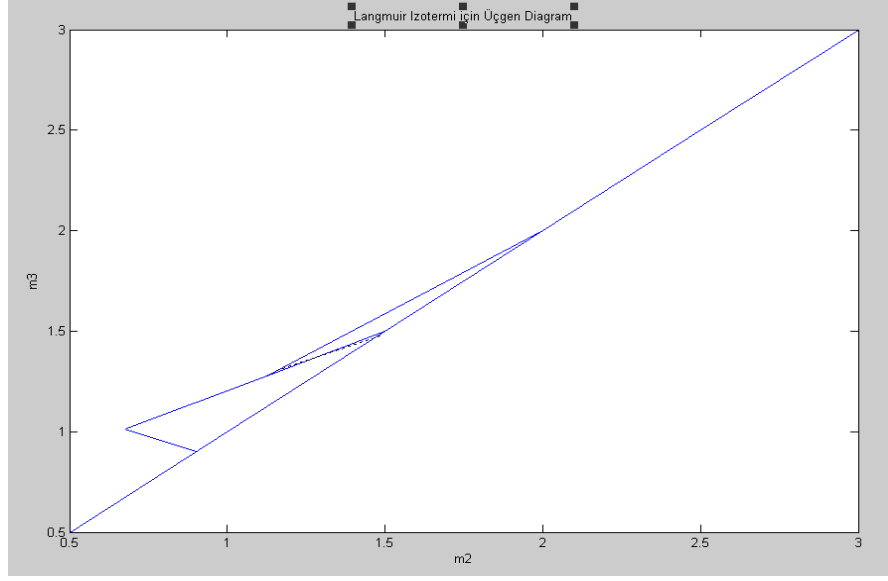
$$H_A = 5.30, H_B = 3.85, K_A = 0.0321 \text{ ml/mg}, K_B = 0.0175 \text{ ml/mg}, c^F_A = c^F_B = 5 \text{ mg/ml}$$

Tam ayrışma bölgesi, farklı çalışma sonuçlarının görüldüğü dört bölge ile sınırlanmıştır. Bunlar; saf rafinat ve rafinat tarafından kirletilmiş ekstrat, saf ekstrat ve ekstratın bir kısmı ile kirletilmiş rafinat, son olarak rafinat ve ekstratın birbiriyle karışmış halde saf ürünün elde edilemediği bölgelerdir. Şekil 3.6'da görülen (m_2 , m_3) düzlemindeki tam ayrışma bölgesi ancak m_1 ve m_4 net akış hızlarındaki koşullar, Eş. (3.29a) ve (3.29c) sağlandığında elde edilebilmektedir.

Üçgen düzleminde, tam ayrışma bölgesinin köşe noktası w , elüent gereksiniminin minimum ve katı faz başına düşen üretimin maksimum olduğu optimum çalışma koşullarını göstermektedir. w noktası dört farklı bölgenin birleşme noktası olduğundan, çalışma parametrelerinde (dört zone akış hızları, besleme konsantrasyonu) görülebilecek küçük bir distürens, ideal durumdan sapmalar (kütle transfer dirençleri, aksel dispersiyon) veya modelleme sırasındaki hatalar (adsorpsiyon izoterm parametrelerinin belirlenmesi) karşısında nokta tam ayrışma bölgesinin dışına doğru kaymaktadır. Bu problemi yenmek için optimum çalışma koşulları, w noktasına yakın fakat tam ayrışma bölgesinin içinde seçilmelidir.

3.2.3. MATLAB uygulama programı ile (m_2 , m_3) üçgen düzleminin elde edilmesi

Şekil 3.7' de görülen Langmuir izotermine sahip sistemlerde (m_2 , m_3) diagramı Ek1. de verilen MATLAB programı ile elde edilebilmektedir. Programda kullanıcı tarafından, ekstrat ve rafinat Henry sabiti ile ω_1 ve ω_2 denge teorisine bağlı parametreler belirlendiği takdirde MATLAB programı sonuç olarak o sistem için üçgen diagramını vermektedir.

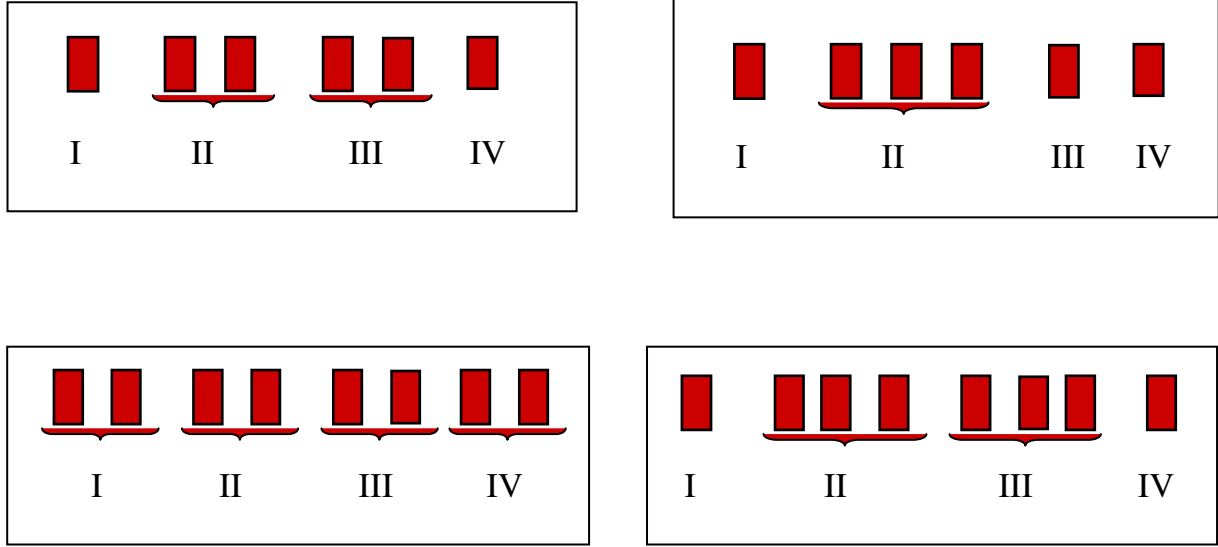


Şekil 3.7. Langmuir izotermine sahip SMB sistemi için üçgen düzlemi
 $H_1=0.9, w_1=0.5, H_2=2, w_2=1.5$

3.3. SMB İşletme Parametrelerinin Belirlenmesi

SMB, diğer kromatografik yöntemler ile kıyaslandığı takdirde çok daha fazla işletme parametresine sahip bir sistem olduğu göze çarpar. Kolon sayısı ve kolon hacmi (V), belirlenmiş bir SMB sistemi için bu parametreler switching time (t_s), besleme konsantrasyonu, sistem içi ($Q_j, j=1,2,3,4$) ve sistem dışı (Q_D, Q_F, Q_R, Q_E) akış hızları ve kolon konfigürasyonu seçimine indirgenir.

SMB kolon konfigürasyon seçimi, zone başına düşen kolon sayısını belirlemesi sebebiyle önem teşkil etmektedir. Her 4 zone için, en az 1 kolon gerekli olması nedeniyle SMB birimini en az 4 kolondan oluşmaktadır. Bunun yanında literatür çalışmalarında çoğunlukla 6 veya 8 kromatografik kolondan oluşan sistemler tercih edilmiştir (Gottschlich ve Kasche, 1997; Strube et al., 1997; Klatt et al., 2002; Schramm et al., 2003). Şekil 3.8’de 6 ve 8 kromatografik kolondan oluşan SMB sisteminde kolon konfigürasyon örnekleri verilmiştir. Sistemde 2. ve 3. zonalarda bileşenlerin ayrılması gerçekleştiği için, bu bölgelerde kolon sayısını arttırmak, ayırma etkinliği açısından yararlıdır.



Şekil 3.8. Altı ve sekiz kolondan oluşan SMB sisteminde kolon konfigürasyon seçenekleri

Belirli bir besleme kompozisyonu ile çalıştığımızı düşünürsek, m_1 ve m_4 akış hızları ile üçgen düzleminden m_2 ve m_3 akış hızları sadece adsorpsiyon isotherm parametrelerine ve besleme konsantrasyonuna bağlı olduklarından bu dört zone akış hızına ulaşılabilmektedir. Üçgen düzleminde, tam ayrışmayı sağlayan üçgen şeklindeki bölgeden m_2 ve m_3 akış hızları belirlendiği takdirde, Eş. (3.29a) ve (3.29c)'den H_i , K_i , c_i^F ve m_2 , m_3 değerlerinin bir fonksiyonu olan m_1 ve m_4 akış hızları bulunabilmektedir.

Proses hacmi, V genelde önceden belirlenmiş bir parametre olduğundan, bilinmeyen tek parametre değiştirme zamanı, t_s kalmaktadır. SMB prosesinde, seçilen en yüksek akış hızı, zone 1 (Q_1) akış hızıdır. Kromatografik sistemlerde, optimum ayrışma kolon boyunca basınç düşmesine ve pompanın gücüne bağlı olarak seçilebilecek maksimum zone 1 akış hızında görülmektedir (Kaspereit et al., 2002). Bu nedenle, Q_1 yani elüent akış hızı belirlendiği takdirde, Eş. (3.26)'da verilen akış hızı oranı m_j ifadesinden yola çıkılarak SMB sisteminin en önemli parametrelerinden biri olan değiştirme zamanı, Eş.(3.33)'den, Q_1 ve m_1 değerlerinden tahmin edilebilmektedir.

$$t_s = \frac{V [m_1 (1 - \varepsilon^*) + \varepsilon^*]}{Q_1} \quad (3.33)$$

Aynı zamanda, (ω_1, ω_2) çiftinin bilinmesi veya Henry sabitlerine göre $0 < \omega_1 \leq H_B \leq \omega_2 \leq H_A$ koşulunu sağlayacak şekilde tahmin edilmesi halinde, besleme kompozisyonu aşağıdaki eşitlikler ile belirlenebilmektedir.

$$c^F_A = \frac{H_B(\omega_1 - H_A)(\omega_2 - H_A)}{\omega_1 \omega_2 (H_A - H_B)} \quad (3.34a)$$

$$c^F_B = \frac{-H_A(\omega_1 - H_B)(\omega_2 - H_B)}{\omega_1 \omega_2 (H_A - H_B)} \quad (3.34b)$$

3.4. SMB Performans Parametrelerinin Belirlenmesi

SMB performansı, dört process performans parametresi ile karakterize edilmektedir. Bunlar: saflık (purity), üretim (productivity), kazanım (enrichment) ve elüent gereksinimidir (solvent requirement). Bu performans parametreleri iki amacı yerine getirmektedir. Bunlardan ilki, SMB sisteminin ayırma performansını ve fizibilitesini değerlendirmek; ikincisi ise farklı SMB proses alternatiflerini karşılaştırmaktır. Bu bölümde SMB sisteminde ekstrat ve rafinat akımları için performans parametreleri formülasyonları ile kısaca açıklanmaktadır.

Saflık (%) : Üçgen diagramında çalışma bölgesi, ekstrat ve rafinat saflığının 100% olarak belirlendiği kısımdır. Bu saflık derecesi;

$$P_E = \frac{100 c^E_A}{c^E_A + c^E_B} \quad (3.35a)$$

$$P_R = \frac{100 c^R_B}{c^R_A + c^R_B} \quad (3.35b)$$

olarak ifade edilmektedir.

Üretim (g/h/l of solid) : Optimum çalışma durumunda, maksimum besleme miktarının birim katı faz başına saflaşması istenmektedir. Ekonomik açıdan sistem incelendiği takdirde, üretim kapasitesi en önemli sistem kriterini oluşturmaktadır. SMB sisteminde birim katı faz başına üretim;

$$PR_E = \frac{c^E_A Q_E}{V_s} \quad (3.36a)$$

$$PR_E = \frac{c^R_B Q_R}{V_s} \quad (3.36b)$$

olarak ifade edilmektedir.

Kazanım (%): SMB sistemi işletilmesi sırasında ürünlerin yüksek safiyette ürün yanında kazanımın da yüksek olması istenmektedir. Kazanım derecesi, istenilen ürünün çıkış konsantrasyonunun, besleme konsantrasyonuna oranıdır.

$$E_A = \frac{100 c^E_A}{c^F_A} \quad (3.37a)$$

$$E_B = \frac{100 c^R_B}{c^F_B} \quad (3.37c)$$

Elüent gereksinimi: SMB saflaştırma işlemi sırasında harcanan elüent miktarı da önemli bir kriter oluşturmaktadır; çünkü bu miktar, işlem sonunca elde edilen ürünleri konsantre etmek için yapılacak ikinci işlemin maliyetini göstermektedir. Elüent gereksinimi, birim besleme kütlesini bileşenlerine ayıştıracak elüent kütlesi olarak ifade edilmektedir.

$$DR = \frac{(Q_D + Q_F) \rho_D}{Q_F c^F_T} \quad (3.38)$$

Eş. (3.38)'de Q_D elüent akış hızı, Q_F besleme akış hızı, ρ_D elüent özkütlesi ve c^F_T toplam besleme konsantrasyonudur.

3.5. Sürekli Annular Kromatograf Sistemi için Denge-dışı Modelin Modifikasyonu

Sürekli annular kromatografi sistemine ait teorik çalışmaların ve simülasyonların asıl amacı sisteme ait uygun tasarım parametrelerinin, ekipman için gerekli en uygun işletme koşullarının, kolon performansının ve ürün özelliklerinin en doğru şekilde tahmin edilmesi ve sistemin bu sonuçlara göre tasarlanarak hayata geçirilmesidir.

Bu bölümde sürekli annular kolonda gerçekleşen tek bileşenli adsorpsiyon için matematiksel model denklemleri türetilmiştir. Literatürde annular kromatografi ile ilgili temel denklem aşağıdaki şekilde verilmiştir (Thiele et al., 2001; Hilbrig ve Freitag, 2003).

$$\omega \frac{\partial c(x, \theta)}{\partial \theta} + v \frac{\partial c(x, \theta)}{\partial x} + F \omega \frac{\partial \bar{q}(x, \theta)}{\partial \theta} = D_x \frac{\partial^2 c(x, \theta)}{\partial x^2} + D_\theta \frac{\partial^2 c(x, \theta)}{\partial \theta^2} \quad (3.39)$$

Denklem (3.39) da aksenal dispersiyon katsayısı D_x , ve açısal dispersiyon katsayısı, D_θ iki farklı parametre olarak kullanılmıştır. Tez kapsamında imalatı yapılacak annular kromatografın tasarımı sırasında iki parametrenin tahminini gerektirir. Her ne kadar açısal ve aksenal dispersiyon arasında farklılık bulunmakla beraber birbirleri ile ilintili olarak ifade edilebilecekleri, örneğin yalnızca aksenal dispersiyon katsayısını kullanıp açısal dispersiyon katsayısının da bunun bir fonksiyonu olarak ifade edilebileceği tarafımızca düşünülmüştür. Aşağıda annular kromatografi temel denklemi bu yaklaşımla tarafımızca yeniden türetilmiştir.

Şekil 3.9'daki annular kromatografi kolonu için denklemlerin türetilmesi sırasında birinci durumda döner kolona dışarıdan bakan gözlemcinin, kolon ile aynı açısal hızda döndüğü varsayılmıştır. Gözlemci için iki farklı durum söz konusudur. Birinci durumda döner kolona dışarıdan bakan gözlemcinin, kolon ile aynı açısal hızda döndüğü ve bu sebeple sistemi değişkin durumda çalışıyormuş gibi gördüğü şartlar geçerlidir. İkinci durumda ise kolona dışarıdan bakan gözlemci sabit bir konumda bulunmakta ve her zaman için kolonun sabit bir kesitini görmektedir. Bu durumda gözlemci kolonun aynı kesitinde her zaman için aynı yoğunlaşma profilini görecek dolayısıyla kolon gözlemci için yatışkın şartlarda çalışan bir sistem haline gelecektir.

Bu varsayımla döner annular kolonun belli bir bölgesindeki sıvı ve katı faz konsantrasyonları zamana göre değişiklik göstermekte ve oluşturulacak olan model değişkin durumu temsil etmektedir.

Şekil 3.10'da gösterilen kontrol hacmi içerisinde iki boyutlu (eksenel yönde, x [cm] ve açısal yönde, θ [rad]) kütle aktarımı gerçekleşmektedir. Kontrol hacminin aksenal yöndeki adım genişliği Δx (cm) ve açısal yöndeki adım genişliği ($\Delta\theta$ açısına karşılık gelen yayın uzunluğu) $\Delta\eta$ (cm)'dir.

Annular kromatografi cihazlarında, kolonun yarıçapının (R), annulus kalınlığından (m) çok daha büyük olduğu göz önüne alınırsa, açısal yönde $\Delta\theta$ kadar küçük bir artışın yapılması sonucu, bu açığa karşılık gelen iç ve dış yayların uzunlukları arasında ihmal edilebilecek bir farkı olacaktır. Aynı açısal ω hızında dönen gözlemci için, açısal yönde konvektif kütle aktarımı söz konusu değildir ve açısal koordinatlarda gözlenen bant genişlemesinin sebebi bu yöndeki dispersiyon etkileridir.

Matematiksel model denklemlerinin türetilmesi sırasında kullanılacak olan dispersiyon katsayısının, aksenal ve açısal koordinatlarda nasıl kullanılacağı ile ilgili bilgi vermek yerinde olacaktır. Aksenal yönde gerçekleşen dispersiyon, kolon boyunca (cm) gerçekleşeceği için uzunluk birimlerini içeren bir dispersiyon katsayısı birimi (cm^2/s) kullanmak gerekmektedir. Açısal yöndeki dispersiyon da $\Delta\theta$ (rad) açısına karşılık gelen yay $\Delta\eta$ boyunca (cm) gerçekleşecek, dolayısıyla açısal

yöndeki dispersiyonu ifade etmek için de uzunluk birimlerine sahip bir dispersiyon katsayısına (cm^2/s) ihtiyaç olacaktır.

Şekil 3.10' da A_{c1} ($A_{c1} = m \cdot \Delta\eta$) eksenel yöndeki kütle aktarımı için kontrol hacminin kesit alanını ve A_{c2} ($A_{c2} = m \cdot \Delta x$) açısall yöndeki kütle aktarımı için kontrol hacminin kesit alanını göstermektedir. Kolonun herhangi bir bölgesinde seçilen kontrol hacminde ilgili bileşen için sıvı fazda kütle denkleği yapılırsa:

Sisteme giren bileşenin kütle hızı (mmol/s):

$$vA_{c1}\varepsilon c(x,\eta,t)\Big|_x - D_x A_{c1}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial x}\Big|_x - D_x A_{c2}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial \eta}\Big|_\eta \quad (3.40)$$

Sistemden çıkan bileşenin kütle hızı (mmol/s):

$$vA_{c1}\varepsilon c(x,\eta,t)\Big|_{x+\Delta x} - D_x A_{c1}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial x}\Big|_{x+\Delta x} - D_x A_{c2}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial \eta}\Big|_{\eta+\Delta \eta} \quad (3.41)$$

Sıvı fazda biriken bileşenin birikim hızı (mmol/s):

$$A_{c1}\Delta x\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial t} \quad (3.42)$$

Katı fazda biriken bileşenin birikim hızı (mmol/s):

$$A_{c1}\Delta x(1-\varepsilon)\rho \frac{\partial W(x,\eta,t)}{\partial t} \quad (3.43)$$

Katı için Eş. 3.43 tekrar düzenlenirse,

$$A_{c1}\Delta x(1-\varepsilon)\rho \frac{\partial W(x,\eta,t)}{\partial t} = A_{c1}\Delta x(1-\varepsilon) \frac{\partial \bar{q}(x,\eta,t)}{\partial t} \quad (3.44)$$

elde edilir. Eş. 3.44'de yer alan W (mg/g) ifadesi kolonda, adsorbentin birim ağırlığı başına adsorplanan madde miktarını vermektedir. ρ (g/cm³) ise adsorbentin yoğunluğudur. Buna göre eşitliğin sağ tarafında yer alan \bar{q} (mg/cm³) adsorbentin birim hacmi başına adsorplanan madde miktarını vermektedir.

Giren bileşen miktarı - Çıkan bileşen miktarı = Sıvı fazda biriken bileşen miktarı + Katı tarafından adsorplanan bileşen miktarı

$$\begin{aligned}
 & \left[vA_{c1}\varepsilon c(x,\eta,t)\Big|_x - D_x A_{c1}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial x}\Big|_x - D_x A_{c2}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial \eta}\Big|_\eta \right] \\
 & - \left[vA_{c1}\varepsilon c(x,\eta,t)\Big|_x - D_x A_{c1}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial x}\Big|_x - D_x A_{c2}\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial \eta}\Big|_\eta \right] \\
 & = A_{c1}\Delta x\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial t} + A_{c1}\Delta x(1-\varepsilon) \frac{\partial \bar{q}(x,\eta,t)}{\partial t}
 \end{aligned} \tag{3.45}$$

$$A_{c1} = m\Delta\eta \tag{3.46}$$

$$A_{c2} = m\Delta x \tag{3.47}$$

$$\begin{aligned}
 & \left[vm\Delta\eta\varepsilon c(x,\eta,t)\Big|_x - D_x m\Delta\eta\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial x}\Big|_x - D_x m\Delta x\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial \eta}\Big|_\eta \right] \\
 & - \left[vm\Delta\eta\varepsilon c(x,\eta,t)\Big|_x - D_x m\Delta\eta\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial x}\Big|_x - D_x m\Delta x\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial \eta}\Big|_\eta \right] \\
 & = m\Delta\eta\Delta x\varepsilon \frac{\partial c(x,\eta,t)}{\partial t} + m\Delta\eta\Delta x(1-\varepsilon) \frac{\partial \bar{q}(x,\eta,t)}{\partial t}
 \end{aligned} \tag{3.48}$$

Eş. 3.48 $\varepsilon.m.\Delta x.\Delta\eta$ ile bölünüp tekrar düzenlenir ve $\Delta x \rightarrow 0$ ve $\Delta\eta \rightarrow 0$ için limit alınırsa,

$$\begin{aligned} & \frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial t} + \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \left\{ \frac{vc(x, \eta, t)|_{x+\Delta x} - vc(x, \eta, t)|_x}{\Delta x} \right\} + \frac{(1-\varepsilon) \partial \bar{q}(x, \eta, t)}{\varepsilon \partial t} \\ &= \lim_{\Delta x \rightarrow 0} \left\{ \frac{D_x \frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial x} \Big|_{x+\Delta x} - D_x \frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial x} \Big|_x}{\Delta x} \right\} + \lim_{\Delta \eta \rightarrow 0} \left\{ \frac{D_x \frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial \eta} \Big|_{\eta+\Delta \eta} - D_x \frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial \eta} \Big|_\eta}{\Delta \eta} \right\} \end{aligned}$$

$$\frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial t} + v \frac{\partial c(x, \eta, t)}{\partial x} + \frac{(1-\varepsilon) \partial \bar{q}(x, \eta, t)}{\varepsilon \partial t} = D_x \frac{\partial^2 c(x, \eta, t)}{\partial x^2} + D_x \frac{\partial^2 c(x, \eta, t)}{\partial \eta^2} \quad (3.49)$$

elde edilir. Eş. 3.49 döner annular kolon ile aynı açısal ω hızına sahip hareketli gözlemci için, radyal difüzyonun ihmal edilmesi, aksenal ve açısal dispersiyonun dikkate alınması sonucu ortaya çıkan ve kolon içerisindeki sıvı konsantrasyon profilinin zamanla, kolon boyunca ve açığa bağlı olarak değişimini veren genel ifadeyi oluşturmaktadır. Bu eşitlikte sol taraftaki ilk terim bileşenin sıvı fazdaki birikiminin zamanla değişimini, ikinci terim bileşenin sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimini, üçüncü terim katı fazda biriken bileşenin zamanla değişimini, sağ taraftaki ilk terim kolon boyunca görülen aksenal dağılımı ve ikinci terim kolon çevresi boyunca görülen açısal dağılımı göstermektedir. Buradaki η ifadesi sözü edilen açığa karşılık gelen yay uzunluğudur. θ açısı ve karşılığı olan η yay uzunluğu arasındaki ilişki aşağıdaki gibidir.

$$\eta(cm) = R \left(\frac{cm}{rad} \right) \cdot \theta(rad) \quad (3.50)$$

Eş. 3.50'yi, Eş.3.49'da yerine koyarsak,

$$\frac{\partial c(x, \theta, t)}{\partial t} + v \frac{\partial c(x, \theta, t)}{\partial x} + F \frac{\partial \bar{q}(x, \theta, t)}{\partial t} = D_x \frac{\partial^2 c(x, \theta, t)}{\partial x^2} + \frac{1}{R^2} D_x \frac{\partial^2 c(x, \theta, t)}{\partial \theta^2} \quad (3.51)$$

elde edilir. Burada $F = \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon}$ değerindedir. Denklem 3.52 ve 3.53 ile verilen bağıntıları denklem 3.51'de yerine koyarsak, denklem 3.54 elde edilir.

$$\omega \left(\frac{rad}{s} \right) = \frac{\theta (rad)}{t (s)} \quad (3.52)$$

$$t = \frac{\theta}{\omega} \quad (3.53)$$

$$\omega \frac{\partial c}{\partial \theta} + v \frac{\partial c}{\partial x} + F \omega \frac{\partial \bar{q}}{\partial \theta} = D_x \frac{\partial^2 c}{\partial x^2} + \frac{1}{R^2} D_x \frac{\partial^2 c}{\partial \theta^2} \quad (3.54)$$

Denklem 3.54'den görüldüğü gibi yalnızca aksenal dispersiyon katsayısını kullanıp açısal dispersiyon katsayısının da bunun bir fonksiyonu olarak ifade edilebileceği şeklindeki düşüncemiz doğrulanmış olmaktadır. Bu da proje kapsamında imalatı yapılacak annular kromatografin tasarımı sırasında bir eksik parametre kullanılmasını gerektireceği için yapılacak simülasyon çalışmalarında kolaylık sağlayacaktır.

Doğrusal sürücü kuvvet (LDF) kabulü ile frontal kromatografi kolonları için aşağıdaki denklem yazılabilir (Hilbrig ve Freitag, 2003)

$$\frac{\partial \bar{q}(x,t)}{\partial t} = k_f \frac{3}{r_p} [c(x,t) - c_s^*(x,t)] \quad (3.55)$$

Ayrıca $\frac{\partial \bar{q}}{\partial \theta}$ ve $\frac{\partial \bar{q}}{\partial t}$ arasında denklem 3.53'de verilen ilişkiden yararlanarak denklem 3.56 elde edilir.

$$\frac{\partial \bar{q}}{\partial \theta} = \frac{1}{\omega} \frac{\partial \bar{q}}{\partial t} \quad (3.56)$$

Denklem 3.54, 3.55 ve 3.56 ile gösterilen kısmi türevli diferansiyel denklemler, adsorpsiyon izoterm ifadesi ile birlikte (coupled) çözüldüğü takdirde elüent

konsantrasyonunun yol, x ve θ dönüş açısı ile değişimi bulunur. Denge dağılımı (equilibrium dispersive) modelinde denklem 3.54'ün daha kolay çözülebilmesi için katı ve sıvı arasında kütle aktarım dirençleri ihmal edilir. Bu araştırmada ise Özdural ve diğerleri (2004) tarafından frontal kromatografi için geliştirilen denge dışı (non-equilibrium) yöntemin bu sisteme adaptasyonu yapılmıştır. Denklem 3.54 eliptik bir kısmi türevli diferansiyel denklem olup analitik çözümü yoktur. Sayısal çözümleme yöntemleri kullanılarak oluşturulacak çözüm algoritmaları için ise açık (explicit) yöntemlerde karşılaşılan kararlılık (stability) ve sönüm (convergence) problemlerinin önüne geçmek amacıyla kapalı (implicit) teknikler tercih edilmiştir. Denklem 3.54'de iki adet bağımlı değişken (c ve \bar{q}) olması nedeniyle aşağıda sayısal çözümleme sırasında son açındaki \bar{q} değerini bir önceki açındaki \bar{q} değerinden hesaplama imkanı veren aşağıdaki ifade türetilmiştir (Özdural ve diğerleri, 2007)

$$\bar{q}_{(j,i)} = \bar{q}_{(j-1,i)} + \frac{\varepsilon}{1-\varepsilon} \frac{\Delta t}{2\Delta x A_{c1}} \left[\begin{array}{l} v A_{c1} [c_{(j,i-1)} - c_{(j,i+1)}] - D_x A_{c1} \left(\left[\frac{c_{(j,i)} - c_{(j,i-2)}}{2\Delta x} \right] - \left[\frac{c_{(j,i+2)} - c_{(j,i)}}{2\Delta x} \right] \right) \\ - D_\theta A_{c2} \left(\frac{\partial c}{\partial \theta} \Big|_{j-1} - \frac{\partial c}{\partial \theta} \Big|_j \right) - m \Delta \eta 2 \Delta x \frac{c_{(j,i)} - c_{(j-1,i)}}{\Delta t} \end{array} \right] \quad (3.57)$$

Denklem 3.57'de bakıldığında açısal koordinatlardaki difüzyon teriminin içerdiği türevlerde, türev ifadelerinin açılması ile $j+1$ 'li terimlerin ortaya çıkacağı görülmektedir. Bunun önüne geçebilmek amacıyla herhangi bir noktadaki türev ile o noktanın yarım aralık gerisinde kalan noktadaki türevler birbirine eşit kabul edilmiştir. Bu yaklaşım, çok küçük adım aralığına sahip olunması ve bu kadar küçük adımlar arasında konsantrasyondaki değişim miktarının hemen aynı olması sebebiyle çok makul bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Açısal yöndeki difüzyon teriminin içerdiği türev ifadelerini yeniden düzenlersek;

$$\frac{\partial c}{\partial \theta} \Big|_{j-1} - \frac{\partial c}{\partial \theta} \Big|_j \cong \frac{\partial c}{\partial \theta} \Big|_{j-3/2} - \frac{\partial c}{\partial \theta} \Big|_{j-1/2} \quad (3.58)$$

Denklem 3.58 ve 3.59 aynı fiziksel anlama sahiptirler.

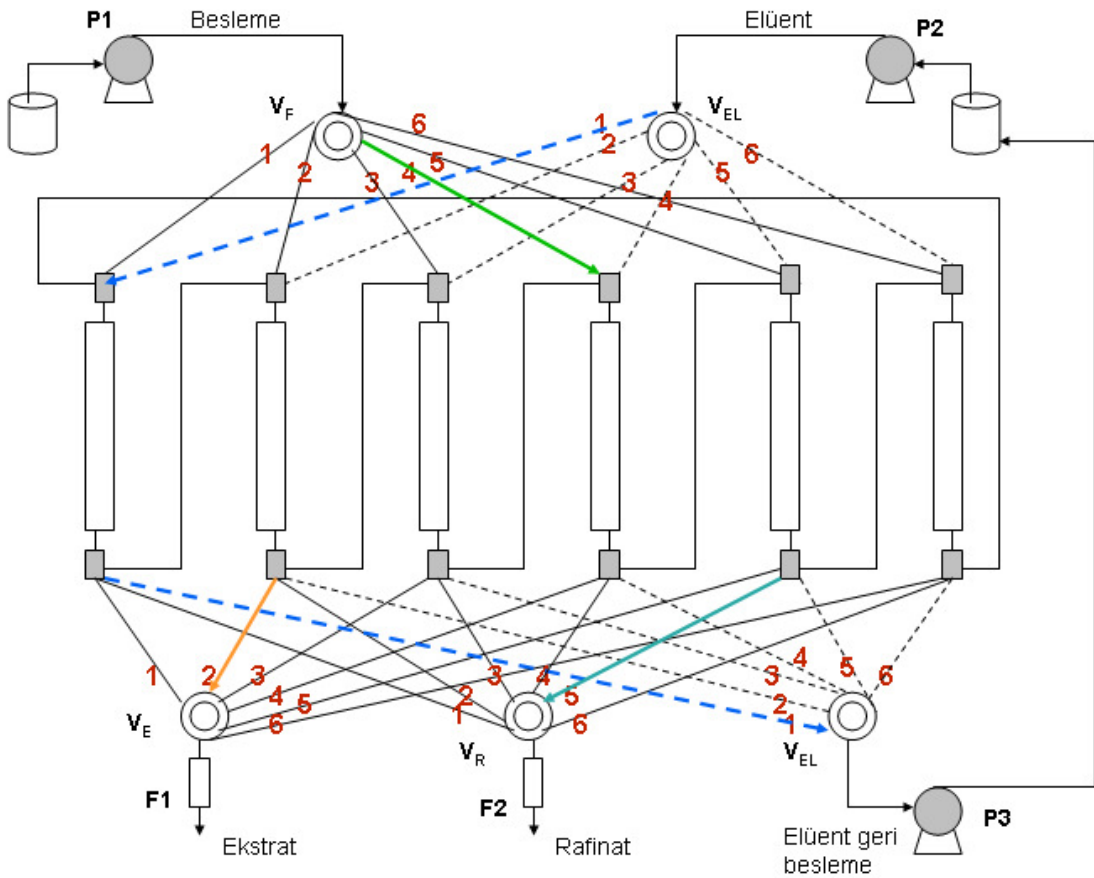
$$\left. \frac{\partial^2 c}{\partial \theta^2} \right|_{j-1/2} = \left. \frac{\partial^2 c}{\partial \theta^2} \right|_{j-1} \quad (3.59)$$

4. SÜREKLİ KROMATOGRFİK SİSTEMLERİN İMALAT ÇALIŞMALARI

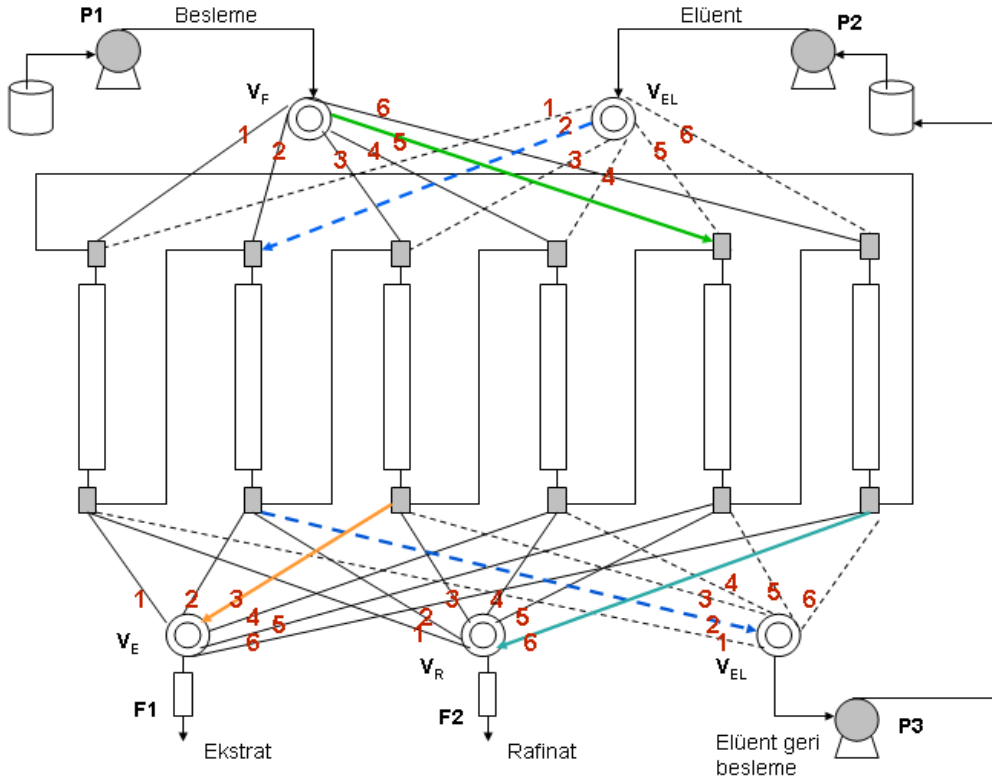
4.1. Hareketli Yatak Benzetimli Kromatograf (SMB) Cihazının İmalatı

Tez kapsamında imalatı gerçekleştirilen Hareketli Yatak Benzetimli Kromatografi cihazının (Simulated Moving Bed Chromatography, SMB), akım şeması ve fotoğrafı sırasıyla Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.'de verilmiştir. Şekil 4.1.'de akım şemasında üç değiştirme zamanı (t_s) içinde sisteme giren ve çıkan akımların senkronize olarak değişmesi net bir biçimde görölmektedir. Şekil 4.2.'de cihazın temel üniteleri ve Şekil 4.3' de SMB cihazını oluşturan 6 kolon ve bu kolonlar arasındaki bağlantı daha net bir şekilde gösterilmiştir. Bu cihaz bildiğimiz kadarıyla ölkemizdeki ilk SMB cihazı olup, laboratuvarımız dışında kurulumu tamamlanıp, ayırma ve saflaştırma amacıyla kullanılan başka bir SMB cihazı bulunmamaktadır.

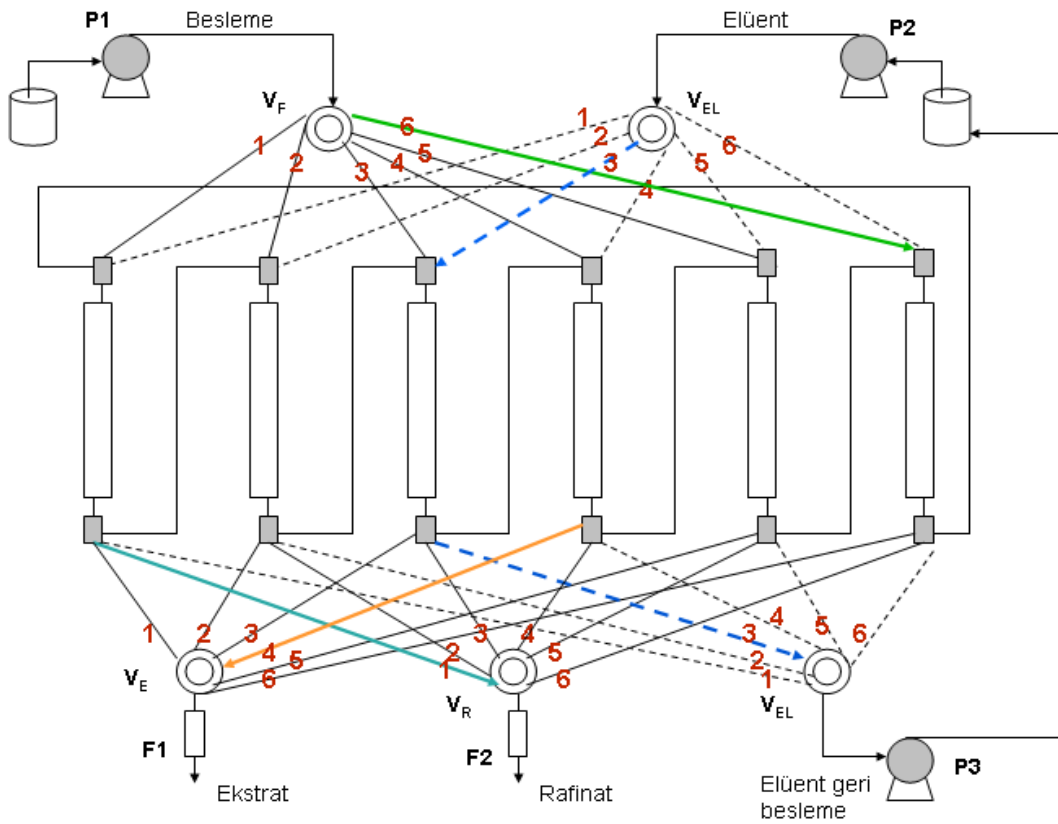
(a)



(b)



(c)



Şekil 4.1. Hareketli yatak benzetimli kromatograf (SMB) akım şeması, (a) $t = t_s$, (b) $t = 2t_s$, (c) $t = 3t_s$ zamanlarında aktif olan akımlar

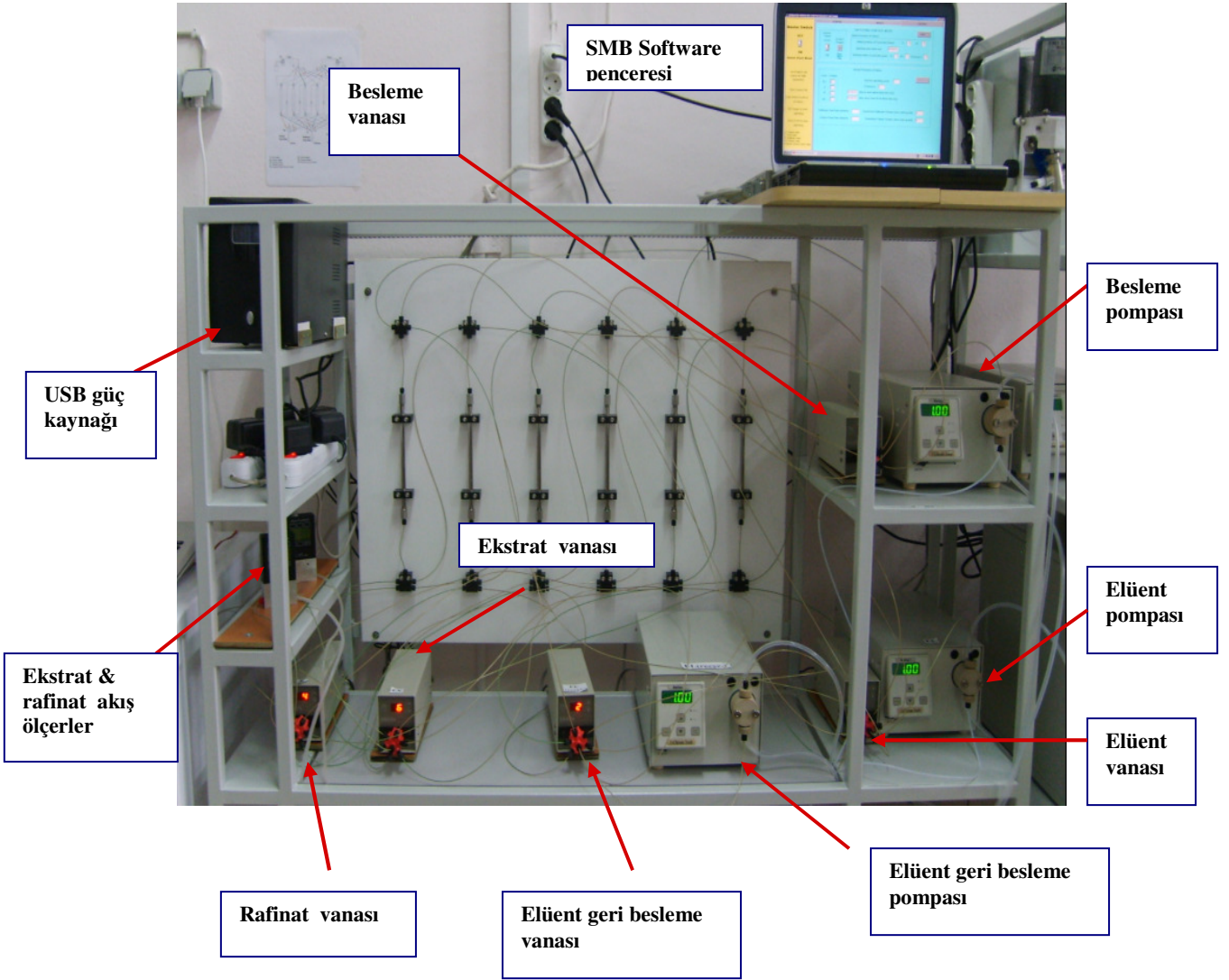
Tez kapsamında, imalatı yapılan hareketli yatak benzetimli kromatograf cihazı 6 adet kromatografik kolondan oluşmaktadır. Paslanmaz çelikten üretilen kolonlar dış çapı 0.7 cm, iç çapı 0.4 cm olmak üzere tarafımızca yaptırılmış olup kolon boyu 23 cm'dir. Ortalama partikül çapı 105 µm olan reçinenin yataktan kaçmasını önlemek üzere her bir kolonun giriş ve çıkışına titanyum filtre (Supelco, model 59038, A.B.D.) yerleştirilmiş ve her bir kolon, sızıntı yapma olasılığına karşı kontrol edilmiştir. Sistemde her bir kolon girişinde; numune, elüent ve bir önceki kolon ile bağlantıyı sağlayan toplam 3 adet giriş akımı bulunmaktadır. Bu akımlar, her kolon girişine yerleştirilen 4'lü kolektörler aracılığıyla sisteme dağıtılmaktadır. Her bir kolon çıkışında; rafinat, ekstrat, elüent geri besleme ve bir sonraki kolon ile bağlantıyı sağlayan toplam 4 adet çıkış akımı bulunmaktadır. Bu akımlar, her kolon çıkışına yerleştirilen 5'li kolektörler aracılığıyla sistemden toplanmaktadır. Bunun yanında, kolektör ve cihazı oluşturan ekipmanlar arasındaki bağlantı PEEK boru (Supelco, Lot: 171512C, katalog no: Z226955, A.B.D.) ile sağlanmış olup, boru bağlantıları, ekipman ve kolektör boyutuna uygun çeşitli bağlantı elemanları (fittings) ile gerçekleştirilmiştir. Yukarıda bahsedilen bağlantılar Şekil 4.3.'de verilen, cihazın yakından çekilmiş fotoğrafında görülmektedir.

Kolonlara, numune, elüent ve elüent geri beslemesini sağlamak için sistemde hacimsel akış hızı 1-10 mL/dak aralığında ayarlanabilen 3 adet HPLC pompası (Chrom Tech Series I, A.B.D.) kullanılmaktadır. SMB ünitesini oluşturan ekipmanlardan en önemlisi değiştirme zamanı sonunda kolon giriş ve çıkış akımlarını bir sonraki kolona periyodik olarak taşıyarak sabit faz hareketinin simüle edilmesini sağlayan döner vanalardır. Cihazda, her bir kolona numune, elüent akımlarının beslemesini ve her bir kolondan rafinat, ekstrat, elüent geri besleme akımlarının toplanmasını gerçekleştiren toplam 5 adet döner vana (Besta Technik, model 44332, Almanya) bulunmaktadır. Cihazın 6 adet kolondan oluşması sebebiyle bu vanalar 7 porta sahiptirler. Bu vanalar, kolonlara beslenen numune, elüent akımları için 1 giriş – 6 çıkış ve kolonlardan toplanan rafinat, ekstrat, elüent geri besleme akımları için 6 giriş – 1 çıkış pozisyonunda çalışmaktadır. Kolon giriş ve çıkış akımlarını senkronize olarak aktif hale getiren vanalar, SMB cihazı için tarafımızca geliştirilen SMB Software (Ek.1) programı ile kontrol edilmektedir. Rafinat ve ekstrat akış hızları, sistemde bulunan 2 adet akış hızı ölçer (Alicat Scientific, Series16, model L-10CCM-D, A.B.D.) ile belirlenmekte ve Software programından ürünlerin analiz sırasındaki

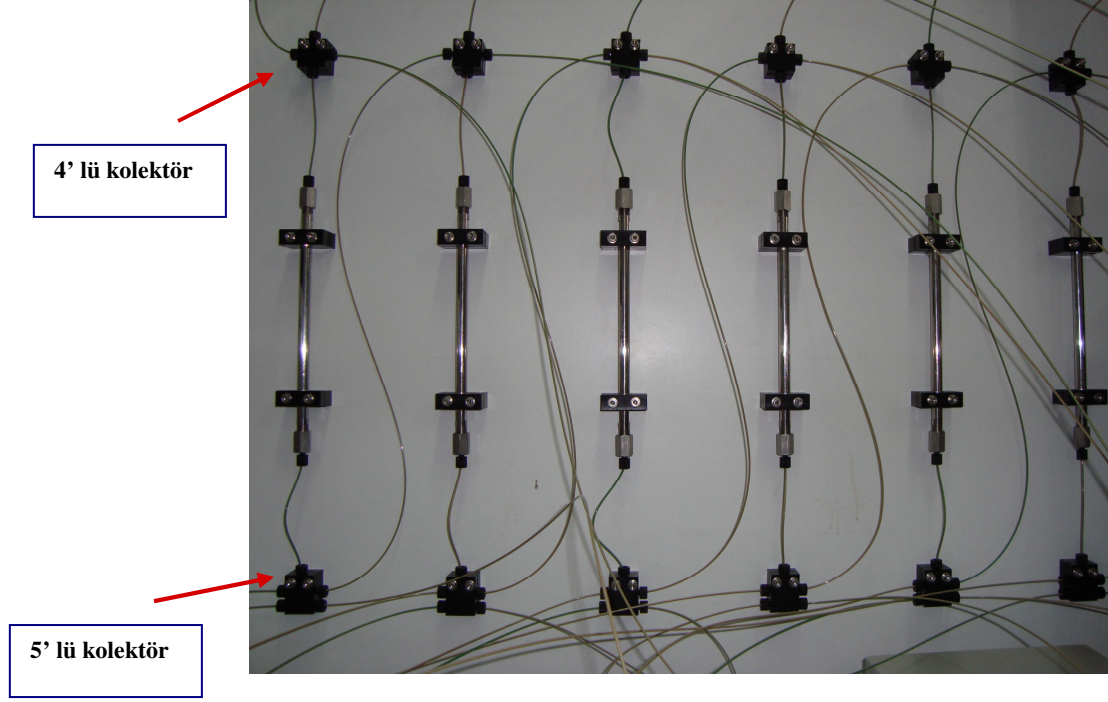
akış hızı değerleri anlık olarak okunabilmektedir. Herhangi bir elektrik kesintisi karşısında analizin bölünmemesi için SMB cihazına 1 adet kesintisiz güç kaynağı (Sanke Electrical Co., Ltd, model Guard - LCD 2000, Çin) bağlanmıştır.

SMB kromatograf cihazı için hazırlanan Software programının görünüşü Ek.1'de verilmektedir. Ek.1(a) yazılım programının ana menüsünü, Ek.1(b) SMB deneyi ile ilgili genel bilgilerin girildiği "General" tabını ve Ek.1(c) deneyin çalışma parametrelerinin ve çalışma modunun belirlendiği "Inputs" tabını göstermektedir. SMB çalışma modunun belirlenmesi, sistemin ayırma performansını geliştirmek adına büyük önem teşkil etmektedir. Geliştirilen yazılım programında "Control Mode" başlığı altında akımların senkronize değişimi, zamana (Switching Control) veya ilk defa tarafımızca sunulan bir yöntem olan ürün hacmine bağlı (Flow Control) olarak seçilebilmektedir. Bunun yanında, "Recycle Mode" seçimi ile sistemde elüent geri besleme pompası, isteğe bağlı olarak devre dışı bırakılabilmekte böylelikle kolonlardan toplanan elüent akımı, kolonlara tekrar beslenmek yerine sistemden atılabilmektedir.

"Control" tabı Ek.1(d) vanaların başlangıç pozisyonunun seçildiği yazılımın son ve en önemli bölümünü oluşturmaktadır. Burada, "Inputs" tabında seçilen moda bağlı olarak SMB işletimi sırasında numune, elüent, rafinat, ekstrat ve elüent geri besleme vanalarının aktif portları, değiştirme zamanı (sistemin "Switching Mode" da çalışması halinde) veya hedeflenen ürün miktarı eldesi (sistemin "Flow Mode" da çalışması halinde) sonunda bir sonraki kolona senkronize biçimde geçmektedir. Ayrıca deney başlangıcından itibaren her 5 vananın anlık pozisyonu ile ürünleri oluşturan rafinat ve ekstrat akımlarının akış hızları ve hacimleri "Control" tabında görülebilmektedir. "Control" tabında, deney boyunca izlenebilen tüm bu veriler deney sonunda, Excel dosyasına (Ek. 1(e)) aktarılmaktadır.



Şekil 4.2. Laboratuvarımızda bulunan ve bu tez kapsamında tasarlanıp imal edilen hareketli yatak benzetimli kromatograf (SMB) cihazının önden görünüşü



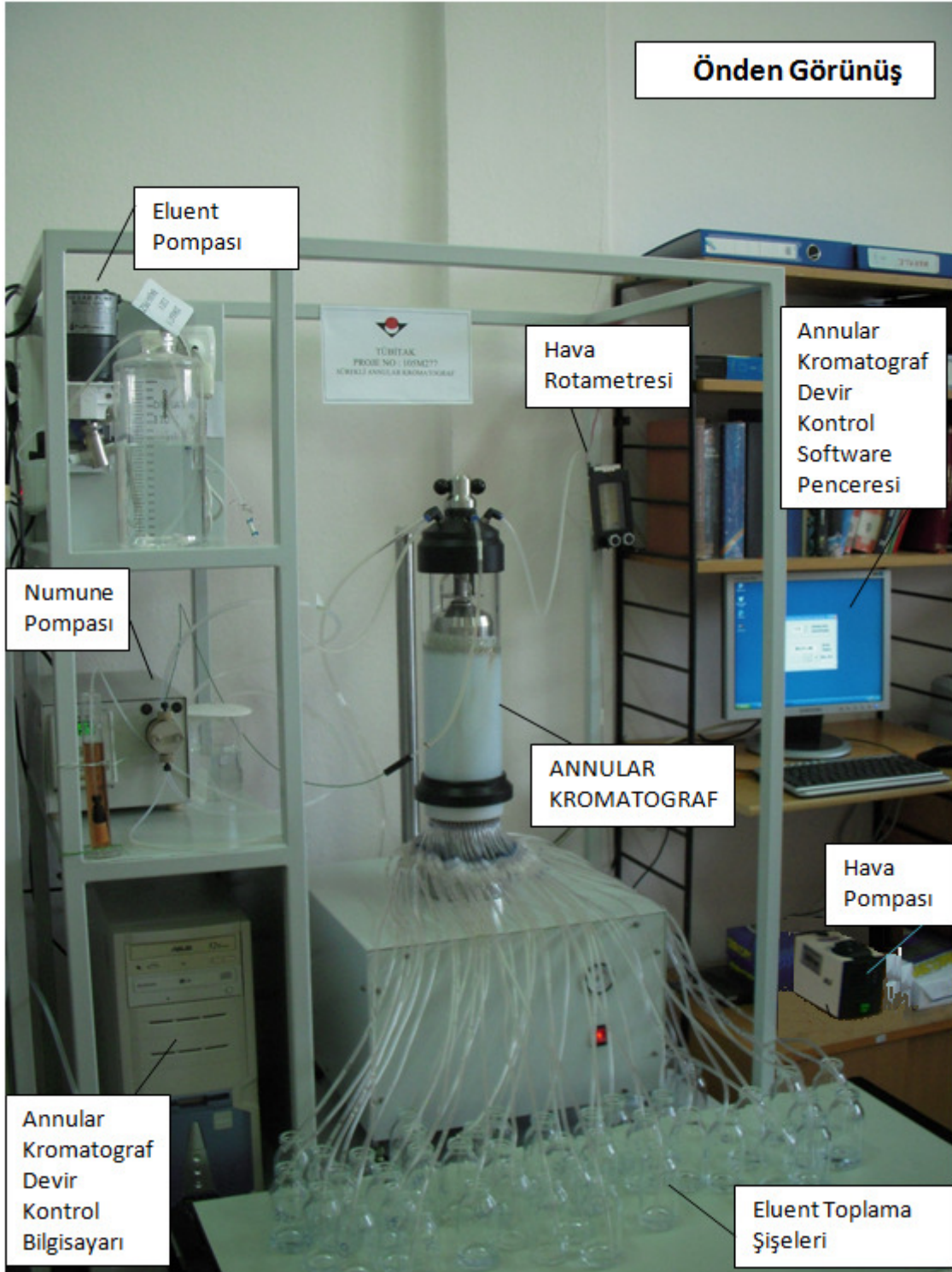
Şekil 4.3. SMB cihazında, kolon bağlantılarının yakından görünüşü

4.2. Sürekli Annular Kromatograf (CAC) Cihazının İmalatı ve Yatağın Sabit Faz ile Doldurulması

4.2.1. Basıncılı sürekli annular kromatograf cihazının imalatı

Tez kapsamında imal ettirilen Basıncılı Sürekli Annular Kromatografi cihazının (Pressurized Continuous Annular Kromatograf – P CAC) önden ve yandan çekilen fotoğrafları sırasıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. Şekil 4.4.'de cihazın temel üniteleri gösterilmiştir. Bu cihaz bildiğimiz kadarıyla ülkemizdeki ilk Annular Kromatografi cihazı olup, halen laboratuvarımız dışında Annular Kromatografi ile ayırma ve saflaştırma çalışmaları yapılmamaktadır. Cihazın devir hızı 0.1 – 3.5 devir/saat arasında bilgisayar kontrollu olarak ayarlanabilmektedir. Bu amaç için gerekli olan yazılım yardımıyla, cihazdaki step motor hızının hassas bir şekilde tekrarlanabilirliği sağlamaktadır. Yapılan ölçümler sonucunda set edilen devir hızındaki hatanın % 0.1 den daha az olduğu saptanmıştır. Cihazda 48 adet elüent çıkış deliği bulunmaktadır. Reçinenin yataktan kaçmasını önlemek üzere, dönen alt tabakanın (gliding ring) her delik çıkışına 10 µm lik sinter metal filtre yerleştirilmiştir. Annulusu oluşturan iç silindir AISI 316 paslanmaz çelikten, dış silindir ise 7 mm

kalınlıkta borosilikat camdan yapılmıştır. Annulus genişliği 6 mm olup cam silindirin dış çapı 12 cm, reçinenin doldurulduğu annulus faydalı ykseklđi ise 25 cm'dir. Cihazı gerektiği durumlarda basınç altında çalıştırmak için hava basılmaktadır. Bu amaca yönelik hava pompası (KNF, model 811 KN18, Almanya) ve hava hızını ayarlamakta kullanılan rotametre Şekil 4.1.'de görülmektedir. Annular kromatograf kafası alışma Şartlarında hava sızdırmamaktadır. Cihazda numune pompası olarak hacimsel akış hızı 1-10 mL/dak aralığında ayarlanabilen bir HPLC pompası (Chrom Tech Series I, A.B.D.) kullanılmaktadır. Elüent pompası amacıyla, akış hızının karşı basınçtan etkilenmemesi için, preperatif sıvı kromatografisine uygun bir pompa (Fluid Metering Inc., Model QSY-1, A.B.D.) kullanılmıştır. Şekil 4.5.'de de st sol köşede, cihazın altında bulunan gider haznesi ve numunelerin toplanmasında kullanılan hortum bağlantıları gösterilmiştir. Bu tasarım, sürekli kromatografi uygulamasında, yatağı terk eden elüentin hangi açıda olanların toplanacağı, hangilerinin gidere verileceği ile ilgili düzenlemenin kolaylıkla yapılmasını sağlamaktadır. Cihazda yatak, saat yönü istikametinde dönmektedir.



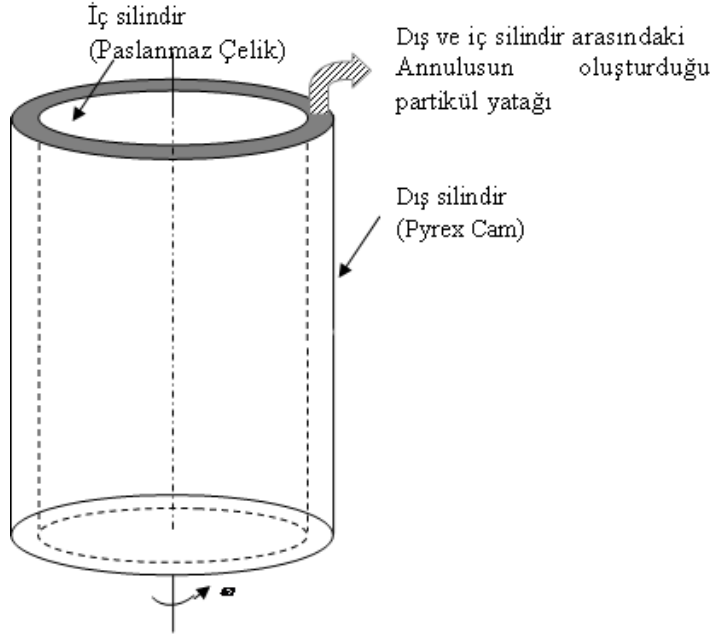
Şekil 4.4. İmal ettirilen döner annular kromatograf cihazının önden görünüşü.



Şekil 4.5. İmal ettirilen döner annular kromatograf cihazına dair bazı detaylar.

4.2.2. Annular kromatografte partikül yatağının sabit faz ile doldurulması

Sürekli annular kromatografte partikül yatağı Şekil 4.6.'da şematik olarak gösterildiği gibi iç içe geçmiş, eş eksenli iki silindir arasındaki boşluktan oluşur. Şekil 4.5.'de AC kolonunun reçine ile doldurulmadan önceki boş fotoğrafı ve reçine ile doldurulduktan sonraki fotoğrafı görülmektedir.



Şekil 4.6. Sürekli annular kromatorda partikül yatağının şematik gösterimi.

Yatağın kanallaşmaya meydan verilmeden sabit faz ile doldurulması (packing) tüm kromatografik kolonlar için olduğu gibi annular kromatograf için de çok önemlidir. Maksimum etkinlik ve yüksek oranda ayırabilme için, yatak homojen bir şekilde doldurulmalıdır. Yatak dolgusunda karşılaşılabilecek düzensizlikler ve oluşacak kanalcıklar akış dağılımını bozar, band genişlemesine, zonların birbiri içerisine girmesine, akış hızlarında değişikliklere ve bunların sonucunda ürün veriminde ve kalitesinde kayıplara neden olur (Vogel et al., 2002; BioPharm International Guide, July 2003; Majors, 2004). Bu nedenle kromatografik kolon doldurulması hakkında alınmış çok sayıda patent bulunmakta olup, içinde bulunduğumuz 2007 yılında bile, US patent dairesine konu hakkında başvuru yapılmaktadır (Wirtschaftspark, 1999; Nicola, 2004; Hofmann, 2005; Bernd-Walter, 2007).

Annular kromatograf yatak boşluğunun sabit fazla doldurulması ön denemelerinde reçinenin doğrudan yatağa dökülmesi denenmiş, fakat yatakta oluşan kanallar nedeniyle çeşitli olumsuzluklarla karşılaşılmıştır. Doldurulan yatakta ortaya çıkan kanallaşmayı önlemek için, çember şeklindeki bir aparatla annulustaki dolgu maddesi üst taraftan mekanik olarak sıkıştırılmışsa da olumlu sonuca ulaşılamamıştır.

Bu yönteminin başarısız olması üzerine, tarafımızca yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Yatak doldurulması için çeşitli şirketlerce alınmış olan ve Referanslar kısmında bazıları verilen patentlerin korumasından kaçınabilmek, yatak doldurulması sırasında gözettiğimiz önceliklerden biridir. Mevcut patentleri ihlal etmemek için yaygın olarak kullanılan şilempe (slurry) doldurmaya benzer bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde yatak için belirlenen yüksekliğe şilempe dolum ile ulaşıldıktan sonra, şilempe akışı kesilip bunun yerine sisteme su verilmektedir. Suyun akış hızı o şekilde ayarlanmaktadır ki yatak üzerinde her zaman yeterli yükseklikte su sütunu bulunmakta ve su basınçlı hava ile sürekli annular kromatograf içerisinde sıkıştırılmaktadır. Bu şekilde yatak homojenitesi sağlanabilmekte ve kanallaşmanın önüne geçilebilmektedir.

Yapılan denemeler sırasında en iyi sonuç hacimce % 40 reçine % 60 su içeren şilempe ile alınmış ve tamamen homojen, çatlaksız bir yatak elde edilmiştir. Yatak yüksekliği 25 cm olarak seçilmiştir. Annulusun reçine ile doldurulmasının ardından, yatağın üst tarafında 3,5 cm yüksekliğinde bir bant oluşturacak şekilde 2,5 mm çaplı cam boncuklar dizilmiştir. Bu şekilde doldurulmuş yatağın fotoğrafları Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.'de verilmiştir. Sürekli annular kromatograf kolon doldurulmasına (packing) dair geliştirdiğimiz bu yöntemin patentlenebilmesi için Tübitak Başkanlığına başvuru yapılması planlanmaktadır.

Yatak dolgu maddesi olarak Q Sepharose XL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, İsveç) iyon değiştirici reçine seçilmiştir. Bu iyon değiştirici reçine, klarifiye edilmiş besleme çözeltilisinin dolgulu yataklardan geçirilmesi ve bu şekilde biyomoleküllerin yakalanması işlemlerinde kullanılmak üzere üretilmekte olup, biyomoleküllerin kromatografik olarak saflaştırılmasında geniş bir uygulama alanı bulmaktadır (Andersson et al., 2001; Dimino et al., 2007; Staby et al., 2007; Tuğcu ve diğerleri, 2008).

Q Sepharose XL iyon değiştirici reçinenin özellikleri Çizelge 4.1.'de verilmiş olup, reçine yapısında dekstran zincirleri, agaroz matrisine kovalent bağlanmış halde bulunmaktadır.

Çizelge 4.1. Q Sepharose XL nin Özellikleri (GE Healthcare Bio-Sciences, 2006)

İyon değıştirici tipi:	Kuvvetli anyon
İyonik kapasite:	0.18–0.26 mmol Cl-/ml adsorbent
Matris yapısı:	Çapraz bağlı 6% agaroz ve dekstran
Partikül şekli:	Küresel, 45–165 µm
Ortalama partikül boyutu:	105 µm
Kimyasal kararlılığı:	Tampon ve aşağıda belirtilen çözeltilerde kararlı
“	– 1 M NaOH
	– 20% ethanol
	– 6 M guanidine HCl
Fiziksel kararlılığı:	pH ve iyonik şiddet değışimlerinde hacim değışimi ihmal edilebilecek düzeyde
Tavsiye edilen pH	
çalışma aralığı:	2–12
Bağlama kapasitesi:	>130 mg BSA/ml adsorbent
Sıcaklık kararlılığı:	4 - 40 °C
Saklama:	% 20 etanol

5. ANNULAR KROMATOGRFİDE BOVİN SERUM ALBUMİN SAFLAŞTIRMA PERFORMANSININ İNCELENMESİ

Tezin deneysel çalışmalarını içeren bu bölümün temel amacı, sığır kan serumundan Bovin Serum Albumin' in (BSA) elde edilmesi ve saflaştırılarak liyofilizasyona hazır şekle getirilmesi için gerekli olan “Yapma Bilgisinin” (Know How) elde edilmesidir.

Ön filtrasyon işlemine tabi tutulan sığır kanından serum eldesi, tanjant akış filtrasyon cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Tanjant filtrasyon basamağından elde edilen filtratın liyofilize edildikten (dondurularak kurutulduktan) sonraki fotoğrafı Şekil 5.6.b'de verilmiş olup, ciddi oranda safsızlık olduğu görülmektedir. Retantatın gözle muayenesi, safsızlık oranının daha da yüksek olduğunu işaret ettiğinden, tezin sonuç kısmında belirtilen safiyet düzeyine ulaşabilmek için tanjant filtrasyon basamağı gerekli görülmektedir.

Ön filtrasyon işlemi sonunda, sığır kanından çıkılarak elde edilen serumdan, imal ettirilen “Döner Kromatograf (Annular Chromatography)” cihazı kullanılarak BSA ayrılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen BSA dondurularak kurutulduktan (freeze dried) sonra karakterizasyonu FTIR ve HPLC cihazları ile yapılmıştır.

5.1. Sığır Kanından Serum Eldesi ve Serumun İşlenmesi

Sığır kan serumunun, Şap Enstitüsü Müdürlüğünün yardımıyla, Eskişehir ve Çubuk mezbahalarında kesilen hayvanların kanlarından eldesi yoluna gidilmiştir. Önce Şap Enstitüsü tarafından geliştirilen yapma bilgisi çerçevesinde, büyük ölçekteki işlemlerden oluşan bir prosesle, sığır kanı yerinde (mezbahada) Enstitü personeline işlenmiştir. Elde edilen serum, laboratuvarda iki aşamalı ve her aşamanın çeşitli filtrasyon kademelerinden oluştuğu bir saflaştırmaya tabi tutulmuştur. Bunun amacı, kromatografik ayrılmaya tabi tutulacak olan albumin ile birlikte serum içerisinde bulunan çok sayıdaki bileşiğin albuminden uzaklaştırılmasıdır.

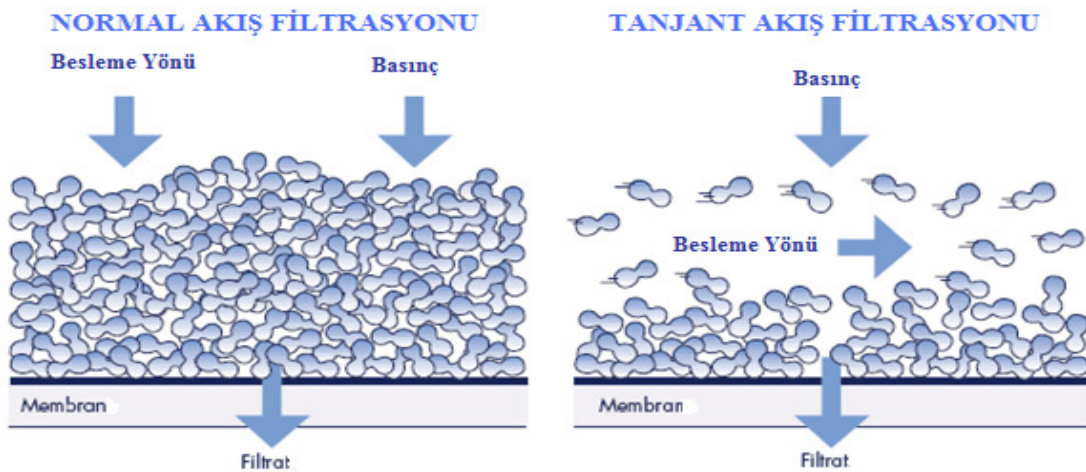
Sığır kanının mezbahada işlenmesi ve bunu takiben kan serumunun ön filtrasyon ve klarifikasyon aşaması Ek.2' de verilmiş olup, - 20 °C ta dondurulan bu serumlar ile tanjant akış filtrasyon aşaması gerçekleştirilmiştir.

5.1.1. Sığır kan serumunun tanjant akış filtrasyonu aşaması

Klarifiye edilmiş (Ek.2) sığır kan serumundan, döner annular kromatografi cihazı ile sürekli sistemde BSA saflaştırılmasında kolaylık sağlayacağı için, çözeltideki diğer bileşiklerin sayısının azaltılmasının önemi açıktır. Bu nedenle, yukarıda klarifiye edildikten sonra -20°C ta dondurularak saklandığı belirtilen sığır kan serumu tekrar oda sıcaklığında çözüldü. Daha sonra birbirini takip eden; (a) normal akış filtrasyonu - membranın akış yönüne dik konumda olduğu, (b) tanjant akış filtrasyonu - membranın akış yönüne paralel konumda olduğu; iki farklı filtrasyon işlemine tabi tutuldu. Şekil 5.1'de normal akış filtrasyonu ile tanjant akış filtrasyonu arasındaki fark şematik olarak gösterilmiştir. Doğrudan tanjant akış filtrasyon aşamasına başlanmamasının nedeni, çözülen serumdaki bileşenlerin olası tekrar topaklanmaları sonucunda, ultrafiltrasyon amacıyla kullanılacak tanjant (çapraz) filtrasyon membranlarını tıkaşmasını önlemektir.

Normal akış filtrasyonu sırasında Minisart tipi PTFE filtre (Sartorius - Almanya) kullanılmıştır. Serum önce $0.45\ \mu\text{m}$ daha sonra da $0.22\ \mu\text{m}$ gözenek boyutlu Minisart şırınga filtrelerden süzülmüştür.

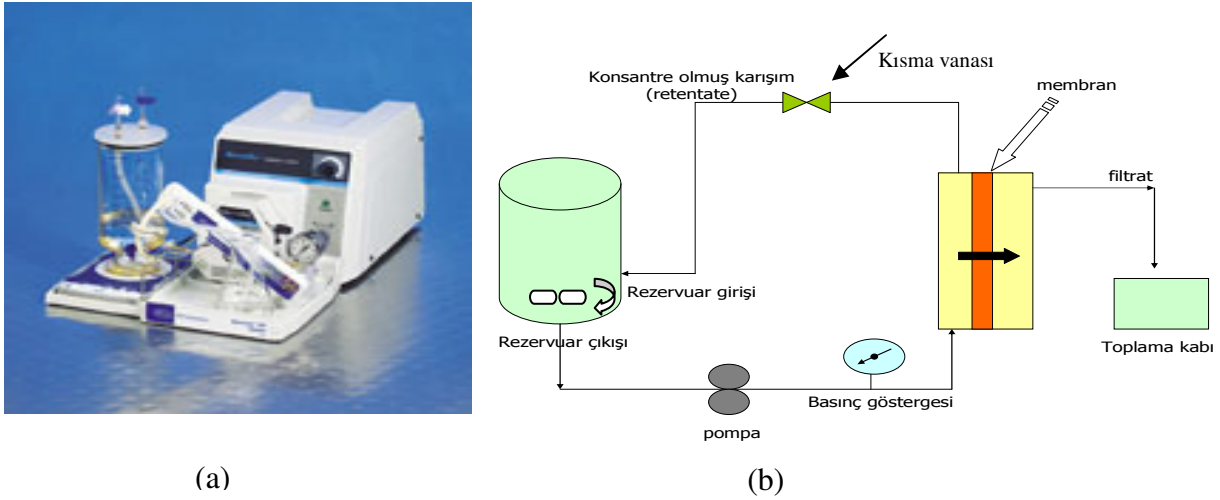
Bu şekilde elde edilen filtrat (serum) daha sonra tanjant (çapraz) akış ultrafiltrasyonuna tabi tutulmuştur.



Şekil 5.1. Normal akış ve tanjant akış filtrasyonunun şematik gösterilişi

Tanjant akış filtrasyonu, proteinlerin saflaştırılmasında sık kullanılan bir membran ayırma tekniğidir. Bu uygulamada, çözelti membran yüzeyinden sirküle ettirilerek membranın tıkanması hissedilir derecede önlenir. Genellikle 1 - 1000 kDa arası proteinlerin membran gözeneklerinden geçebildiği filtrasyon işlemine ultrafiltrasyon (UF) denir. Bu çalışmadaki tanjant akış filtrasyonu, BSA'nın molekül ağırlığının 66 kDa olması nedeniyle UF aralığında gerçekleştirilmiştir.

Şekil 5.2'de deneylerin yapıldığı tanjant akış filtrasyon sisteminin (Minimate TFF, Pall Co., A.B.D.) fotoğrafı ve şematik çizimi verilmiştir. Minimate TFF cihazında, kartuş tipi UF membranı (Minimate TFF capsule- omega) kullanılmıştır. İmalatçı firma (Pall Co., A.B.D.), kartuş filtre membranlarının polietersulfon olduğunu belirtmektedir.



Şekil 5.2. Deneylerde kullanılan tanjant akış filtrasyon sistemi. (a) cihazın fotoğrafı, (b) şematik çizimi.

Tanjant akış filtrasyonu için, Şekil 5.2'de gösterilen rezervuar istenilen miktarda serum (besleme) ile doldurulur ve sistemdeki manyetik karıştırıcı ile rezervuar sıvısı deney süresince karıştırılır. Daha sonra, peristaltik pompa yardımıyla besleme önce membrana (Minimate TFF capsule) buradan da tekrar rezervuara geri gönderilerek resirkülasyona başlanılır. Minimate TFF Sistem, çapraz akış (tanjant akış) prensibi ile çalışmaktadır. Besleme basınçlı şekilde ve membran yüzeyine teğet olarak geçer. Normal akış filtrasyonunda beslemenin membran yüzeyine dik gönderilmesiyle meydana gelen "fouling" engellenmiş olur. Membran gözeneklerinden geçebilen çözelti, filtrat toplama kabında toplanılır. Gözeneklerden geçemeyerek konsantre olan çözeltiye retentat denir ve rezervuara geri beslenir.

Tanjant akış filtrasyonu sırasında, BSA'nın molekül ağırlığının 66 kDa olması nedeniyle, filtrat kabına BSA'yı aktarabilmek için kullanılacak olan membranın kesme aralığının bu değerden büyük olması gereklidir. Denemelere, 100 kDa (OA100C12) ve 300 kDa (OA300C12) kesme aralıklı (cut off) Minimate TFF kartuşları kullanılarak başlanmıştır. Peristaltik pompa yardımıyla serum önce membrana oradan da rezervuara sirküle edilmiştir.

Her iki kartuşla yapılan tanjant akış filtrasyonunda, basınç 2,5-3 bar düzeylerine yükseltilmesine rağmen filtrat hızının 0.15 mL/dak değerinin altında olduğu gözlenmiştir. Filtrat hızını artırmak için tanjant akış filtrasyon deneylerine 500 kDa (OA500C12) kesme aralıklı Minimate TFF kartuşu kullanılarak devam edilmiştir. Rezervuara 200 mL sıgır kan serumu doldurulup, geri dönüş hattındaki kısma vanasının ayarlanması ile sistem 2 ± 0.5 Bar basınç altında tutulmuştur. Bu şekilde, başlangıçta filtrat akış hızının 0.8 mL/dak değerine ulaştığı gözlenmiştir. Bununla beraber, membran yüzeyindeki birikmeye bağlı olarak, zamanla filtrat akış hızında düşme olmaktadır. Ayrıca, basınç sabit tutularak rezervuar tarafı akışkanı sirküle ettirildiğinden, çalışmalar sabit bir resirkülasyon hızında yapılamamıştır. Deney sırasında, basıncı Çizelge 5.1'de belirtilen aralıkta sabit tutabilmek için resirkülasyon akış hızı zamanla düşürülmüş olup başlangıçta 50 mL/dak resirkülasyon hızı ile çalışılmıştır. Sirkülasyon işlemine, 50mL filtrat elde edilene ve rezervuarda 150mL retantat kalana kadar devam edilmiştir. Bu veriler ışığında, sonraki deneylere Çizelge 5.1'de açıklanan şartlar altında devam edilmesi kararına varılmıştır. Bu şekilde, rezervuardaki serum içerisinde bulunan BSA'nın 500 kDa membrandan tanjant akış filtrasyonu ile filtrata aktarılması ve büyük molekül ağırlıklı maddelerden uzaklaştırılması gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 5.1. Tanjant akış filtrasyon çalışma parametreleri

Membran kesme aralığı (kDa):	500
Membran tipi:	OA500C12 Minimate TFF kartuşu
Rezerv. başlangıç serum hacmi (mL):	200
Son filtrat hacmi (mL):	50
Son retantat hacmi(mL):	150
Başlangıç resirkülasyon hızı (mL/dak):	50
Çalışma basıncı (bar):	2 ± 0.5

5.1.2. Tanjant filtrasyon sonucunda filtrat olarak elde edilen serumun HPLC kromatogramı

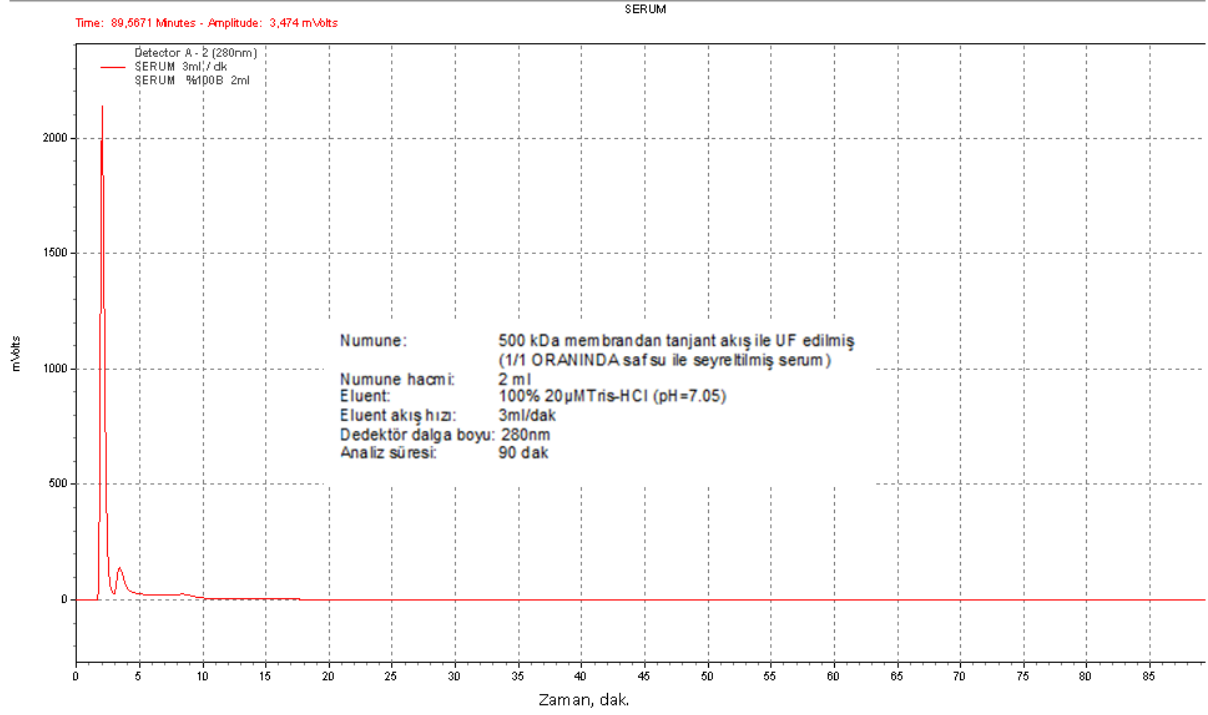
Tanjant akış filtrasyon aşamasında elde edilen filtrat, döner annular kromatografi cihazı ile sürekli sistemde BSA saflaştırılmasında besleme olarak kullanılacaktır. Bu besleme çözeltisindeki diğer bileşiklerin sayısının azaltılması, BSA saflaştırılmasını kolaylaştıracağı için yukarıda açıklanan tanjant akış filtrasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde elde edilen filtratta kalan bileşen sayısı hakkında fikir edinebilmek için, filtratın HPLC kromatogramı çekilmiştir.

Deneyde Shimadzu-VP marka (Japonya) HPLC cihazı ve UV dedektör (SPD-10AVP) kullanılmıştır. HPLC kolonu olarak HiPrep 16/10 Q XL (GE Healthcare, İsveç) kolonu kullanılmıştır. Bu kolon protein tutulması, enzim, protein ve peptinlerin anyon değiştirici kromatografi ile saflaştırılmasında yüksek bağlama kapasitesi nedeniyle tercih edilmektedir (Chen ve Wang, 2004; Chen ve Hopper, 2005) HiPrep 16/10 Q XL kolon bilgileri Çizelge 5.2'de verilmiştir (GE Healthcare, 2005).

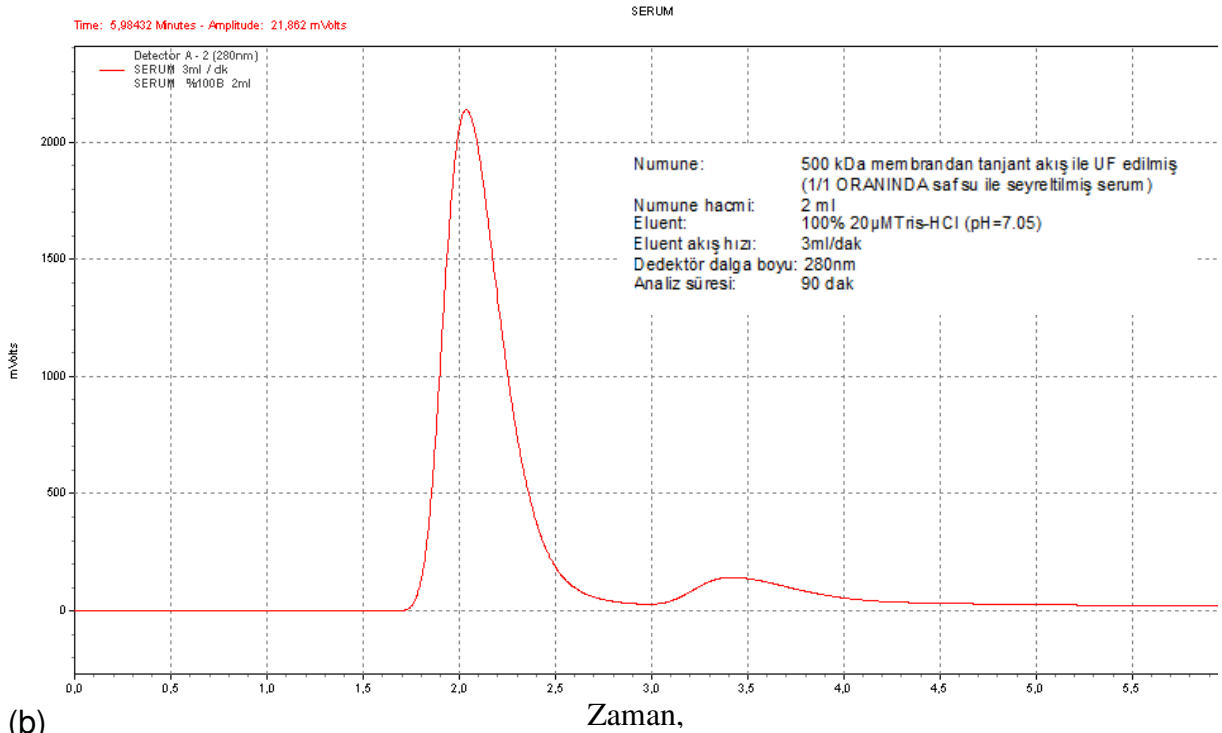
Elde edilen filtrattan 20 mL alınmış ve üzerine 20 mL damıtık su ilavesiyle 1/1 oranında seyreltilmiştir. Bu şekilde elde edilen serum örneğinden (yarı yarıya seyreltilmiş filtrat) 2mL kolona besleme enjekte edilmiştir. Deneyler sırasında elüent olarak 20µM Tris-HCl (pH=7.05) kullanılmış olup, elüent akış hızı olarak 3 mL/dak seçilmiştir. Bu şartlar altında elde edilen kromatogram Şekil 5.3'de verilmiştir.

Çizelge 5.2. HiPrep 16/10 Q XL kolon bilgileri

Matris:	% 6 yüksek çapraz bağlı agarose
Ortalama partikül çapı:	90 µm
Yatak hacmi:	20 mL
Yatak Yüksekliği:	100 mm
Kolon iç çapı	16 mm
İyon değiştirici:	Kuvvetli anyonik
Fonksiyonel grup:	-N ⁺ (CH ₃) ₃
Toplam iyonik kapasite:	0.18-0.26 mmol Cl ⁻ /mL reçine



(a)



(b)

Şekil 5.3. Tanjant akış filtrasyonunda filtrat tarafına geçen sığır kan serumu kromatogramı (a) 90 dak. zaman süresi için kromatogram. (b) Başlangıç süresi (≈ 6 dak.) için HPLC kromatogramı.

Tezin ilerleyen bölümlerinde, döner annular kromatografi cihazı ile gerçekleştirilen sürekli ayırma prosesi ile Şekil 5.3'de görülen piklere karşı gelen bileşenler birbirinden ayrılması ve karakterize edilmesine yer verilmektedir.

5.2. Döner Kromatograf ile Sürekli Yöntemle Serumdan BSA Ayrılması ve Saflaştırılması Deneyleri

5.2.1. Beslemenin hazırlanması

BSA ayrılması ve saflaştırılması için Annular Kromatografte kullanılan serum, Eskişehir mezbahasında kesilen sığırların kanından elde edilmiştir. Sığır kanının mezbahada işlenmesi ve bunu takiben kan serumunun ön filtrasyon ve klarifikasyon aşaması sonucu elde edilen serum bir batch olacak şekilde karıştırılmış ve gerektiğinde sonraki işlemlerde kullanılmak üzere 500 ml hacmindeki 10 adet plastik şişeye doldurulup -20 °C de dondurularak saklanmıştır. Böylece tüm deneylerde kullanılan serumun aynı özelliklere sahip olması temin edilmiştir.

Daha sonra -20 °C de dondurulan serum oda sıcaklığında çözülerek, serumda bulunan diğer bileşiklerin sayısının azaltılması amacıyla kesme aralığı 500 kDa olan membrandan 1 kısım filtrat için 3 kısım retantat kalacak şekilde tanjant akış filtrasyonu yapılmıştır. Tanjant filtrasyon sonucunda filtrat olarak elde edilen serum BSA ayrılması ve saflaştırılması için Annular Kromatografte besleme olarak verilmiştir.

5.2.2. Q Sepharose XL reçinesi ile doldurulmuş annular kromatograf yatağının yıkanması ve şartlandırılması

İlk defa Q Sepharose XL reçinesi ile doldurulmuş (packed) annular kromatografte, elüent pompası yardımıyla 40 dakika süreyle 15 mL/dak hızla damıtık su geçirilerek yatağın yıkanması sağlanmıştır. Daha sonra yatak, 40 dakika süreyle 15 mL/dak hızla 20 mM Tris-HCl tamponu (pH = 7.0) geçirilerek şartlanmış ve deneyin başlatılmasına hazır hale getirilmiştir.

Sonraki kullanımlarda ise bir önceki deneyde kullanılan yatak, olası mikroorganizma büyümesini önlemek amacıyla, bekletilmeden 40 dakika süreyle 15 mL/dak hızla

20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl tamponuyla (pH = 7.1) yıkanarak temizlenmiştir. Bu işlemi takiben yataktan 40 dak süreyle 15 mL/dak hızla damıtık su geçirilerek yatak yıkanmıştır. Daha sonra yatak, 40 dakika süreyle 15 mL/dak hızla 20 mM Tris-HCl tamponu (pH = 7.0) geçirilerek şartlanmış ve bir sonraki deney için hazır hale getirilmiştir.

Tüm yıkama ve temizleme işlemleri sırasında annular kromatograf 2.5 devir/saat hızla döndürülmüştür. Yataktaki basınç düşmesi nedeniyle karşılaşılan taşmayı önlemek amacıyla, annular kromatografin kafası Şekil 4.4'de gösterildiği gibi hava ile basınçlandırılmıştır. Yataktaki sıvı seviyesinin, Bölüm 4.2.2. "Annular Kromatografda Partikül Yatağının Sabit Faz ile Doldurulması" kısmında açıklanan yatağın üstündeki cam boncukların oluşturduğu bant içinde tutulması için Sekil 4.4'de gösterilen rotametrenin iğne vanasına elle kumanda edilerek sisteme verilen havanın hızı ayarlanmıştır.

5.2.3. Spektrofotometrik yöntemle bovin serum albumin (BSA) konsantrasyon tayini için çalışma eğrisinin hazırlanması

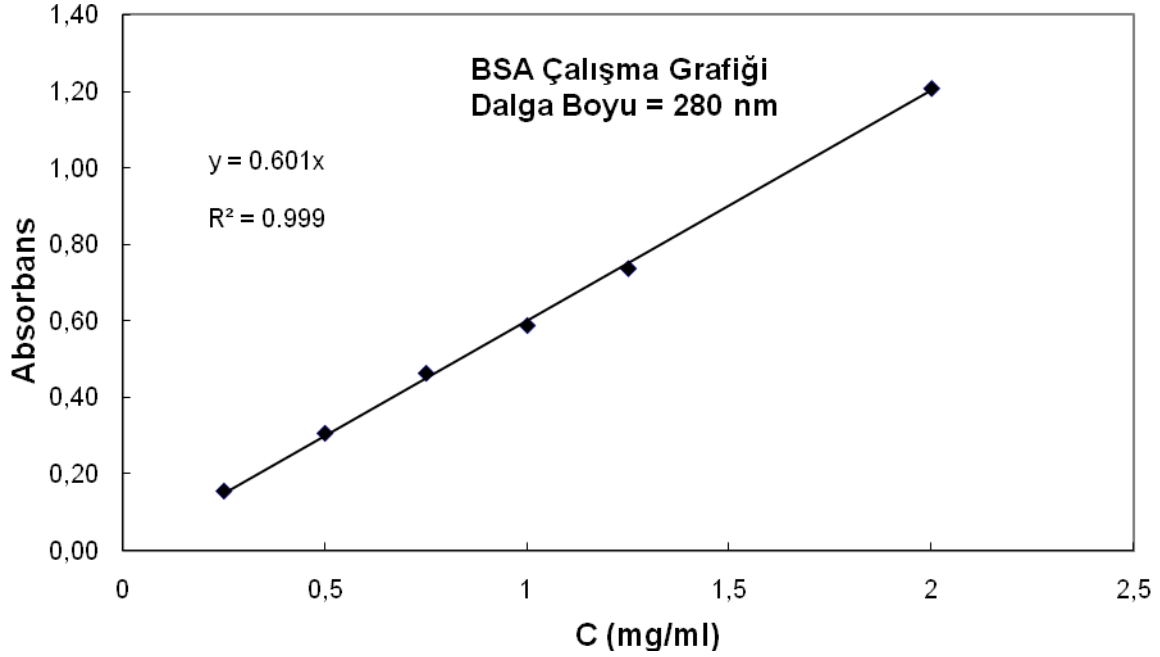
Sulu çözeltilerde protein konsantrasyonu tayini ve bu bağlamda BSA konsantrasyonu tayininde kullanılan yöntemlerden biri de UV spektroskopisidir (Olson ve Markwell et al., 2007; Lai et al., 2008; Lozzi et al., 2008). Bu çalışmada Cole-Parmer (A.B.D) 2100 UV series spektrofotometre yardımıyla ticari olarak satılan bir BSA için (0332-biotech grade - Amresco Inc., A.B.D.) maksimum absorpsiyona karşı gelen dalga boyu 280 nm olarak tesbit edilmiştir. Çizelge 5.3'de özellikleri verilen bu BSA, tezin geri kalan kısmında BSA-Amresco olarak adlandırılacaktır.

Çizelge 5.3. Üretilen BSA ile karşılaştırılacak ticari BSA'nın özellikleri

Albumin, Bovine	Biotechnology Grade
Üretici:	Amresco Inc., A.B.D.
Ürün Kodu:	0332
Projede Verilen Kod Adı:	BSA-Amresco
DNase(P/F)	Yok
Ağır Metaller, Pb olarak (%)	≤ 0.001
Demir(%)	≤ 0,0005
Kurutma kaybı (%)	≤ 5,0
pH (% 5 lik sulu çözelti) 25C	6,5-7,5
Protease(P/F)	Yok
Safiyet (%)	> 98,0
RNase(P/F)	Yok

UV spektroskopisi ile konsantrasyon tayini deneylerde kullanılan tüm BSA çözeltilerinin hazırlanmasında 20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl tamponu (pH = 7.1) kullanılmıştır. Daha sonra BSA-Amresco kullanarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA çözeltilerinin 280 nm dalga boyundaki absorpsiyonları ölçülmüştür. Absorpsiyon ölçümlerinde ışık yolu genişliği 1 cm olan kuvars küvet kullanılmıştır. Okunan absorpsiyona karşılık gelen konsantrasyon değerleri grafiğe geçirilerek Şekil 5.4'de verilen BSA konsantrasyon tayini çalışma eğrisi elde edilmiştir. Yapılan ölçüm aralığında, absorpsiyon ile konsantrasyon arasında lineer bir ilişki bulunduğu Şekil 5.4'de açıkça görülmektedir.

Daha sonra "5.2.1 Beslemenin Hazırlanması" kısmında açıklanan serum 1/50 oranında 20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl tamponu (pH = 7.1) ile seyreltilerek 280 nm dalga boyunda absorpsiyonu okunmuş ve Şekil 5.4'deki çalışma eğrisinden yararlanarak AC ye beslenecek olan seyreltilmemiş serumdaki BSA konsantrasyonu 63.56 mg/mL olarak tayin edilmiştir.



Şekil 5.4. BSA çalışma grafiği.

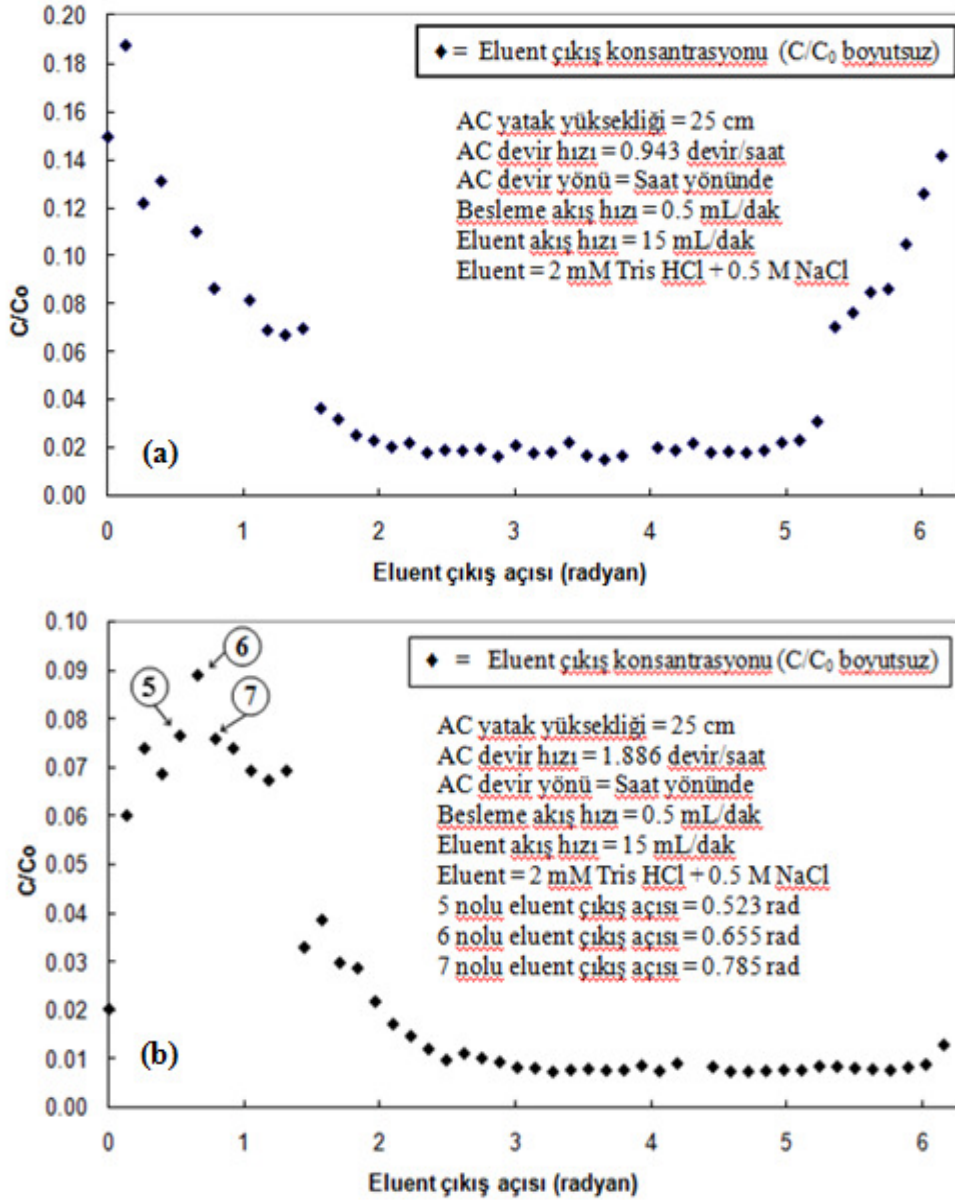
5.2.4. Annular kromatograf cihazı ile serumdan BSA ayrılması ve saflaştırılması

Annular Kromatograf ile sığır kan serumundan BSA'nın ayrılması ve saflaştırılması amacıyla Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'de fotoğrafları verilen, tasarımı yapıлып, imal ettirilen döner annular kromatograf cihazı kullanılmıştır. Bildiğimiz kadarıyla bu cihaz ülkemizdeki tek örneğidir.

BSA ayırma ve saflaştırılması amacıyla, ilk olarak tezin "4.2.2. Annular Kromatografte Partikül Yatağının Sabit Faz ile Doldurulması" kısmında açıklandığı şekilde Q Sepharose XL (GE Healthcare Bio-Sciences AB, İsveç) iyon değiştirici reçine cihazın iç ve dış silindirleri arasında kalan yatak bölgesine doldurulmuştur. Daha sonra Q Sepharose XL reçinesi ile doldurulmuş (packed) annular kromatograf, prosedüre uygun şekilde yatak yıkanmış ve şartlandırılmıştır. Yatak yıkama ve şartlandırma işlemi her deneyden önce tekrarlanmıştır.

Annular Kromatografi deneylerinde, besleme olarak sığır kan serumu kullanılmıştır. Deneylerde elüent olarak 20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl tamponu (pH = 7.1) kullanılmıştır. Bunları takiben besleme akış hızı olarak 0.5 mL/dak, elüent akış hızı olarak 15 mL/dak seçilmiştir.

Bu seçim sırasında Annular Kromatografıta taşma olmaması önemli bir kriter olarak göz önüne alınmıştır. Farklı konumlarda yatağı terk eden elüent çözeltileri Şekil 4.4 ve 4.5'de gösterilen şişelerde (cihazda 48 adet elüent çıkışı bulunduğundan 48 şişede) toplanmıştır.



Şekil 5.5. Annular kromatografda elüent çıkış konsantrasyonunun açısal değişimi: (a) devir hızı = 0.943 devir/saat, (b) devir hızı = 1.886 devir/saat.

Şişelerdeki elüent BSA konsantrasyonu, 280 nm dalga boyunda ölçülen UV absorpsiyon değerinden, Şekil 5.4.'deki çalışma eğrisi yardımıyla bulunmuştur. Ayrıca spektrofotometrik yöntemle bovin serum albumin (BSA) konsantrasyon tayini için hazırlanan çalışma eğrisinden (Şekil 5.4), beslemedeki BSA konsantrasyonu 63.56 mg/mL olarak tayin edilmiştir.

Şekil 5.5.'de elüent çıkış konsantrasyonunun açısal değişimine, annular kromatograf yatak dönüş hızının etkisi verilmiştir. Şekil 5.5(a)'da, elüentteki içerisinde safsızlık bulunan BSA pikinde, BSA konsantrasyonunun, iki bölgede geri kalan bölgelere göre daha yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Birinci bölgenin çıkış açısı aralığı yaklaşık $0 - 1.5$ radyan ($0 - 0.48 \pi$) olup, ikinci bölgenin çıkış açısı aralığı ise yaklaşık $5.36 - 6.28$ radyan ($1.71 \pi - 2 \pi$) dir. Yüksek BSA konsantrasyonuna sahip olan bu iki bölge, besleme konumunun hemen iki yanında yer almakta ve böylece bir tek BSA pikinin iki yanını oluşturmaktadırlar. Bunun nedeni annular kromatograf dönüş hızının yavaş olmasından dolayı açısal yöndeki dispersiyonun daha belirgin şekilde gözlenmesi ve bu dispersiyona bağlı olarak pikin besleme konumunun iki yanına sarkmasıdır. Bu gözlemi, Şekil 5.5(b).'deki deney sonuçları doğrulamaktadır. Burada geri kalan tüm şartlar aynı tutularak, annular kromatograf dönüş hızı iki misli artırılmıştır (1.886 devir/saat). Bu durumda içerisinde safsızlık bulunan BSA piki, yatağın dönüş hızının artmasına bağlı olarak yer değiştirmiş, daha yüksek açılı bir konumda her iki yanıyla birlikte bir bütün olarak yer almıştır. Annular kromatograf dönüş hızının artması sonucunda, açısal dispersiyondan kaynaklanan ve açısal yönde ilerleyen kütle aktarımına daha az süre tanınması sonucu olarak, bu tür dispersiyonun etkisinin toplam aktarım içerisinde azalması beklenir. Şekil 5.5(b)'de 6.28 radyan (2π) dolaylarında gözlenen BSA konsantrasyonunun, Şekil 5.5(a)'da verilen aynı konumdaki değere göre çok düşük olması bu beklentiyi doğru çıkartmaktadır. Bununla beraber Şekil 5.5(b)'nin 6.28 radyan (2π) dolaylarındaki çıkış elüent konsantrasyonlarında az da olsa giderek bir artma gözlenmektedir. Bu durum, açısal dispersiyon etkisinin, küçük bir oranda, yüksek devir hızlarında da ortaya çıkması olarak değerlendirilmiştir.

5.2. Elde Edilen Bovin Serum Albuminin (BSA) Karakterizasyonu

Şekil 5.5 (b).'de gösterilen 6 nolu şişedeki elüentin BSA konsantrasyonu 5.67 mg/mL olarak ölçülmüştür. Bu şişeden alınan 50 mL örnek dondurularak kurutulmuştur. Bu amaçla Martin Christ, model: Alpha 2-4 LD dondurarak kurutma cihazı (Almanya) kullanılmıştır. Dondurularak kurutulacak olan çözelti önce -20 °C ta bir gece derin dondurucuda bekletilmiş, daha sonra 3 gün süreyle dondurularak kurutulmuştur. Bu şekilde elde edilen katı haldeki BSA nın karakterizasyonu için, 6 nolu şişedeki BSA içeren elüent çözeltisinin HPLC spektrumu çekilmiştir. Ayrıca annular kromatografi

cihazına beslenen sığır serumundan alınan 30 mL numune de dondurularak kurutulmuştur.

5.3.1. Gözle muayene

Tez kapsamında sığır kan serumundan başlanılarak son basamak olan annular kromatografi cihazında sürekli bir şekilde ayrılıp saflaştırılan ve dondurularak kurutulan BSA nın; ticari BSA ve besleme ile karşılaştırmalı fotoğrafı Şekil 5.6.'da verilmiştir. Şekil 5.6.'daki görüntüler, sürekli kromatograf ile yapılan ayırmanın başarısına işaret etmekle birlikte, aşağıda açıklanan kimyasal karakterizasyon deneyleri de yapılarak bu durumun doğrulanması yoluna gidilmiştir.

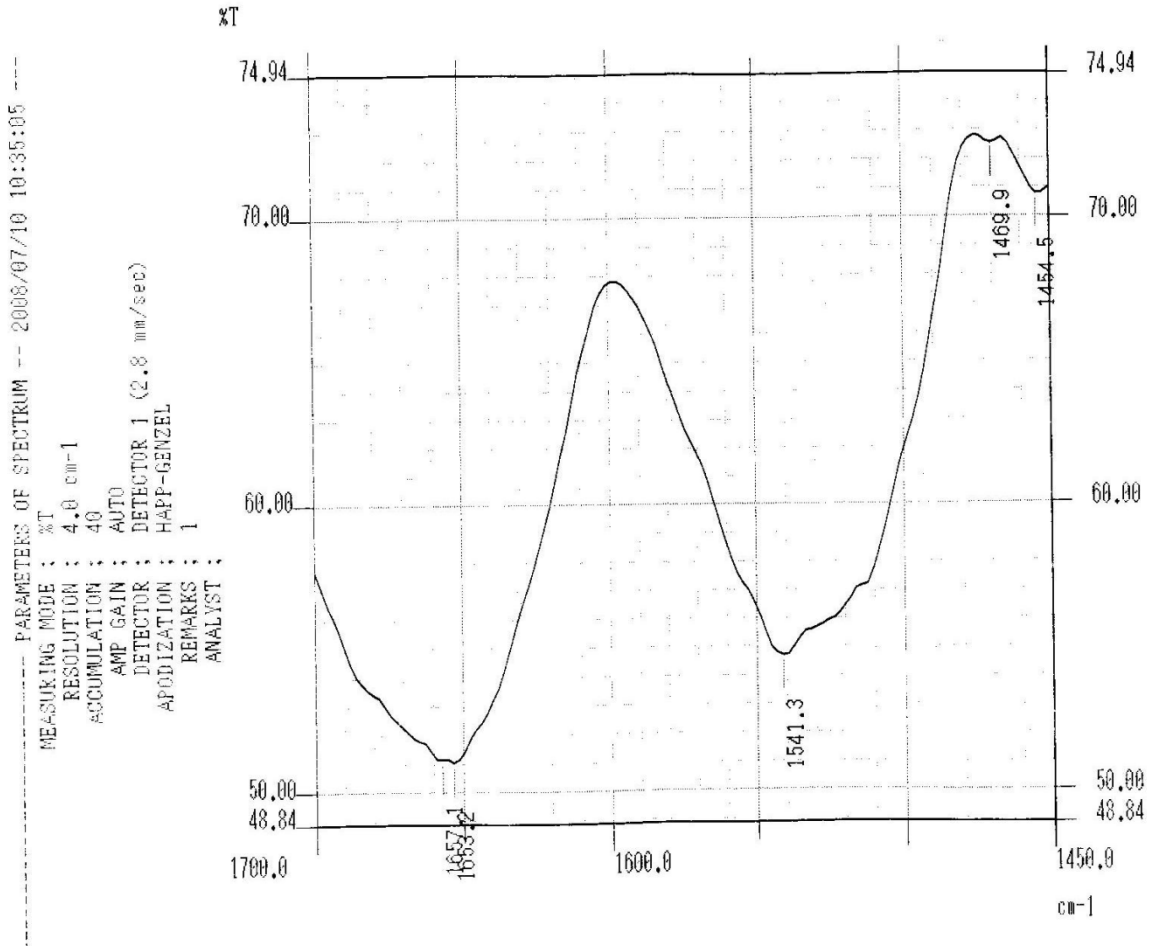


Şekil 5.6. BSA içeren üç örneğin fotoğrafları: (a) Tablo 2 de özellikleri verilen en az % 98 safiyetteki ticari BSA (Amresco Inc., A.B.D.), (b) Annular kromatografi cihazına beslenen ve “5.2.1. Beslemenin Hazırlanması” kısmında açıklandığı şekilde muamele gören sığır kan serumunun dondurularak kurutulduktan sonraki görünümü, (c) Tez kapsamında sığır kan serumundan başlanılarak son basamak olan annular kromatografi cihazında sürekli bir şekilde ayrılıp saflaştırılan ve dondurularak kurutulan BSA nın görünümü.

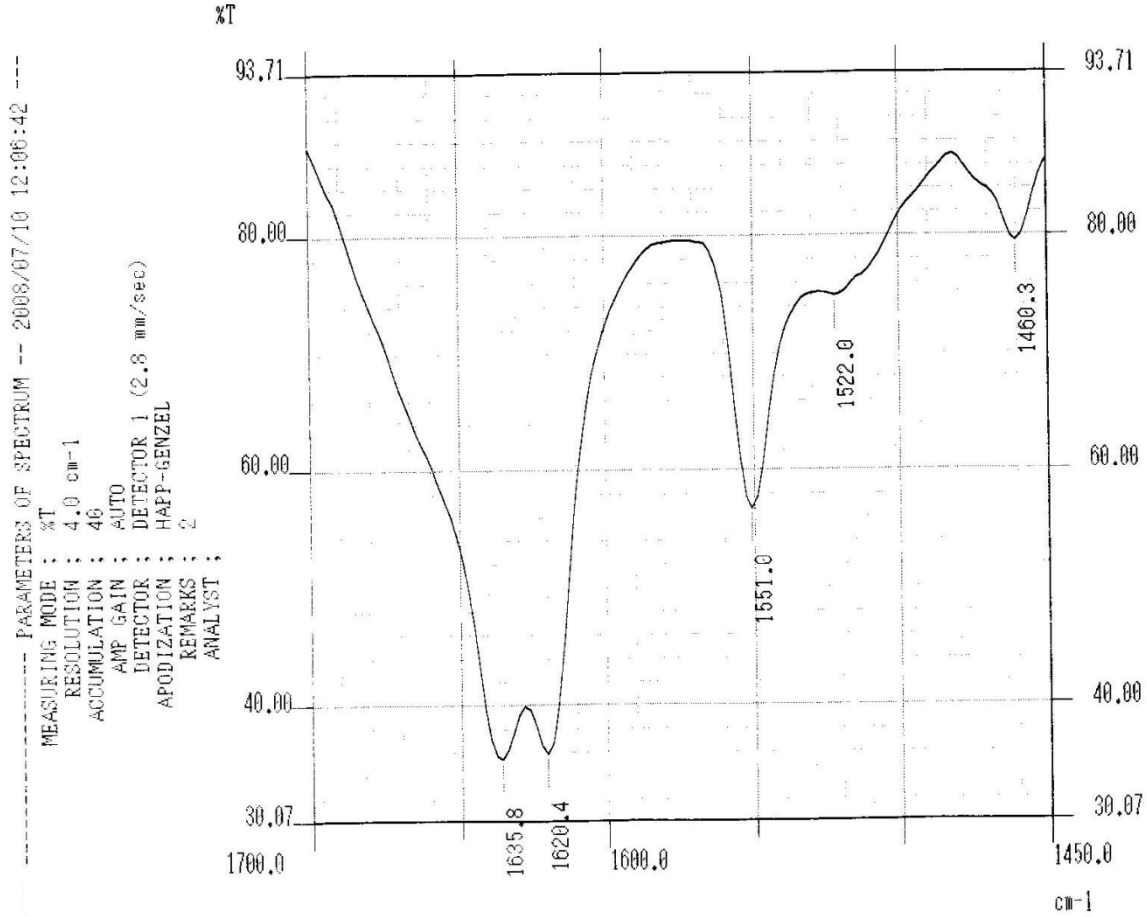
5.3.2. FTIR spektroskopisi

Proteinlerin kimyasal kompozisyonlarının ve konformasyonlarının karakterizasyonunda Amid I ve Amid II bantlarının (1700 – 1500 cm^{-1}) Infrared spektrumu (IR) çok sıkça kullanılmaktadır. Özellikle Amid I (1690 – 1620 cm^{-1}) bantı, peptit bağının karbonil stretching vibrasyonundan oluştuğu için, tam bir vibrasyonel karakter sergiler. Bu nedenle Amid I bandı, protein yapı çalışmalarına dair değerlendirme sırasında, yaygın bir uygulama potansiyeline sahiptir (Fabian ve Mantale, 2002; Ferrer et al., 2008).

Çizelge 5.3'de özellikleri verilen en az % 98 safiyetteki ticari BSA'nın (Amresco Inc., A.B.D.) ve tez kapsamında sığır kan serumundan başlanılarak son basamak olan annular kromatografi cihazında sürekli bir şekilde ayrılıp saflaştırılan ve dondurularak kurutulan BSA'nın Amid I ve Amid II aralığında çekilen FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 5.7. ve Şekil 5.8.'de verilmiştir. Böylece, iki BSA'nın karşılaştırılması amaçlanmıştır. Her iki örneğe ait spektrumlardan görüldüğü gibi kuvvetli Amid I bantı ile birlikte gözlenen Amid II absorpsiyon bantının varlığı, BSA'yı açıkça karakterize etmektedir. Amid I bölgesinde ortaya çıkan absorpsiyon (1/transmisyon) pikleri arasındaki fark, proje kapsamında elde edilen BSA'nın ticari BSA'ya göre daha yüksek safiyette olduğu hakkında ipucu vermektedir. Benzer bir izlenime "5.3.1. Gözle Muayene" kısmında verilen görüntülere bakarak da ulaşmak olasıdır. Bu konuda daha kesin bir sonuca varabilmek için bir sonraki kısımda her iki BSA'nın HPLC kromatogramları karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.7. Ticari BSA'nın (Amresco Inc., A.B.D.) Amid I ve Amid II bölgesindeki FTIR spektrumu



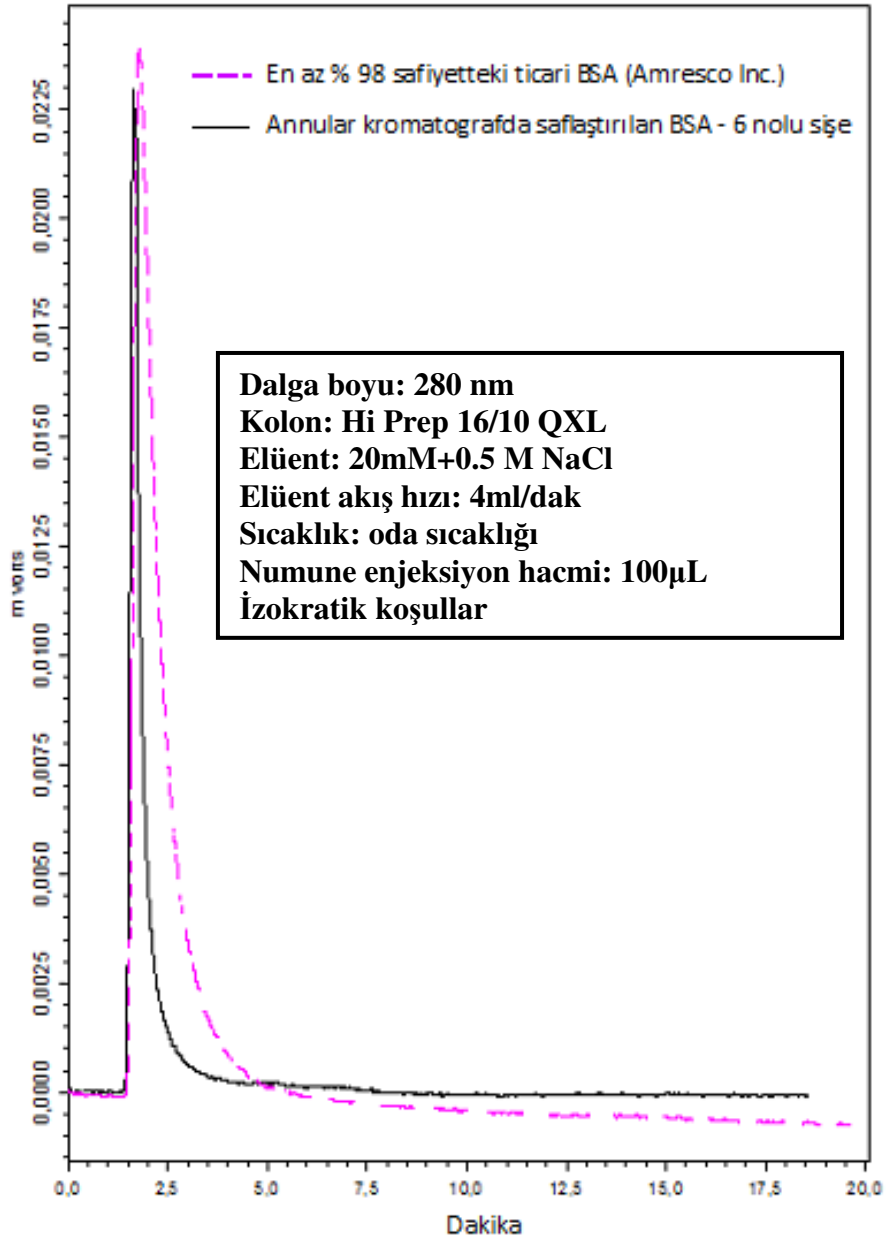
Şekil 5.8. Tez kapsamında sığır kan serumundan başlanılarak son basamak olan annular kromatografi cihazında sürekli bir şekilde ayrılıp saflaştırılan BSA'nın Amid I ve Amid II bölgesindeki FTIR spektrumu

5.3.3. Ticari BSA (Amresco Inc., A.B.D.) ile annular kromatografi cihazında saflaştırılan BSA'nın safiyetinin karşılaştırılması: HPLC kromatogramları

Bu kısımda; prospektüsünde en az % 98 safiyette olduğu belirtilen ticari BSA (Amresco Inc., A.B.D.) ve tez kapsamında saflaştırılan BSA'nın HPLC kromatogramlarının incelenmesi ile, bunların safiyet açısından karşılaştırılmaları amaçlanmıştır. Deneyde Shimadzu (Japonya) HPLC cihazı ve UV dedektör (SPD-10AV) kullanılmıştır. HPLC kolonu olarak HiPrep 16/10 Q XL (GE Healthcare, İsveç) kolonu seçilmiştir. Bu kolon protein tutulması, enzim, protein ve peptinlerin anyon değiştirici kromatografi ile saflaştırılmasında yüksek bağlama kapasitesi nedeniyle

yaygın şekilde kullanılmaktadır (Chen ve Wang, 2004; Chen ve Hopper 2005). HiPrep 16/10 Q XL kolon bilgileri Çizelge 5.2.'de verilmiştir. Tez kapsamında saflaştırılan BSA numunesi olarak, Şekil 5.5(b)' de gösterilen 6 nolu şişede toplanan elüent kullanılmıştır. Spektrofotometrik yöntemle bu şişedeki elüentin BSA konsantrasyonu 5.67 mg/mL olarak ölçülmüştür. Tez kapsamında saflaştırılan BSA'nın HPLC kromatogramına ek olarak ticari BSA'nın 20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl tampondaki çözeltisinin HPLC kromatogramı da çekilmiştir. Bu ikinci numunenin konsantrasyonu, birinci numune kromatogramı ile karşılaştırmak amacıyla, 5.67 mg ticari BSA/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Her iki numunenin HPLC kromatogramı 4 mL/dak elüent akış hızında (elüent: 20 mM Tris-HCl + 0.5 M NaCl tamponu; numune enjeksiyon hacmi 100 µL) izokratik koşulda çekilmiştir.

Şekil 5.9'da tez kapsamında saflaştırılan BSA ve ticari BSA (Amresco Inc., A.B.D.) HPLC kromatogramları verilmiştir. Bu şekil, doğrudan inek kanından çıkılarak laboratuvarımızda elde edilen BSA'nın, % 98 safiyette olduğu belirtilen ticari BSA'dan (Amresco Inc., A.B.D.) çok daha saf olduğunu açıkça göstermektedir.



şekil 5.9. Tez kapsamında saflaştırılan BSA ve ticari BSA (Amresco Inc., A.B.D.) HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması.

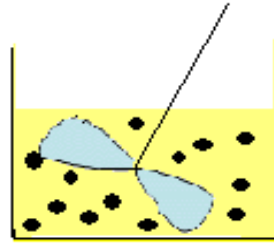
6. ANNULAR KROMATOGRaftA SAFLAŞTIRILAN BSA İÇİN SİMÜLASYON ÇALIŞMALARI

BSA saflaştırılmasına yönelik deneysel çalışmaların simülasyonu amacıyla döner kromatograf için modifiye edilen non-equilibrium model ifadelerinin türetilmesine, “3.5 Sürekli Annular Kromatograf Sistemi için Denge-dışı Modelin Modifikasyonu” bölümünde yer verilmiştir. Model parametrelerinden biri olan, annular kromatografda BSA adsorpsiyonunda kullanılacak olan “Q Sepharose XL” anyon değiştirici adsorbent sistemi için homojen difüzyon katsayısı, D_s bulunmuştur. Homojen (katı) difüzyon katsayısı, D_s değerinin bulunmasında, tarafımızca geliştirilen denge dışı (non-equilibrium) yaklaşımına dayanan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Batch sistemde karıştırmalı kaplarda (batch uptake) elde edilen deney sonuçları, bu yeni yöntem yardımıyla değerlendirilerek BSA ve annular kromatografda kullanılacak olan “Q Sepharose XL” anyon değiştirici adsorbent sistemi için homojen (katı) difüzyon katsayısı, D_s değeri bulunmuş ve tezin bu bölümünde sunulmuştur.

6.1. Homojen (Katı) Difüzivitesi Katsayılarının Hesaplanmasında Yeni Bir Yöntem: Batch Sistemin (Batch Uptake) Denge Dışı Modellenmesi

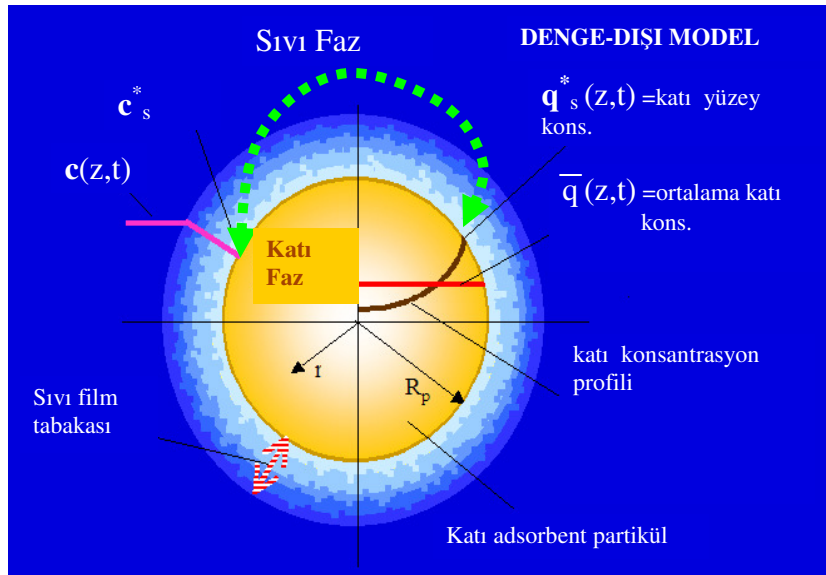
Bu bölümde, homojen (katı) difüzivitenin, D_s bulunmasına yönelik olarak Şekil 6.1’de şematik olarak gösterilen batch uptake deneylerinin matematiksel modellemesine yer verilmiştir. Batch sistemde k_f ve D_s değerinin bulunması için halen yaygın olarak kullanılan yöntemde (Weaver ve Carta, 1996; Hunter ve Carta, 2000; McCue et al., 2003) önce belirli bir karıştırma hızı için film kütle aktarım katsayısı, k_f (cm/s) bulunmaktadır. Bu şekilde elde edilen k_f değeri model ifadelerde yerine konularak, farklı D_s değerlerine (k_f nin hesaplandığı karıştırma hızı sabit tutularak) karşı gelen karıştırmalı kap konsantrasyonun zamanla değişim profilleri tahmin edilmektedir. Sonuçta, deneysel verilerle karşılaştırıldığında en uygun profilin elde edildiği D_s değeri partikül iç direncini temsil eden difüzivite değeri olarak alınmaktadır. D_s nin elde edilmesinde, yüksek çözelti konsantrasyonuna dayalı deneysel verilerin model sonuçları ile karşılaştırılması yapılmaktadır. Bunun nedeni, batch uptake sırasında düşük çözelti konsantrasyonu ile yapılan deneylerde kütle aktarımını kontrol eden basamağın film direnci, yüksek konsantrasyonlu çözeltilerde ise partikül içi direnç olmasıdır (Hunter ve Carta, 2000). Bu araştırmada, D_s değerinin bulunmasında,

temel olarak benzer bir metodoloji izlenmekle birlikte tarafımızca geliştirilen denge dışı (non-equilibrium) yaklaşımına dayanan yeni bir yöntemden yararlanılmıştır.



Şekil 6.1. Batch sistem deneylerinin (batch uptake) şematik gösterimi

Şekil 6.2.'de görüldüğü gibi denge-dışı modellemede adsorbent yüzeyindeki sıvı konsantrasyonu, c_s^* ile adsorbent yüzeyindeki katı konsantrasyonunun, q_s^* dengede olduğu kabul edilir. Diğer bir deyimle yalnızca katı-sıvı ara yüzeyinde denge vardır. Bunun haricinde sistem denge-dışı (non-equilibrium) konumdadır ve ancak partikül tamamen doygunluğa ulaştıktan sonra denge-dışı durum bozulur ve dengeye ulaşılır.



Şekil 6.2. Denge dışı modelleme, c_s^* ile q_s^* dengede olduğu durum

Literatürde, katı moleküllerin gözenekli adsorbent içerisine difüzyonunu açıklayan gözenek difüzyonu, yüzey difüzyonu, homojen difüzyon, paralel difüzyon gibi birçok model vardır (Chang ve Lenhoff, 1998; Chen et al., 2002; Tscheliessnig et al., 2005). Homojen difüzyon modeli, partikül içerisinde bulunan çözünen maddenin (solute)

tamamını (ister partikül gözeneklerindeki çözelti içinde bulunsun, isterse partikülün katı fazına adsorbe olsun) tek bir konsantrasyon değeri ile ifade eder. Partikül içindeki kütle aktarımını sağlayan sürücü kuvvetin, toplam katı konsantrasyonundaki gradiente bağlı olduğu varsayılır. Literatürde BSA için, homojen difüzyon modelinin anyon değiştiricilerde deneysel olarak elde edilen uptake hızlarını temsil etmekte diğer modellerden daha başarılı olduğu belirtilmiştir (Hunter ve Carta, 2002). Tez kapsamında yapılan deneylerde BSA adsorpsiyonu için kuvvetli bir anyon değiştirici olan “Q Sepharose XL” kullanılacağından, D_s nin hesaplanmasına yönelik batch sistem denge-dışı modellemede, homojen difüzyon modeli kabul edilmiştir.

6.1.1. Sıvı film kütle aktarım katsayısının bulunması

Hidrodinamik şartların farklı olması nedeniyle, her ne kadar batch tipi karıştırılmalı kap ve kolon deneylerindeki sıvı film kütle aktarım katsayıları, k_f birbirinden farklı ise de, bu kısımda belirli bir karıştırma hızında batch tipi karıştırılmalı kap deneyleri yardımıyla k_f nin bulunması açıklanacaktır. Bunun nedeni partikül içi kütle aktarım direncinin bir göstergesi olan homojen difüzyonun, D_s hesaplanabilmesi için k_f değerine ihtiyaç duyulmasıdır. Bilindiği gibi D_s değeri hidrodinamik şartlardan bağımsız olup partikül ve adsorplanan maddenin özelliklerine ve kimi zaman da adsorplanan maddenin konsantrasyonuna bağlı olan fiziksel bir özelliktir. Diğer bir deyişle, diğer tüm şartlar aynı iken yalnızca k_f değerinde gözlenecek bir değişiklik, söz konusu partikülün D_s değerini etkilemez.

Şekil 6.1.'de şematik olarak gösterilen ve batch olarak yapılan karıştırılmalı kap deneyleriyle (batch uptake) çalışma şartları için sıvı film kütle aktarım katsayısının, k_f bulunması için Eş. 6.1'den yararlanılır (Ruthven, 1984).

$$\frac{C}{C_0} = \exp\left(-\frac{m}{\rho_p V} \frac{3}{R_p} k_f t\right) \quad (6.1)$$

Burada V karıştırılmalı kaptaki çözelti hacmi (cm^3), t zaman (s), C herhangi bir t zamanındaki çözelti konsantrasyonu (mg/cm^3), C_0 karıştırılmalı kaptaki çözeltinin başlangıç konsantrasyonu (mg/cm^3), m karıştırılmalı kapta bulunan adsorbent miktarı

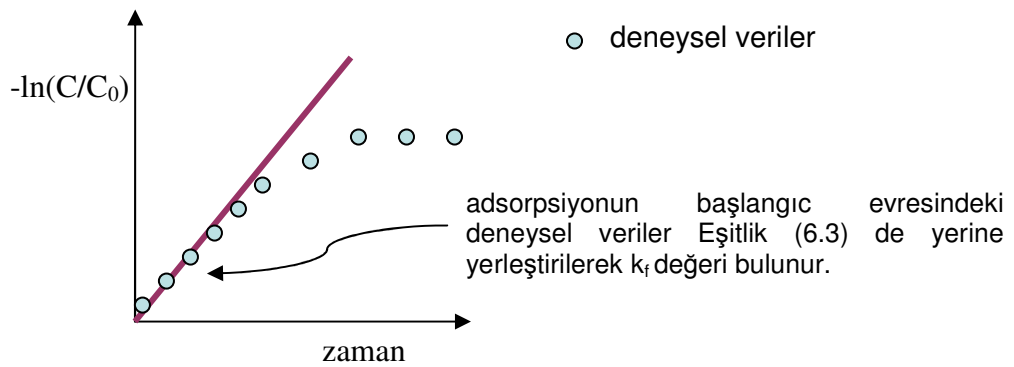
(g), ρ_p adsorbent yoğunluğu (g/cm^3), k_f film kütle aktarım katsayısı (cm/s), R_p ise partikül yarıçapıdır (cm). Bu ifadenin türetilmesi için aşağıdaki varsayımlar yapılır.

- Katının başlangıç konsantrasyonu sıfırdır
- Karıştırmalı kaptaki çözelti seyreltik olmalıdır, böylece adsorpsiyonun başlangıcında $C_s^* \approx 0$ kabulü geçerli olur.
- Adsorpsiyon sırasında, Eşitlik (6.2) ile gösterildiği gibi katı konsantrasyonunun zamanla değişimi, sıvı filmde olan kütle aktarımı göz önüne alınarak ifade edilebilir.

$$\frac{d\bar{q}}{dt} = k_f \frac{3}{R_p} (C - C_s^*) \quad (6.2)$$

Burada \bar{q} adsorbentin ortalama konsantrasyonu ($\text{mg}/\text{cm}^3_{\text{katı}}$), C_s^* ise ara yüzey sıvı film konsantrasyonudur (mg/cm^3). Eş. 6.1 yeniden düzenlenerek Eş. 6.3, elde edilir. Bu eşitliğin yardımıyla Şekil 6.3'de gösterildiği gibi k_f değeri elde edilir.

$$\ln \frac{C}{C_0} = -\frac{m}{\rho_p V} \frac{3}{R_p} k_f t \quad (6.3)$$



Şekil 6.3. Batch uptake deneylerinden k_f değerinin hesaplanması

6.1.2. Homojen difüzyon katsayısının bulunması

Bu araştırmada, D_s değerinin bulunmasında, temel olarak literatürde verilen ve Bölüm 6.1'de açıklanan metodolojiye benzer bir metodoloji izlenmektedir. Bununla birlikte, yaptığımız geniş literatür araştırması sonucunda, D_s değerlerinin denge dışı (non-equilibrium) yaklaşımla elde edilmesi hususu tarafımızca ileri sürülen yeni bir yöntemdir (Özdural ve diğerleri, 2004).

şekil 6.1'de gösterilen batch sistem karıştırmalı kap için, kütle denkliği yapılırsa:

$$V \frac{dC}{dt} = -m \frac{1}{\rho_p} \frac{d\bar{q}}{dt} \quad (6.4)$$

Eş. 6.2 ile katı konsantrasyonunun zamanla değişimi, sıvı filmde olan kütle aktarımı göz önüne alınarak ifade edilmiştir.

Denklem (6.2) denklem (6.4) de yerine koyulursa,

$$V \frac{dC}{dt} = -m \frac{1}{\rho_p} k_f \frac{3}{R_p} (C - C_s^*) \quad (6.5)$$

Eş. 6.5'de zaman (t) ifadesi tek bağımsız değişken olmakla beraber iki bağımlı değişken C ve C_s^* vardır. Denkliğin çözülebilmesi için C_s^* terimi C cinsinden ifade edilmelidir. Özdural ve diğerleri (2004), dolgulu kolonlarda Langmuir adsorpsiyon izotermine uyan sistemler için C_s^* ve C arasındaki bağıntıyı vermişlerdir. Denge dışı (non-equilibrium) koşullarda geçerli olan bu bağıntının, batch uptake sistemlerine adaptasyonu yapılırsa Eş. 6.6 elde edilir. Benzer analizler grubumuzca iyon değiştirici sistemler için de yapılmıştır (Özdural ve diğerleri, 2007).

$$C_s^* = \frac{-M + \sqrt{M^2 + \frac{4}{K_L} \left[C + \frac{5\bar{q}}{Bi} \right]}}{2} \quad (6.6)$$

Eş. 6.6'da görülen M terimi ise Eş. 6.7 ile verilmiştir.

$$M = \frac{5q_m}{Bi} - \frac{5\bar{q}}{Bi} + \frac{1}{K_L} - C \quad (6.7)$$

Langmuir izoterm ifadesi, Eş. 6.8 ile verilmiştir. Bu ifade dengenin yalnızca ara yüzeyde olduğu durum için yazılmıştır. Bu şekilde non-equilibrium koşulları ihlal edilmemiş olur.

$$q_s^* = \frac{q_m K_L C_s^*}{1 + K_L C_s^*} \quad (6.8)$$

Eş. 6.6, Eş. 6.5'de yerine koyulursa,

$$V \frac{dC}{dt} = -m \frac{1}{\rho_p} k_f \frac{3}{R_p} \left(C - \frac{-M + \sqrt{M^2 + \frac{4}{K_L} \left[C + \frac{5\bar{q}}{Bi} \right]}}{2} \right) \quad (6.9)$$

Eşitlik (6.9) elde edilir. Burada Bi ile boyutsuz Biot sayısı gösterilmiş olup, Eşitlik (6.10) ile Biot sayısı tarif edilmiştir.

$$Bi = \frac{k_f R_p}{D_s} \quad (6.10)$$

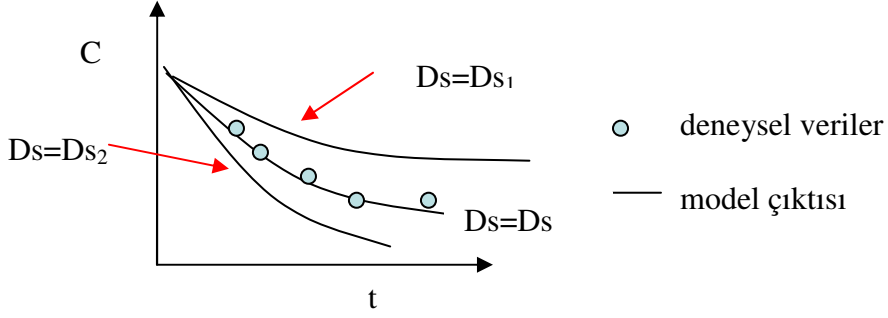
Eş. 6.9'da C_s^* terimi C cinsinden ifade edilmiş olmakla birlikte, bu yeni durumda da karşımıza zamana bağımlı ikinci bir değişken olan \bar{q} terimi çıkar. Aşağıda

açıklandığı gibi, \bar{q} terimi yapılan analize olumsuzluk olarak yansımaz. Bunun nedeni sayısal çözümleme sırasında \bar{q}_j ifadesinin (j indisi sayısal çözümde zaman için panel indisini göstermektedir) bir önceki zaman panelindeki \bar{q}_{j-1} değerinden aşağıda gösterilen kütle denklığı ifadesi ile bulunabilmesidir. Grubumuzca ileri sürülen ve sayısal çözümleme sırasında her adım aralığı için yeniden gerçekleştirilen kütle denklığına dayalı bu hesaplama yöntemine dayanan algoritmalar, adsorpsiyon ve iyon değiştirici kolonlardaki kütle aktarım ifadelerinin çözümünde de kullanılmıştır (Özdural ve diğerleri, 2004; Ben-Shebil ve diğerleri, 2007).

$$\bar{q}_j = \bar{q}_{j-1} + \frac{V\rho_p}{m}(C_j - C_{j-1}) \quad (6.11)$$

Artık, Eş. 6.9 bir bağımlı (C) ve bir bağımsız (t) değişkeni olan diferansiyel denklem olarak değerlendirilebilir.

Eş. 6.9'un çözümü, karıştırmalı kap konsantrasyonunun zamanla nasıl değiştiğini batch uptake için verir. Bu profili, dış kütle aktarım direnci ile ilgili olan k_f ve iç kütle aktarım direnci ile ilgili olan D_s (Biot sayısı ile verilen) değerleri (sisteme ait olan diğer parametrelerle birlikte) etkiler. Yukarıda açıklandığı gibi k_f değeri hesaplanır. Böylece yalnızca D_s nin karıştırmalı kap konsantrasyonunun zamanla olan değişimine etkisi (diğer tüm parametreler aynı tutularak) tahmin edilebilir. İç kütle aktarım direncinin etkin olduğu (Weaver ve Carta, 1996; Hunter ve Carta, 2000) yüksek tank başlangıç konsantrasyonu ile yapılan çalışmalarda, yukarıda açıklandığı şekilde elde edilen karıştırmalı kap konsantrasyonunun zamanla olan değişimi, deneysel verilerle karşılaştırılır. En uygun profilin elde edildiği D_s değeri partikül iç direncini temsil eden difüzivite değeri olarak alınır. Şekil 6.4 de bu işlem şematik olarak gösterilmiştir.



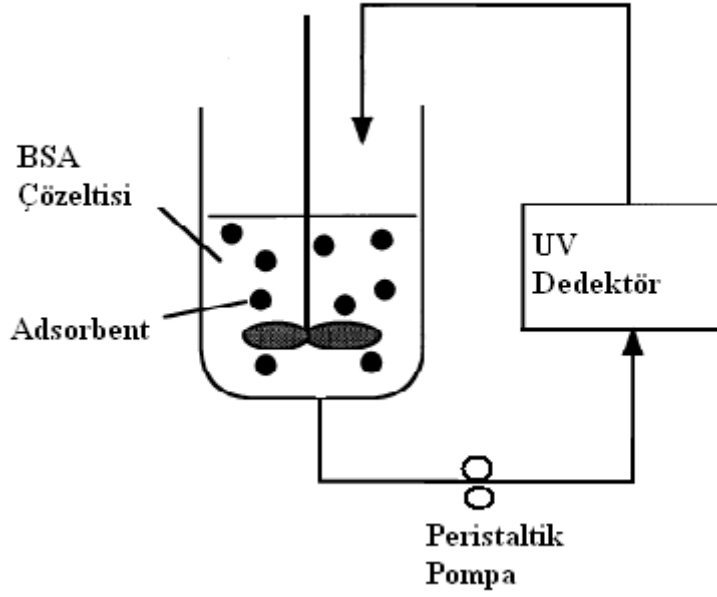
Şekil 6.4. Deneysel verilerle uyum sağlayan D_s değerinin model yardımıyla bulunması

6.2. Batch Adsorpsiyon Deneyleri

6.2.1. Materyal ve yöntem

Deneylerde kullanılan yüksek safiyetteki bovin serum albumin (BSA), Amresco (Lot No. 0186B022/0332, Ohio, ABD) firmasından temin edilmiştir. Adsorbent olarak, GE Healthcare (ABD) firması ürünü kuvvetli bir anyon değiştirici olan “Q Sepharose XL” (Lot no: 17-5072-01) kullanılmıştır.

Batch sistemdeki karıştırmalı kap adsorpsiyon deneylerinde kullanılan farklı başlangıç konsantrasyonundaki BSA çözeltileri saf su ile hazırlanmıştır. Tüm deneyler, 150 mL BSA çözeltisi ve 0.25 mL “Q Sepharose XL” ile sürekli karıştırılan kesikli kaptaki (tüm deneyler için aynı sabit hızda) oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çözeltilerin BSA konsantrasyon ölçümleri için UV/görünür bölge kromatografik dedektör (SunChrom SpectraFlow 501, Almanya) kullanılmıştır. Deney düzeneği Şekil 6.5’de şematik olarak gösterilmiştir. Karıştırmalı kaptaki BSA çözeltisi, peristaltik bir pompa yardımıyla (Cole-Parmer, ABD) UV/görünür bölge dedektöre sürekli olarak gönderilmekte, dedektör çıkındaki çözelti ise karıştırmalı kaba geri döndürülmektedir. Adsorbent partiküllerinin kromatografik dedektörü tıkama ihtimalini engellemek için dedektör girişine enjektör tipi 0.45 μ m lik membran filtre (Sartorius, Almanya) takılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, çalışma şartlarında BSA absorpsiyonu için en uygun UV ışık dalga boyunun 280 nm olduğu tesbit edilmiştir.



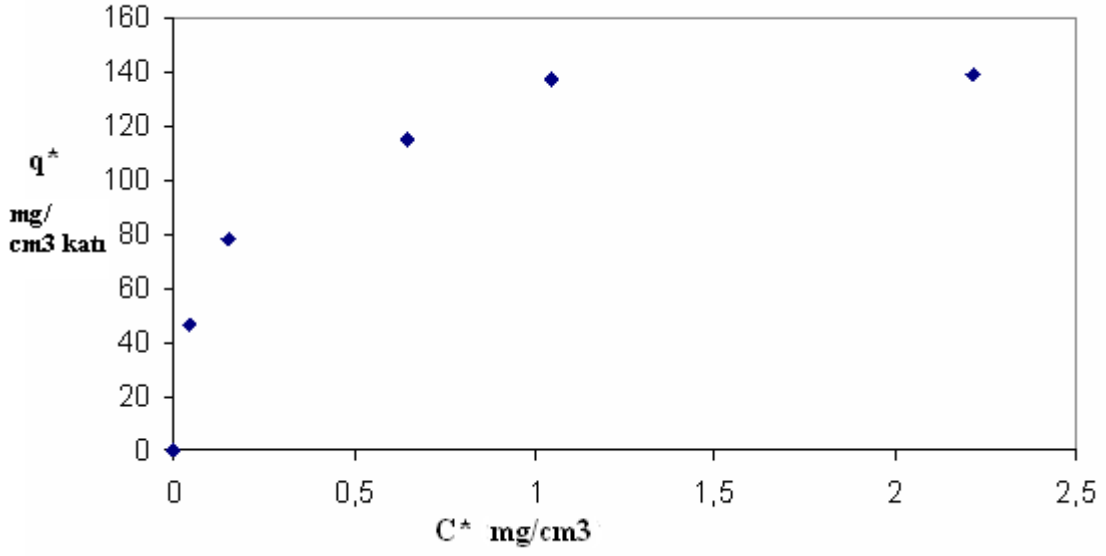
Şekil 6.5. Batch adsorpsiyon deneylerinin şematik görünümü

6.2.2. Langmuir izoterm sabitlerinin bulunması

Eş. 6.8'de partikül ve sıvı film ara yüzeyi için özel olarak yazılan Langmuir izotermini şimdi alışıldık şekliyle, yani sistemdeki partiküller ile bulk çözeltinin dengeye ulaşması için gereken süreden sonra (en az 3 saat) yapılan ölçümlere dayandırılan batch adsorpsiyon deney verileri için yazalım.

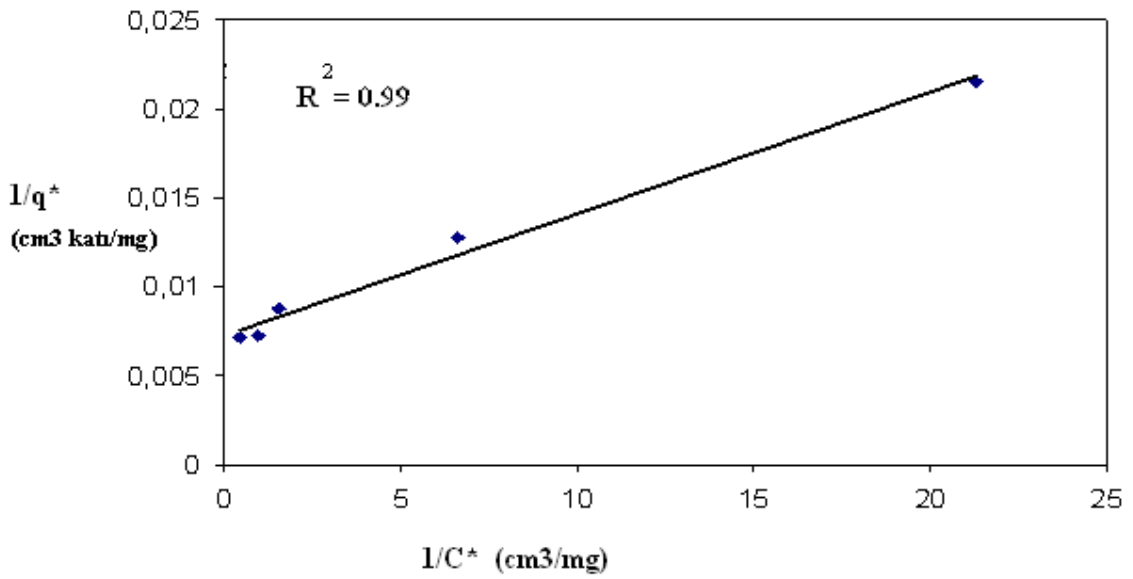
$$q^* = \frac{q_m K_L C^*}{1 + K_L C^*} \quad (6.12)$$

Burada q^* dengedeki katı konsantrasyonunu ($\text{mg/g}_{\text{katı}}$ veya $\text{mg/cm}^3_{\text{katı}}$), C^* dengedeki sıvı faz konsantrasyonunu (mg/cm^3), q_m maksimum adsorpsiyon kapasitesini ($\text{mg/g}_{\text{katı}}$ veya $\text{mg/cm}^3_{\text{katı}}$), K_L ise Langmuir sabitini (cm^3/mg) göstermektedir. Kullanılan anyon değiştiricinin yapısı nedeniyle, çalışmalarda q^* ve q_m in birimi olarak $\text{mg/cm}^3_{\text{katı}}$ tercih edilmiştir. Şekil 6.6'da deneysel olarak bulunan adsorpsiyon izoterm eğrisi gösterilmiştir.



Şekil 6.6. Deneysel olarak bulunan adsorpsiyon izoterm eğrisi

Şekil 6.6'da verilen izotermin, literatürde BSA adsorpsiyonu için sıklıkla kullanılan (Hunter ve Carta, 2000; Li et al., 2003; Chang et al., 2007) Langmuir tipi izoterme uyup uymadığını anlamak amacıyla Eş. 6.12 lineerleştirilmiştir. Şekil 6.7'de lineerleştirme sonucu elde edilen $1/q^*$ a karşı $1/C^*$ grafiği gösterilmiş ve korelasyon katsayısı, $R^2 = 0.99$ olarak bulunmuştur. Bunun sonucunda Langmuir tipi adsorpsiyon izoterminin kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.



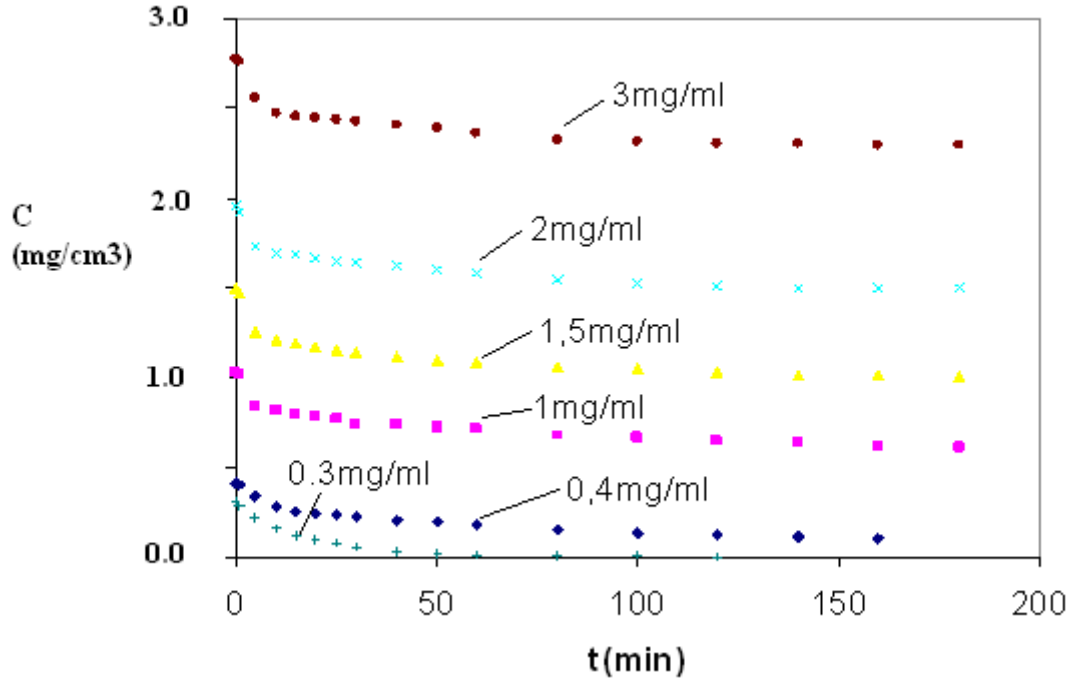
Şekil 6.7. Adsorpsiyon izoterm verilerinin lineerleştirilmesi

Şekil 6.7'de gösterilen ve deney verilerine en küçük kareler yöntemiyle uydurularak elde doğrunun y eksenini kesim noktası 0.0073, eğimi ise 0.0007 dir. Bu değerlerden yararlanılarak maksimum adsorpsiyon kapasitesi, $q_m = 136.98 \text{ mg/cm}^3_{\text{kati}}$, Langmuir sabiti, $K_L = 10.42 \text{ cm}^3/\text{mg}$ olarak bulunmuştur.

6.3. Kinetik Adsorpsiyon Deneyleri

Kinetik adsorpsiyon deneyleri olarak nitelenen bu kısımda, Şekil 6.5'de verilen deney düzeneği yardımıyla batch adsorpsiyon (uptake) deneyleri yapılmış ve karıştırılmalı kaptaki BSA konsantrasyonunun zamanla değişim grafikleri elde edilmiştir.

Bu grafikler, düşük başlangıç konsantrasyonunda k_f , yüksek başlangıç konsantrasyonunda ise D_s değerinin bulunmasında kullanılacaktır. Tüm deneyler, 150 mL BSA çözeltisi ve 0.25 mL "Q Sepharose XL" ile sürekli karıştırılan kesikli kaptaki, aynı sabit karıştırma hızında ve oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Çözelti başlangıç konsantrasyonları 3.0 – 2.0 – 1.5 – 1.0 – 0.4 – 0.3 mg/ml olacak şekilde altı değişik değerle deneyler yapılmıştır. Deneyler en az üç saat süreyle devam ettirilmiştir. Şekil 6.8'de farklı başlangıç konsantrasyonlardaki BSA çözeltileri için tanktaki çözelti konsantrasyonunun zamanla değişimi gösterilmiştir. Bu grafikten, nominal konsantrasyonu 3 mg/ml olarak hazırlanan çözeltinin ölçülen başlangıç konsantrasyonunun 2.8 mg/ml olduğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 6.8 hemen tüm başlangıç konsantrasyonları için yaklaşık olarak en fazla 3 saat sonra dengeye ulaşıldığını göstermektedir.



Şekil 6.8. Farklı başlangıç konsantrasyonlardaki BSA çözeltileri için tanktaki çözelti konsantrasyonunun zamanla değişimi

6.3.1. Film kütle aktarım katsayısı

Film kütle aktarım katsayısının deney verilerinden hesaplamasında Bölüm 6.1.1.'de verilen Eş. 6.3'den yararlanılmıştır. Aynı bölümde açıklanan ve Eş. 6.3'ün türetilmesi sırasında yapılan $C_s^* \approx 0$ varsayımının geçerli olması amacıyla, başlangıç konsantrasyonu en düşük olan deney sonuçları k_f hesaplamasında kullanılmıştır. Bu konsantrasyonun (0.3 mg/ml) yeteri kadar seyreltik olduğu hususu 0.4 mg/ml için yapılan hesaplamalarda k_f için önemli bir fark bulunmaması ile doğrulanmıştır. Şekil 6.9'da, Eş. 6.3'de gerek duyulan $-\ln(C/C_0)$ a karşı t grafiği (başlangıç konsantrasyonu = 0.3 mg/ml) deneyin ilk 50 dakikası için verilmiştir. Kullanılan iyon değiştiricinin jel benzeri yapısı nedeniyle karıştırılmalı kaba, belirli kütle yerine belirli hacimdeki adsorbent ilavesi tercih edilmiştir. Bu uygulama nedeniyle Eş. 6.3 aşağıdaki şekilde modifiye edilmiştir.

$$\eta = \text{adsorbent hacmi (cm}^3\text{)} = [m, \text{ adsorbent kütlesi (g)}] / [\rho_p, \text{ adsorb. yoğunluğu (g/cm}^3\text{)}]$$

$$-\ln \frac{C}{C_0} = \frac{\eta}{V} \frac{3}{R_p} k_f t \quad (6.13)$$

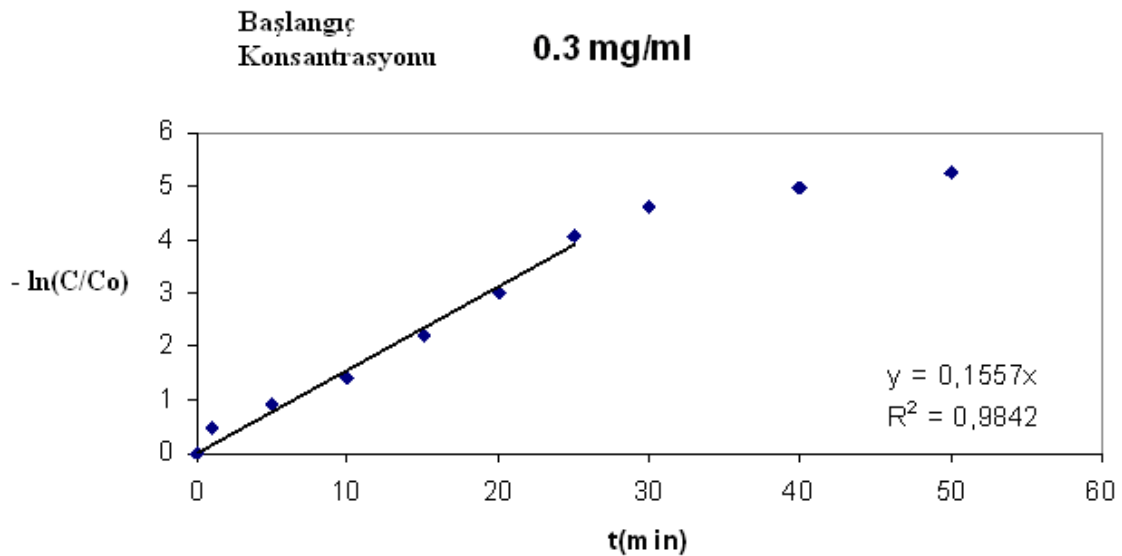
$$Egim = \frac{\eta}{V} \frac{3}{R_p} k_f \quad (6.14)$$

$$-\ln \frac{C}{C_0} = (Egim)t \quad (5.15)$$

Beklendiği gibi, başlangıçta $-\ln(C/C_0)$ a karşı t verileri doğrusal olarak değişmekte, daha sonra partikül doydukça $C_s^* \approx 0$ varsayımının geçerliliği kaybolmakta ve bir eğri elde edilmektedir. Şekil 6.9'da gösterilen lineer bölge için elde edilen eğim (0.1557) yardımıyla Eş. 6.14'den aşağıda gösterildiği şekilde

$$k_f = (0.1557) \cdot \frac{150\text{mL BSA}}{0.25\text{mL adsorbent}} \cdot \frac{52.5 \times 10^{-4} \text{ cm}}{3} \cdot \frac{1 \text{ dak}}{60 \text{ saat}}$$

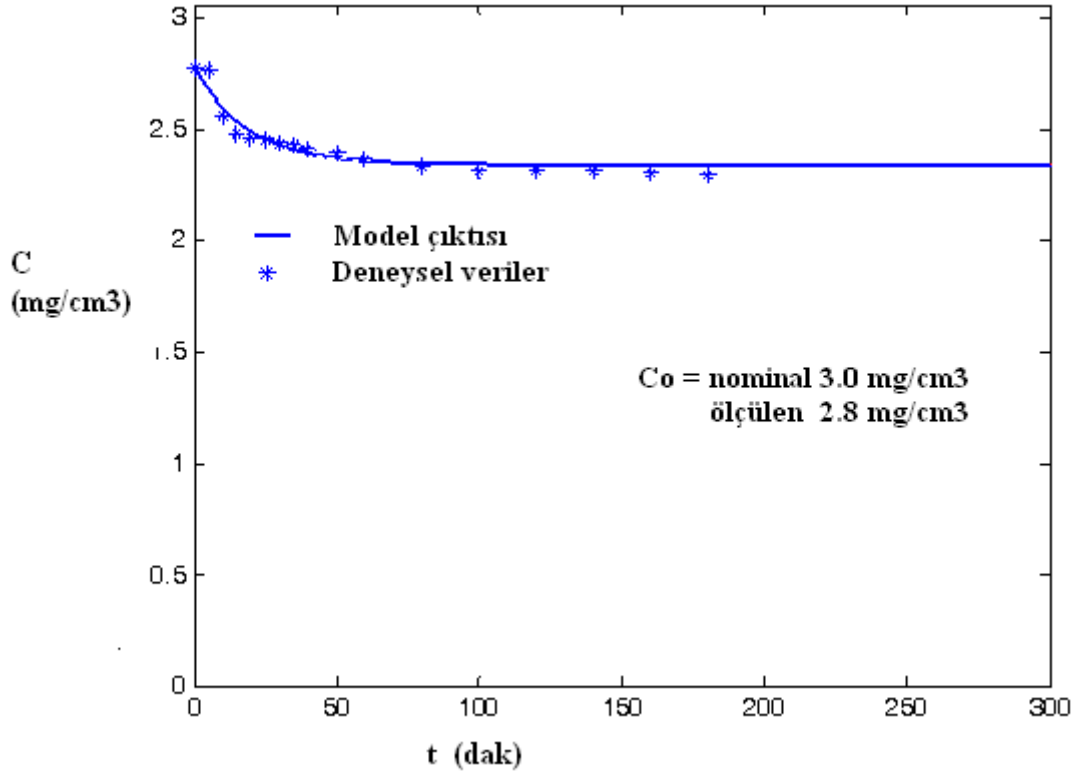
$k_f = 2.72 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ olarak bulunur.



Şekil 6.9. Batch sistem karıştırılmalı kapta $-\ln(C/C_0)$ 'a karşı zaman (t) grafiği. Başlangıç konsantrasyonu = 0.3 mg/ml

6.3.2. Homojen difüzyon katsayısı

Hesaplanan k_f değeri karıştırmalı kap için bulunmuştur. Hidrodinamik şartlarla yakından ilgili olan film kütle aktarım katsayısı annular kromatograf simülasyonunda kullanılmayacaktır. Bununla beraber Bölüm 6.1.2.'de açıklanan homojen difüzyon katsayısının, D_s bulunması sırasında, anılan bölümde belirtildiği gibi karıştırmalı kap için hesaplanan k_f değerine ihtiyaç vardır. Her ne kadar Bölüm 6.1.2.'de açıklanan yöntemle bulunan D_s değeri batch sistemde elde edildiyse de, bilindiği gibi partikül iç dirençleri ve bunun göstergesi olan D_s değeri çok büyük oranda hidrodinamik şartlardan bağımsızdır. Dolayısıyla batch sistemde bulunan D_s değerleri kolon sistemlerinde kullanılabilir. Bu amaçla k_f değerinin bulunması sırasında kullanılan parametreler (başlangıç konsantrasyonu hariç) yardımıyla, fakat farklı D_s değerleri için, Eş. 6.9 sayısal olarak çözülmüş ve elde edilen karıştırmalı kap konsantrasyonunun zamanla değişimini veren model çıktıları, deneysel olarak ölçülen değerlerle karşılaştırılmıştır. İç kütle aktarım dirençleri, partikülün doygunluğu artıkça adsorpsiyonu kontrol edici basamak haline geleceğinden, başlangıç konsantrasyonu en yüksek olan (nominal konsantrasyon = 3 mg/ml ölçülen değer = 2.8 mg/ml) deneysel çalışma bu kapsamda değerlendirilmiştir. Deneysel ölçümlerle en iyi uyumun gözlemlendiği model çıktı profilinde kullanılan D_s değeri homojen difüzyon katsayısı olarak alınmıştır. Şekil 6.10 da bu işlem gösterilmiştir. Sonuçta D_s değeri $1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sn}$ olarak tayin edilmiştir.



Şekil 6.10. Homojen difüzyon katsayısı hesaplanmasında model çıktısı ve deneysel verilerin karşılaştırılması

Hunter ve Carta (2002), akrilamido tabanlı bir polimerik anyon değiştirici olan BRX-Q (BioRad, ABD) reçinesinde BSA için homojen difüzyon katsayısını $D_s = 2.4 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ bulmuşlardır. BRX-Q anyon değiştiricisinin ortalama partikül çapı = 89 μm dir. Bu araştırmada kullanılan ve BRX-Q gibi bir anyon değiştirici olan Q Sepharose XL nin ortalama partikül çapı ise 105 μm dir. Bununla birlikte, Pedersen (2003), alışmasında Q Sepharose XL reçinesinin BSA adsorpsiyon kapasitesini incelemiş ve homojen difüzyon katsayısını $6.93 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplamıştır. Yukarıda açıklandığı gibi tarafımızca geliştirilen yeni bir yöntemle, homojen difüzyon katsayısı $D_s = 1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak tayin edilmiş olup literatür çalışmaları sonucu bulunan değerler ile uyum içerisinde dir.

6.4. Simülyasyonda Kullanılan Parametreler

Simülyasyon alışmalarında, Bölüm 6.2.2. Langmuir İzoterm Sabitlerinin Bulunması kısmında açıklanan ve çalışılacak sistem için deneysel olarak tesbit edilen değerler

kullanılacaktır. Q Sepharose XL iyon değiştirici için yatak porozitesi Pedersen ve diğerleri (2003) tarafından $\epsilon = 0.30$ olarak verilmiş olup, BSA nın Q Sepharose XL reğinesindeki homojen difüzyon katsayısı ise, Bölüm 6.3. Kinetik Adsorpsiyon Deneyleri kısmında deneysel olarak ($D_s = 1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{sn}$) hesaplanmıştır. D_s değeri, hidrodinamik şartlardan bağımsız, partikül ve adsorplanan maddenin özelliklerine ve kimi zaman da adsorplanan maddenin konsantrasyonuna bağlı olan fiziksel bir özellik olup, batch adsorpsiyon deneyleri sonucu bulunan D_s değeri kromatografik kolonlar için değişmemektedir. Bu nedenle, annular kromatografda Q Sepharose XL reçinesinin BSA adsorpsiyonu simülasyon çalışmalarında, batch adsorpsiyon deneylerinden bulunan D_s değeri kullanılmıştır. Homojen difüzyon katsayısından farklı olarak, sıvı film kütle aktarım katsayıları, k_f hidrodinamik şartlara bağlı olan bir parametredir. Batch tipi karıştırmalı kaplar ile kromatografik kolonlarda birbirinden çok farklı hidrodinamik şartların geçerli olması sebebiyle batch deneylerinden bulunan k_f değeri, annular kromatograf deneyleri için farklılık göstermektedir. Bu nedenle annular kromatograf simülasyon çalışmalarının önemli parametrelerinden biri olan sıvı film kütle aktarım katsayısı, annular kolonun hidrodinamik şartları esas alınarak hesaplanmıştır.

Q Sepharose XL yatağı için sıvı film kütle aktarım katsayısı, k_f (cm/s) ve eksenel difüzyon katsayısı, D_x (cm²/s) değerlerinin hesaplanmasında, sırasıyla Wilson ve Geankoplis (1966) ile Chung ve Wen (1968) tarafından ileri sürülen korelasyonlar kullanılmıştır. Eş. 6.16'da Wilson ve Geankoplis, Eş. 6.17'de ise Chung ve Wen korelasyonları gösterilmiştir.

$$Sh = 1.09(1/\epsilon) Re^{1/3} Sc^{1/3} \quad (6.16)$$

$$\epsilon Pe = 0.20 + 0.011 Re^{0.48} \quad (6.17)$$

$$Pe = \frac{(D_p v)}{D_x} \quad (6.18)$$

Sh = Sherwood sayısı ($D_p k_f / D_{ab}$), Re = Reynolds sayısı ($D_p u \rho / \mu$), Sc = Schmidt sayısı ($\mu / \rho D_{ab}$), Pe = Peclet sayısı ($D_p v / D_x$) olup, u = superficial lineer hız (0.0120 cm/s), v = interstitial lineer hız ($v = u / \epsilon$), D_p = partikül çapı, ρ = BSA çözeltisinin yoğunluğu (1.094 g/cm^3), μ = BSA çözeltisinin viskozitesi ($3.7 \times 10^{-2} \text{ g/cm.s}$), D_{ab} = BSA'nın sudaki difüzyon katsayısını ($6.81 \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$) göstermektedir.

Annular kromatografi sayısal çözümünde kullanılan, eksenel ve açısal yöndeki adım (panel) sayısı ile adım aralığı Courant sayısı (Cr) ve teorik tabaka eşdeğer yüksekliği ("Height equivalent to the theoretical plate", HETP) kavramları yardımıyla hesaplanmıştır.

Courant sayısı sayısal çözümlemede seçilen zaman aralığının, (Δt), probleme uygun olup olmadığının göstergesidir. Courant sayısının bire eşit olması ($Cr=1$), bir zaman basamağının, ağ aralığının hıza bölümüne eşit olması anlamına gelmektedir. Yani çözünen maddenin (solute) bir hücreyi geçmesi için gerekli olan süre kadarlık bir zaman diliminde hesap yapılacaktır. Genellikle Cr sayısı 0.5 ile 1 arasında değer alır. Bazı durumlarda ikiye kadar artan değerlerinin de kullanıldığı görülmektedir. Açık sonlu farklar (explicit finite difference) çözümlerinde Cr sayısı aynı zamanda bir kararlılık (stability) sınırlaması olup birini geçmemesi gerekmektedir. Bu nedenle, nümerik analiz için Cr sayısı 0.5 olarak seçilmiştir. Cr sayısı, kütle aktarımı ve enerjinin korunumu için türetilen kısmi diferansiyel denklemlerin sayısal çözümünde önerilen bir parametredir. Bu tarz çözümleme yönteminde, Cr sayısı ve adım aralığı sayısal parametreler olup program kullanıcısı tarafından belirlenmelidir (Young ve Jorgensen, 2004). Bu tanıma bağlı olarak annular kromatografi sistemi için eksenel ve açısal yönlerdeki Courant sayıları aşağıda ifade edilmiştir. Eşitliklerde, Δt terimi, Δx ve $\Delta \theta$ ifadesi ile gösterilen eksenel ve açısal panellerin aşılması için gerekli zamandır.

$$Cr_x = \frac{\Delta t_x \cdot v}{\Delta x} \quad (\text{Eksenel yöndeki Courant sayısı}) \quad (6.19)$$

$$Cr_\theta = \frac{\Delta t_\theta \cdot \omega}{\Delta \theta} \quad (\text{Açısal yöndeki Courant sayısı}) \quad (6.20)$$

1952 yılında Nobel ödüllü Martin ve Syngé tarafından ortaya atılan HETP kavramı günümüzde distilasyon, absorpsiyon, adsorpsiyon kolonları gibi birçok ayırma prosesinde kullanılmaktadır. Martin ve Syngé kromatografik kolonların seri halde bulunan ve iki faz arasında denge koşullarının hakim olduğu teorik plakalardan meydana geldiğini öne sürmüştür. Annular kromatografi kolonunun, belli sayıda ideal karıştırmalı ve denge koşullarının sağlandığı plakalardan meydana geldiği düşünülürse, döner kolonun teorik tabaka eşdeğer yüksekliği (HETP) kolon yüksekliğinin ideal karıştırmalı plaka sayısına bölümünden elde edilir. Annular kolon için eksenel ve açısai yönde türetilmiş HETP sayıları Eş. 6.21. ve 6.22. ile verilmiştir. Eşitliklerde, D_x eksenel dispersiyon katsayısı, D_θ açısai dispersiyon katsayısı ve ω açısai hız ifadeleridir.

$$[\text{HETP}]_x = \frac{2D_x}{v} \quad (\text{Eksenel yöndeki HETP sayısı}) \quad (6.21)$$

$$[\text{HETP}]_\theta = \frac{2D_\theta}{\omega} \quad (\text{Açısai yöndeki HETP sayısı}) \quad (6.22)$$

Plaka yaklaşımı, kolon boyunca iki faz arasında dengenin varolduğu yaklaşıma dayanması sebebiyle bant genişlemesini açıklamada yetersiz kalmaktadır. Kromatografik kolonlarda iki faz arasında dengenin sağlanması için belirli bir zaman geçmelidir, bu nedenle plaka varsayımı kolon içinde varolan dinamik durum göz önüne alındığında geçerliliğini yitirmektedir.

Annular kromatografi, nümerik analizinin kararlılığını sağlamak için belirlenmesi gereken, eksenel (Δx) ve açısai ($\Delta \theta$) yöndeki panel aralığı HETP ve C_r sayısına bağlı olarak aşağıda ifade edilmiştir.

$$\Delta x = \frac{[\text{HETP}]_x}{C_{r_x}} \quad (\text{Eksenel yöndeki panel aralığı, cm}) \quad (6.23)$$

$$\Delta \theta = \frac{[\text{HETP}]_\theta}{C_{r_\theta}} \quad (\text{Açısai yöndeki panel aralığı, rad}) \quad (6.24)$$

Annular kolon simülasyonu için aksenal yöndeki panel sayısı, annular kolon yüksekliğinin (L), aksenal panel aralıklığına (Δx) bölünmesi ve açısal yöndeki panel sayısı, annular kolonun bir tam dönmede katettiği yolun (2π), açısal panel aralıklığına ($\Delta\theta$) bölünmesinden elde edip, aşağıdaki eşitlikler ile gösterilmiştir.

$$\text{Eksenel yöndeki panel sayısı} = \frac{L}{\Delta x} \quad (6.25)$$

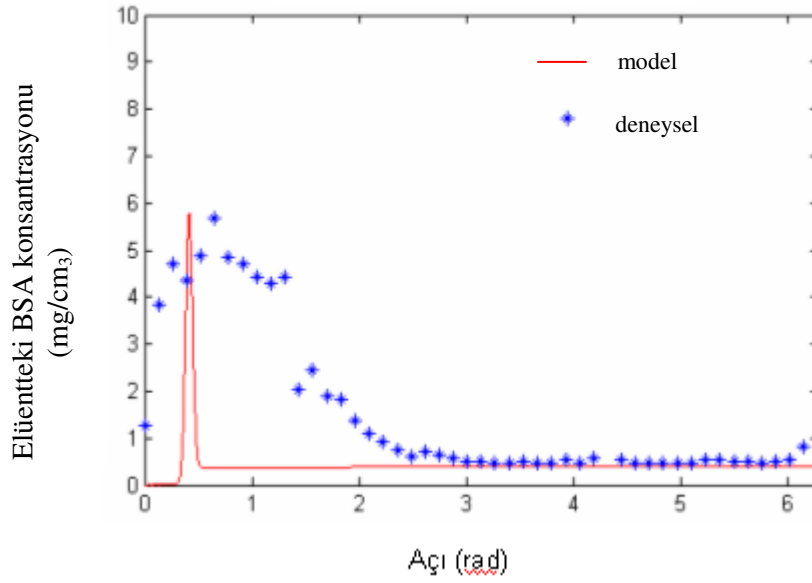
$$\text{Açısal yöndeki panel sayısı} = \frac{2\pi}{\Delta\theta} \quad (6.26)$$

Çizelge 6.1.'de annular kromatografda BSA saflaştırmasına yönelik simülasyon parametreleri verilmiştir. Bu parametrelerin, modifiye edilen sürekli annular kromatograf matematiksel modelinde yerine yerleştirilerek annular kromatografin BSA saflaştırma davranışını gösteren simülasyon çalışmaları elde edilmiştir.

Çizelge 6.1. Simülasyonda kullanılan parametreler

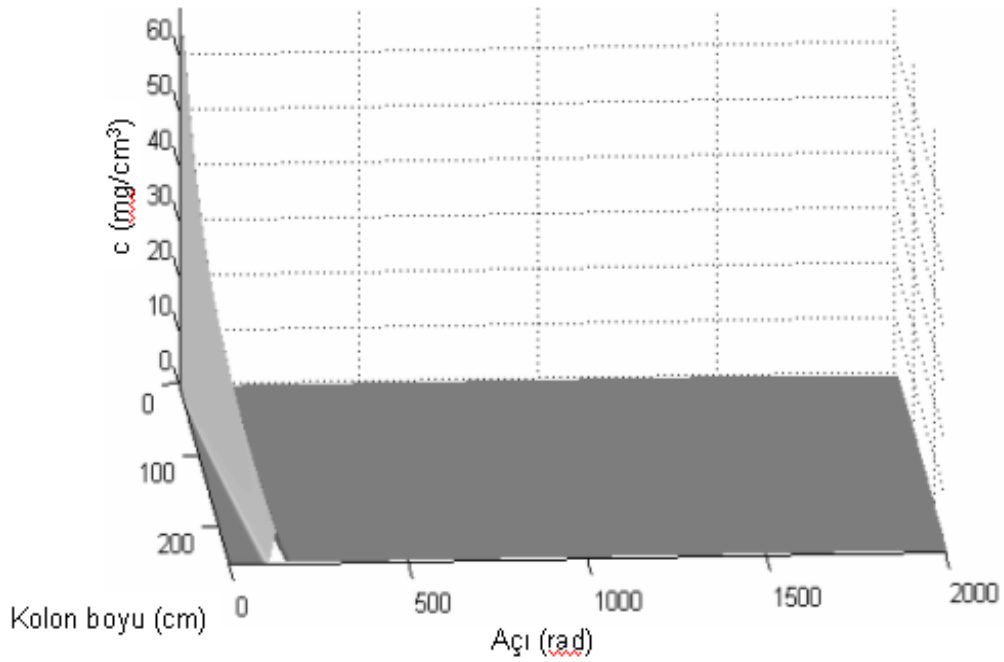
AC dış çapı (cm)	12
AC Annulus genişliği (cm)	0.6
AC Yatak yüksekliği (cm)	25
AC Yatak porozitesi, ϵ (-)	0.30
Partikül çapı, D_p (μm)	105
w (rad/h)	4π
u superficial lineer hız (cm/h)	43.2
$v = u/\epsilon$ (cm/h)	144
D_{ab} (cm^2/s)	6.81×10^{-7}
D_x (cm^2/s)	5.38×10^{-4}
c_0 (mg/cm^3)	63.56
k_f (cm/s)	1.49×10^{-3}
D_s (cm^2/s)	1.7×10^{-9}
K (mg/cm^3)	10.42
Q_m (mg/cm^3 katı)	136.98
$[\text{HETP}]_x = 2 D_x/v$	$6,05 \times 10^{-3}$
$[\text{HETP}]_\theta = 2 D_\theta/\omega$	$7,59 \times 10^{-3}$
$Cr_x = v\Delta(t)/\Delta(x)$	0,50
$Cr_\theta = \omega \Delta(t)/\Delta(\theta)$	0,50
$\Delta(x)=[\text{HETP}]_x/Cr_x$ (cm)	$1,21 \times 10^{-2}$
$\Delta(\theta)=[\text{HETP}]_\theta/Cr_\theta$ (rad)	$1,52 \times 10^{-2}$
Eksenel yöndeki panel sayısı	2066
Açısal yöndeki panel sayısı	414

6.5. Simülasyonda Sonuçları



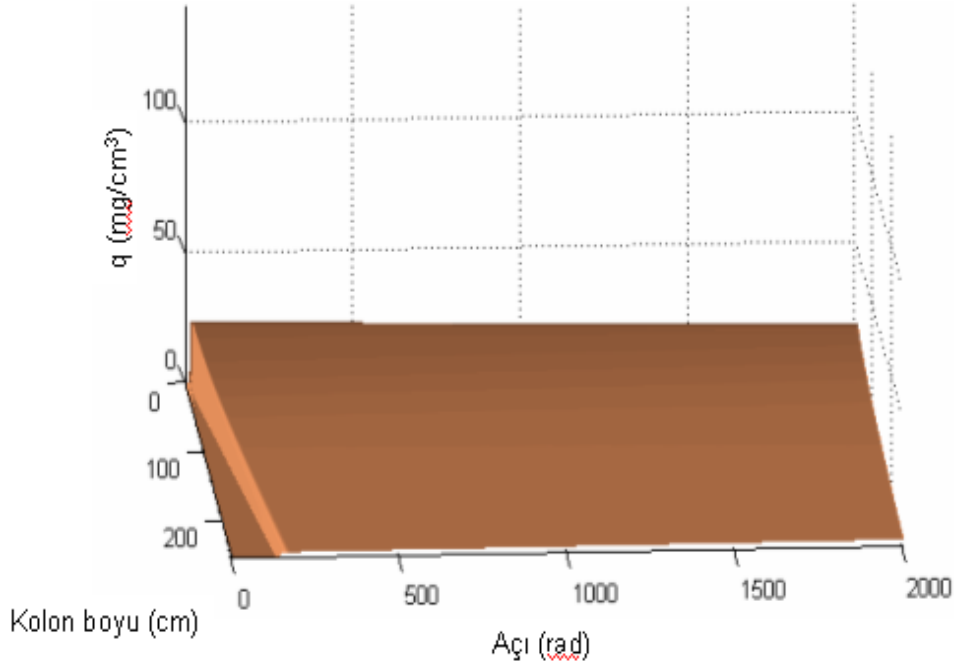
Şekil 6.11. Kolon çıkışındaki BSA konsantrasyonunun açısal yönde değişimi

Şekil 6.11.'de kolon çıkışındaki BSA konsantrasyonunun kolonun dönme açısına bağlı değişimi görülmektedir. Şekilde, annular kromatografin denge dışı adsorpsiyon yaklaşımına dayanan model çıktısı ile deneysel veriler karşılaştırılmıştır. Görüldüğü üzere, sayısal çözüm ve deneysel veriler ile elde edilen pikler birbiri ile uyum içerisindedir. Bu, annular kromatograf denge dışı matematiksel çözümün kolon içerisindeki dinamik duruma en gerçekçi yaklaşımı sergilediğinin bir kanıtıdır. İki pikin maksimumlarının aynı olmasına rağmen, model simülasyon piki, deneysel veriler ile elde edilen pike göre daha keskin ve kolondan daha erken çıkmıştır. Bunun başlıca nedeni olarak, model simülasyonunda açısal dispersiyon katsayısının ihmal edilmiş olmasıdır. Model çözümünde, sayısal çözümleme tekniklerinin getirdiği bazı kısıtlamalar nedeniyle ihmal edilen açısal dispersiyon katsayısının kolon içindeki etkisi Şekil 6.11.'de açıkça görülmektedir. Açısal dispersiyonun yok sayıldığı model piki keskin ve besleme noktasına yakın açısal konumdan kolonu terk ederken, açısal dispersiyonun etkin olduğu gerçek durumda yani deneysel verilerle elde edilen pikde yayılma gözlenmektedir. Buna ek olarak, açısal yönde artan difüzyon nedeniyle çözünen bileşen daha ilerideki açısal kordinatlarda bulunan adsorbent partiküller tarafından tutulmakta ve bant genişlemesi olayı ortaya çıkmaktadır.



Şekil 6.12. Bir tam tur için BSA yığın sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi

Şekil 6.12.'de BSA yığın sıvı konsantrasyonunun kolon boyuna ve açığa bağlı değişimi görülmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi, BSA yığın sıvı konsantrasyonu kolona ilk beslendiği noktalarda fazla iken kolon boyunca ilerledikçe ani düşüşe geçmiştir. Bunun başlıca nedeni, yığın sıvının kolon sonuna doğru ilerlerken karşılaştığı her adsorbent partikülü tarafından tutulması ve buna bağlı olarak kolon sonuna yaklaştıkça içerisindeki bileşen miktarının azalmış olmasıdır. Kolon başında, BSA yığın sıvı konsantrasyonunun fazla olması nedeniyle adsorpsiyon sürücü kuvveti maksimumdur. Böylelikle, yığın sıvının partiküllere adsorpsiyonu daha hızlı gerçekleşmekte ve buna bağlı olarak BSA yığın sıvı konsantrasyonunda ani bir azalma göze çarpmaktadır. Bu noktada aksel dispersiyonun etkisi de görülmektedir. Kolon boyunca artan aksel difüzyon etkileri nedeniyle, BSA yığın sıvı konsantrasyonunda aksel dağılım göze çarpmaktadır. Ayrıca, BSA yığın sıvı konsantrasyonu, açısal dispersiyona bağlı olarak kolona beslendiği noktanın biraz ilerisinde kolonu terk etmiştir. Kolon içerisinde daha geniş açısal noktalarda adsorbent partikül tarafından tutulması nedeniyle, BSA yığın sıvı konsantrasyonu yaklaşık olarak sıfıra düşmüştür.

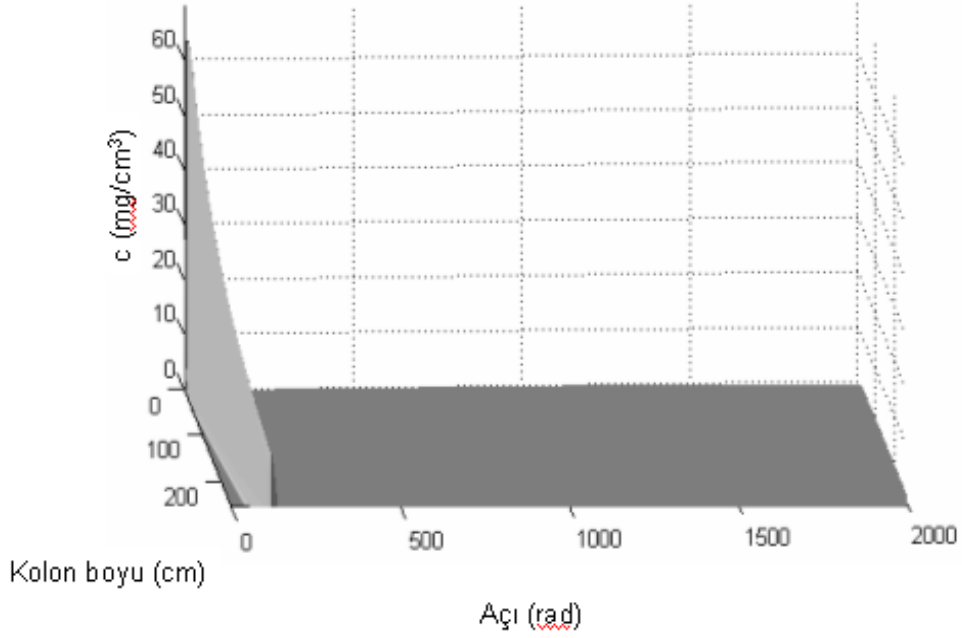


Şekil 6.13. Bir tam tur için BSA ortalama katı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi

Şekil 6.13.'de, partikül içerisindeki BSA ortalama katı konsantrasyonunun, kolon boyuna ve açığa bağlı değişimi görülmektedir. Şekil 6.13., şekil 6.12. ile mantıksal uyum içerisindedir. Kolonun belli bir hızda dönmeye bağlı oluşan açısall dispersiyon etkisiyle yığın sıvıdaki BSA bileşeninin katı partikül tarafından adsorpsiyonu kolona beslendiği noktanın biraz ilerisinde başlamaktadır. Kolon başında şekil 6.12.'de de açıklandığı gibi BSA yığın sıvı konsantrasyonu maksimumdur. Buna bağlı olarak, adsorpsiyon da maksimum hızında ve BSA ortalama katı konsantrasyonu fazladır. Ortalama katı konsantrasyonunun, kolon sonuna doğru azalmasının nedeni de kolon boyunca yığın sıvıdaki BSA nın, partikül tarafından adsorplanması sonucu BSA yığın sıvı konsantrasyonunun giderek azalması ile adsorpsiyon sürücü kuvvetinin azalmasıdır. Sürücü kuvvetin azalması ile bileşenler partikül içerisindeki difüzyon direncini yenememekte ve partikül içerisinde, BSA ortalama katı faz konsantrasyonu düşmektedir. BSA ortalama katı konsantrasyonunun sıfırlanmamasının nedeni de, partikül içerisindeki difüzyon direncini nedeniyle elüsyonun zorlaşmasıdır.

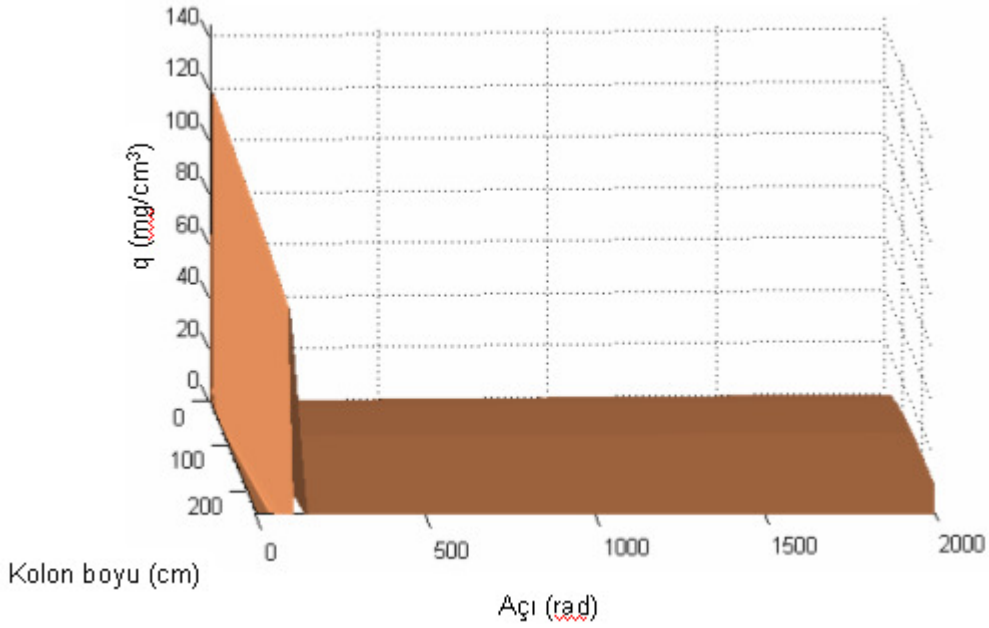
Şekil 3.3.(a)'da gösterilen denge modelinde yığın sıvı konsantrasyonu ile ortalama katı konsantrasyonun dengede olduğu varsayımı yapılmıştır. Fakat şekil 6.12. ve şekil 6.13. karşılaştırıldığı zaman, denge yaklaşımının kolon içerisindeki gerçek

durumu yansıtmadığı açıkça görülmektedir. yığın sıvı ve ortalama katı konsantrasyonları aksenel ve açısal konumlarda birbirleri ile çok farklı davranışlar göstermektedir.



Şekil 6.14. Bir tam tur için BSA ara yüzey sıvı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi

Şekil 6.14.'de BSA ara yüzey sıvı konsantrasyonunun kolon boyuna ve açığa bağlı değişimi görülmektedir. Kolonun başında, adsorpsiyonun hızlı gerçekleşmesi nedeniyle yığın sıvıda bulunan BSA bileşeni, film direncini yenebilmekte ve partikül etrafında oluşan film tabakasını geçerek partikül yüzeyine tutunmaktadır. Kolon sonuna doğru, partikülün doyması ile adsorpsiyon azalmakta ve böylece BSA ara yüzey sıvı konsantrasyonu azalmaktadır.



Şekil 6.15. Bir tam tur için BSA ara yüzey katı konsantrasyonunun kolon boyunca değişimi

Şekil 6.15.'de BSA ara yüzey katı konsantrasyonunun kolon boyuna ve açığa bağlı değişimi görülmektedir. Sıvı fazdan katı faza aktarılan madde miktarındaki artış, BSA ortalama katı konsantrasyonunu arttırdığı gibi, BSA ara yüzey katı konsantrasyonunda da artışa neden olacaktır. Şekilde görüldüğü gibi, BSA ara yüzey katı konsantrasyonu, BSA ortalama katı konsantrasyonuna göre daha fazladır. Bunun nedeni, adsorpsiyonun ilk partikül yüzeyinde gerçekleşmesi daha sonra partikül içerisine difüzyonudur. Partikül yüzeyinde elüsyonun, partikül içinden elüsyona göre daha kolay olmasına bağlı olarak açılal konumda BSA ara yüzey konsantrasyonu neredeyse sıfırlanmıştır.

Şekil 3.3.(b)'de gösterilen denge dışı model yaklaşımında BSA ara yüzey sıvı konsantrasyonu ile BSA ara yüzey katı konsantrasyonun dengede olduğu kabul edilmiştir. Fakat şekil 6.14. ve şekil 6.15. karşılaştırıldığı zaman, birbirleri ile uyum içerisinde olup, kolon içerisinde benzer davranışlar gösterdikleri açıkça görülmektedir. bu durum, denge dışı model yaklaşımının kolon içerisindeki gerçek dinamik durumu yansıttığının bir göstergesidir.

7. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada sürekli kromatografik sistemleri oluşturan Hareketli Yatak Benzetimli Kromatograf (SMB) ile Sürekli Annular Kromatograf (CAC) cihazlarının imalatı gerçekleştirilmiştir. SMB ve CAC cihazları, bildiğimiz kadarıyla ülkemizdeki ilk sürekli kromatografik cihazları olup, laboratuvarımız dışında kurulumu tamamlanıp, ayırma ve saflaştırma amacıyla kullanılan örnekleri bulunmamaktadır. SMB cihazının kurulumunun yanında tarafımızca Software programı hazırlanmıştır. SMB ünitesinin beynini oluşturan Software programı sayesinde, sistemi oluşturan 5 adet vana ile 2 adet akış ölçer için deney boyunca bilgi transferi sağlanmıştır. Bunun yanında, şimdiye kadar literatürde örneği bulunmayan "SMB - Flow Control" modu geliştirilmiş, böylelikle giriş ve çıkış akımlarının senkronize hareketini sağlayan değiştirme zamanına alternatif bir parametre olan ürün hacmine bağlı değişim mümkün kılınmıştır. İmalatı gerçekleştirilen Sürekli Annular Kromatograf cihazının doldurulması (packing) için tarafımızca yeni bir yöntem uygulanmıştır. Yatağın kanallaşmaya meydan verilmeden sabit faz ile doldurulması (packing) tüm kromatografik kolonlar için olduğu gibi annular kromatograf için de çok önemlidir. Maksimum etkinlik ve yüksek oranda ayırabilme için, yatak homojen bir şekilde doldurulmalıdır. Geliştirdiğimiz bu yöntem ile yatak homojenitesi sağlanabilmekte ve kanallaşmanın önüne geçilebilmektedir. Sürekli annular kromatograf kolon doldurulmasına (packing) dair geliştirdiğimiz bu yöntemin patentlenebilmesi için Tübitak Başkanlığına başvuru yapılması planlanmaktadır.

2. İmalatı tamamlanan hareketli yatak benzetimli kromatograf ve sürekli annular kromatograf cihazlarının teorik analizi yapılmıştır. Bu iki sistem için matematiksel ifadelerin türetilmesinde, denge-dışı (non-equilibrium) model yaklaşımı esas alınmıştır. Böylelikle işletme sırasında birbirlerinden çok farklı tepkiler veren ve uyum içerisinde bulunmayan kütle aktarım dirençleri ve aksenel dispersiyon terimi birbirlerinden ayrı ele alınmıştır. Bu nedenle, denge dışı adsorpsiyon kabulü ile kolon içerisinde varolan dinamik durum, gerçeği yansıtmaktadır. Bunun yanında, SMB sistemi için geliştirilen ve literatürde çalışmalarında sıkça bahsedilen optimizasyon tekniğine (üçgen teorisi) ayrıntılı olarak yer verilmiştir.

3. Tezin imalat çalışmaları yanında bir diğer amacı annular kromatografide bovin serum albumin (BSA) saflaştırma performansının incelenmesidir. Sığır kanından elde edilen serumun, ön filtrasyon işlemleri sonunda HPLC kromatogramı Şekil 5.3.'de verilmiştir. Şekil 5.3 (a) da görüldüğü gibi tüm elüsyon süresi (90 dak) boyunca kromatogramda yalnızca iki adet pik görülmüştür. Bu piklerden farklı, başka piklerin omuz yapmaları ihtimali göz önüne alınarak Şekil 3 (b) deki kısa süreli (grafikte zaman skalasının genişlediği) kromatogram da bu gelişme raporunda verilmiştir. Görüldüğü gibi başka maddelere ait pikler omuz yapmamaktadır. Bu umut verici bir durum olup, Şekil 5.3'de verilen kromatogramlar serumda bulunan diğer bileşenlerin çok büyük bir kısmının 500 kDa kesme aralıklı tanjant akış filtrasyonu ile, filtrat tarafına geçemediklerini göstermektedir. BSA'nın molekül büyüklüğünün 66 kDa olması nedeniyle 500 kDa kesme aralıklı membrandan filtrat tarafına BSA geçişinde bir sorun olmadığı düşünülmektedir. Döner annular kromatografi cihazı ile gerçekleştirilen sürekli ayırma prosesi ile Şekil 5.3'de görülen bu piklere karşı gelen bileşenler birbirinden ayrılmış ve karakterize edilmiştir.

4. Döner annular kromatografte saflaştırılan BSA karakterizasyonu, gözle muayene, FTIR spektroskopisi ve saflaştırılan BSA ile ticari BSA'nın HPLC kromatogramlarının karşılaştırılması ile yapılmıştır. Şekil 5.9'daki ticari BSA pikinde, tez kapsamında saflaştırılan BSA pikine göre önemli oranda bir bant genişlemesi olduğu görülmektedir. Her iki HPLC ölçümünde de aynı miktarda BSA'nın kolona injekte edildiği hususu dikkate alındığı takdirde; bu bant genişlemesi, ticari BSA'daki safsızlık oranının tez kapsamında saflaştırılan BSA ya göre daha fazla olduğu şeklinde açıklanabilir. Ticari BSA'nın (Amresco Inc., A.B.D.) safiyeti imalatçı firma tarafından en az % 98 olarak verilmiştir. Diğer bir deyimle, Şekil 5.9'dan anlaşılacağı gibi, tez kapsamında saflaştırılan BSA % 98'in üzerinde bir safiyettedir. Şekil 5.6'daki gözle muayene fotoğrafı ile Şekil 5.7 ve 5.8'deki FTIR spektrumları da bu durumu işaret etmektedir.

5. Döner kromatograf için modifiye edilen non-equilibrium model ifadelerinin türetilmesi sonucu, BSA saflaştırılmasına yönelik deneysel çalışmaların simülasyonu yapılmıştır. Model parametrelerinden biri olan, annular kromatografte BSA adsorpsiyonunda kullanılacak olan "Q Sepharose XL" anyon değiştirici adsorbent sistemi için homojen difüzyon katsayısı, D_s bulunmuştur. Homojen (katı) difüzyon

katsayısı, D_s değerinin bulunmasında, tarafımızca geliştirilen denge dışı (non-equilibrium) yaklaşımına dayanan yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Pedersen (2003), çalışmasında Q Sepharose XL reçinesinin BSA adsorpsiyon kapasitesini incelemiş ve homojen difüzyon hızı değerini $6.93 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ olarak hesaplamıştır. Görüldüğü gibi Q Sepharose XL reçinesi için tarafımızca geliştirilen yeni bir yöntemle bulunan D_s değeri ($1.7 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$) literatür çalışmaları ile uyumluluk göstermektedir.

6. Annular kromatografda BSA saflaştırmasına yönelik yapılan simülasyon sonuçlarında, Şekil 6.11.'de denge dışı adsorpsiyon yaklaşımına dayanan model çıktısı ile deneysel veriler arasındaki uyum, denge dışı model yaklaşımının kolon içerisindeki dinamik durumu yansıttığının bir göstergesidir. Aynı sonuç, Şekil 6.14.'de verilen ara yüzey sıvı konsantrasyonu ve Şekil 6.15.'de verilen ara yüzey katı konsantrasyon grafiklerinde de görülmektedir.

8. KAYNAKLAR

- Adam, P., Nicoud, R. M., Bailly, M., Ludemann-Hombourger, O., 2002, US Patent no: 6 413 419.
- Alkan, Fatma Aslı., 2003, Tersinir Reaksiyonlarda Dönüşümün Artırılmasının Modellenmesi: Tek/Çokbileşenli Adsorpsiyon Mekanizmaları Ve Reaksiyon Ortamından Adsorpsiyon Kolonunda Ürün Uzaklaştırılması, Hacettepe Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi.
- Andersson, M., Gustavsson, J., Johansson, B.-L., 2001, Evaluation of several anion-exchange media for process separations using a variety of proteins and aromatic acids, *International Journal of Bio-Chromatography*, 6, 285-301.
- Andreev, B. M., Golubkov, A. N., Vedeneev, A. I., Tenyaev, B. N., Selivanenko, I. N., 2000, Counterflow hydrogen isotope separation facility — data on tritium activities, *Fusion Engineering and Design*, 49, 825-829.
- Aumann, L., Morbidelli, M., 2006, Method and device for chromatographic purification, *European Patent*, 054053277.
- Azevedo, d. C., Rodrigues, A. E., 2001, Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for the inversion of sucrose and glucose–fructose separation, *Chemical Engineering Journal*, 82, 95–107.
- Barker, P.E., Ajongwen, N.J., Shieh, M.T., Ganetsos, G., 1993, Simulated counter-current chromatographic bioreactor-separators, *Studies in Surface Science and Catalysis*, 80, 35-44.
- Ben-Shebil, S., Alkan-Sungur, A., Özdural, A.R., 2007, Fixed-bed ion exchange columns operating under non-equilibrium conditions: Estimation of mass transfer properties via non-equilibrium modeling, *Reactive and Functional Polymers*, accepted for publication.
- Begovich, J. M., Sisson, W. G., 1984, A rotating annular chromaography for continuous separations, *AIChE Journal*, 30.
- Bernd-Walter, H., Bidlingmeyer, B. A., Broske, A. D., 09 Aug. 2007, Method and apparatus for packing chromatography column, *US Patent no: 20070181501*.
- BioPharm International Guide, July 2003, Column Packing for Process-Scale Chromatography: Guidelines for Reproducibility, 23.
- Bloomingburg, G. F., Bauer, J. S., Carta, G., Byers, C. H., 1991, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 30, 1061.
- Brooks Cole, 2003, *Chemistry (8th Edition)*, Belmont.
- Broughton, C. B., Gerhold, C. G., 1961, *US Patent no: 2 985 589*.

- Brunner, G, 1994, Gas Extraction, Steinkopff Verlag, Darmstadt.
- Bussemas, H.H., Ettre, L.S., 1994, Gottfried Kränzlin, the first follower of Tswett, *Chromatographia*, 39, 369-374.
- Canon, R. M., Sisson, W. G., 1978, *J. Liq. Chromatogr.*, 1, 427.
- Chang, Y. K., Chou, S. Y., Liu, J. L., Tasi, J. C., 2007, Characterization of BSA adsorption on mixed mode adsorbent: I. Equilibrium study in a well-agitated contactor, *Biochemical Engineering Journal*, 35, 56-65.
- Chang, C., Lenhoff, A.M., 1998, Comparison of protein adsorption isotherms and uptake rates in preparative cation-exchange materials, *Journal of Chromatography A*, 827, 281-293.
- Chen, H., Wang, R-F., Cerniglia, C.E., 2004, *Protein Expression and Purification*, 34, 302-310.
- Chen, H., Hopper, S.L., Cerniglia, C.E., 2005, *Microbiology*, 151, 1433–1441.
- Chen, W-D., Dong, X. Y., Sun, Y., 2002, Analysis of diffusion models for protein adsorption to porous anion-exchange adsorbent, *Journal of Chromatography A*, 962, 29-40.
- Chiang, A.S.T., 1998, Equilibrium theory for simulated moving bed adsorption processes, *AIChE J.*, 44, 2431–2441.
- Ching, C. B., Ruthven, D. M., 1985, Experimental study of a simulated counter-current adsorption system-sorbex operation, *Chem. Eng. Science*, 40, 1411-1417.
- Ching, C. B., Ruthven, D. M., 1985, Separation of glucose and fructose by simulated counter-current adsorption, *AIChE Symp. Series -Adsorption and Ion Exchange* 81, 1-8.
- Chung, S.F., Wen, C.Y., 1968, *AIChE Journal*, 14, 857.
- Clavier, J., Y., Nicoud, R., M., Perrut, M., 1996, High pressure chemical engineering (Eds: Rudolf von Rohr, P., Trepp, C.), Elsevier, London.
- DeCarli, J. P., Carta, G., Byers, C. H., 1990, *AIChE J.*, 36, 1220
- Depta, A., Johannsen, M., Peper, S., 2002, Simulated moving bed chromatography with supercritical fluids for the resolution of bi-naphthol enantiomers and phytol isomers, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 54, 85-102.
- Dimino, M.L., Palmer, A.F., 2007, Purification of bovine hemoglobin via fast performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, 856, 353-357.

- Dinelli, D., Polezzo, S., and Taramasso, M., J., 1962, *Chromatogr.*, 7, 477.
- Ditz, R., Schulte, M., Strube, J., 1998, Simulated moving bed chromatography technology in pharmaceutical new product development - its impact on the industry's race to the market, *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 1.
- Fabian, H., Mantale, W., 2002, *Infrared Spectroscopy of Proteins. Handbook of Vibrational Spectroscopy, Biochemical Applications*, John Wiley, Chichester, 3399.
- Ferrer, E.G., Bosch, A., Yantorno, O., Barana, E.J., 2008, A spectroscopy approach for the study of the interactions of bioactive vanadium species with bovine serum albumin, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3878–3886.
- Francotte, E. R., 1996, Preparative chiral separations by chromatography: A powerful approach for the isolation of optically pure compounds, *Chiral Europe Symposium Proceedings*.
- GE Healthcare Bio-Sciences AB, 2006, *Ion exchange chromatography*, Uppsala, Sweden, Instructions 71-5002-60 AE.
- GE Healthcare, 2005, *Instructions 28-4026-55 AA*, General Electric Company.
- Giddings, V. C., 1962, Theoretical basis for a continuous large capacity gas chromatographic apparatus, *Analytical Chemistry*, 34-37.
- Gomes, S. P., Minceva, M., Rodrigues, A. E., 2006, Simulated moving bed technology: Old and new adsorption, *Chemical Engineering Journal*, 118, 77-82.
- Gomes, S. P., Minceva, M., Pais, L.S. and Rodrigues, A.E., 2006, Advances in SMB chromatographic separations, *Chiral Separation Techniques*, Wiley–VCH.
- Gottschlich, N., Kasche, V., 1997, Purification of monoclonal antibodies by simulated moving-bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 765, 201-206.
- Haaga, J., Wouwera, A. V., Saucez, P., 2001, Modeling and simulation of a SMB chromatographic process designed for enantioseparation, *Control Engineering Practice*, 9, 921–928.
- Hashimoto, K., Kawase, M., Pilgrim, A., Araki, T., 2001, Lactosucrose production using a simulated moving bed reactor, *Chemical Engineering Science*, 56, 453-458.

- Hassan, M. M., Rahman, S., Loughlin, K. F., 1995, Modelling of simulated moving bed adsorption system: a more precise approach, *Separations Technology*, 5, 77-89.
- Helfferich, F., Klein, G., 1970, *Multicomponent chromatography, theory of interference*, Marcel Dekker, New York.
- Heuer, C., Kniep, H., Falk, T., Seidel-Morgenstern, A., 1998, *Chem. Eng. Technol.* 21, 469.
- Hilbrig, F., Freitag, R., 2003, Review-Continuous annular chromatography, *Journal of Chromatography B*, 790, 1–15.
- Hofmann, M.J., 22 November 2005, Methods and apparatus for packing chromatography columns and chromatography column, US Patent no: 6966991.
- Howard, A. J., Carta, G., Byers, C. H., 1988, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 27, 1873.
- Hunter, A.K., Carta, G., 2000, Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers: I. Morphology and equilibrium adsorption”, *Journal of Chromatography A*, 897, 65–80.
- Hunter, A.K., Carta, G., 2000, Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion exchangers: II. Adsorption rates and column behavior, *Journal of Chromatography A*, 897, 81–97.
- Hunter, A.K., Carta, G., 2002, Protein adsorption on novel acrylamido-based polymeric ion-exchangers IV. Effects of protein size on adsorption capacity and rate, *Journal of Chromatography A*, 971, 105–116.
- Kaspereit, M., Jandera, P., Skavrada, M., Seidel-Morgenstern, A., 2002, Impact of adsorption isotherm parameters on the performance of enantioseparation using simulated moving bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 944,249-262.
- Keßler, L.C., Seidel-Morgenstern, A., 2007, EU Patent, 07007765
- Klatt, K. U., Hanisch, F., Dünnebier, G., 2002, Model-based control of a simulated moving bed chromatographic process for the separation of fructose and glucose, *Journal of Process Control*, 12, 203–219.
- Koyuncu, T., 2007, Sürekli annular kromatografinin denge dışı modellenmesi: tek bileşen için kütle denklığı denklemlerinin iki-boyutlu formülasyonu ve elusyon profillerine aksenal ve açısasal dispersiyon etkilerinin tahmin edilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Kruglov, A. V., Bjorklund, M. C., Curr, R. W., 1996, Optimization of the Simulated countercurrent moving-bed chromatographic reactor for the oxidative coupling of methane, *Chemical Engineering Science*, 51, 2945-2950.

- Kurup, A. S., Hidajat, K. and Ray, A.K., 2006, Comparative study of modified simulated moving bed systems at optimal conditions for the separation of ternary mixtures under nonideal conditions, *Industry Engineering Chemical Research*, 45, 3902–3915.
- Lai, X., Zheng, Y., Jacobsen, S., Larsen, J.N., Ipsen, H., Løwenstein, H., 2008, Determination of adsorbed protein concentration in aluminum hydroxide suspensions by near-infrared transmittance spectroscopy, *Applied Spectroscopy*, 62, 784-790.
- Lameloise, M. L., Viard, V., 1993, Modelling and simulation of a glucose-fructose simulated moving bed adsorber, *Trans IChemE* 71C, 27-32.
- Li, P., Xiu, G., Rodrigues, A. E., 2003, Modeling separation of proteins by inert core adsorbent in a batch adsorber, *Chemical Engineering Science*, 58, 3361-3371.
- Lode, F., Houmard, M., Migliorini, C., Mazzotti, M., Morbidelli, M., 2001, Continuous reactive chromatography, *Chemical Engineering Science*, 56, 269-291.
- Lozzi, I., Pucci, A., Pantani, O.L., D'Acqui, L.P., Calamai, L., 2008, Interferences of suspended clay fraction in protein quantitation by several determination methods, *Analytical Biochemistry*, 376, 108-114.
- Ludemann-Hombourger, O., Bailly, M., Nicoud R. M., 2000, Design of a simulated moving bed: optimal particle size of the stationary phase, *Separation Science and Technology*, 35, 1285-1305.
- Ludemann-Hombourger, O., Nicoud, R. M., Bailly, M., 2000, *Sep. Sci. Technol.*, 35, 1829.
- Luis S., Pais, L., Loureiro, M. and Rodrigues, A. E., 1997, Separation of 1,1'-bi-2-naphthol enantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed, *Chemical Engineering Science*, 52, 245-257.
- Lübke, R., Seidel-Morgenstern, A., Tobiska, L., 2007, Numerical method for accelerated calculation of cyclic steady state of ModiCon–SMB-processes, *Computers & Chemical Engineering*, 31, 258-267.
- Ma, Z. and Wang, N. H., 1997, Standing wave analysis of SMB chromatography: linear Systems, *AIChE Journal*, 43, 2488–2508.
- Majors, R.E., 2004, Advances in HPLC column packing design, *LCGC LC Column Technology Supplement*, 9, 8.

- Mazzotti, M., Storti, G. and Morbidelli, M., 1997, Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations, *J. Chromatography A*, 769, 3–24.
- Mazzotti, M., Kruglov, A., Neri, B., Gelosa, D., Morbidelli, M., 1996, A continuous chromatographic reactor: SMBR, *Chemical Engineering Science*, 51, 1827-1836.
- Mazzotti, M., 2006, Equilibrium theory based design of simulated moving bed processes for a generalized langmuir isotherm, *Journal of Chromatography A*, 1126, 311-322
- Mazzotti, M., Giovanni, O., Morbidelli, M., Denet, F., Hauck, W., Nicoud, R., 2001, Supercritical fluid simulated moving bed chromatography: II. Langmuir isotherm, *Journal of Chromatography A*, 919, 1-12.
- Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M., 1994, Robust design of counter-current adsorption separation. *Journal of Chromatography A*, 40, 1825-1842.
- Mazzotti, M., Storti, G., Morbidelli, M., 1997, Optimal operation of simulated moving bed units for nonlinear chromatographic separations, *Journal of Chromatography A*, 769, 3-24.
- McCue, J.T., Kemp, G., Low, D., Quinones-Garcia, I., 2003, Evaluation of protein-A chromatography media, *Journal of Chromatography A*, 989, 139–153.
- Migliorini, C., Mazzotti, M. and Morbidelli, M., 2000, Design of Simulated moving bed multicomponent separations: Langmuir systems, *Sep. and Pur. Tech.*, 20, 79–96.
- Migliorini, C., Mazzotti, M., Morbidelli, M., 1998, Continuous chromatographic separation through simulated moving beds under linear and nonlinear conditions, *Journal of Chromatography A*, 827, 161-173.
- Migliorini, C., Wendlinger, M., Mazzotti, M., Morbidelli, M., 2001, Nonisothermal reactive chromatography, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 40, 2606-2617.
- Minceva, M., Rodrigues, A. E., 2005, Two-level optimization of an existing SMB for p-xylene separation, *Computers and Chemical Engineering*, 29, 2215-2228.
- Morbidelli, M. and M. Mazzotti, 2002, Advances in simulated moving bed chromatography, PREP, 15th International Symposium, Exhibit Workshops on Preparative/Process Chromatography Ion Exchange, Adsorption/Desorption Processes & related Separation Techniques,” Lecture 201, Washington DC, USA, 53–54.

- Morbidelli, M., Zhang, Z., Mazzotti, M., 2003, PowerFeed operation of simulated moving bed units: changing flow-rates during the switching interval, *Journal of Chromatography A*, 1006, 87-89.
- Nagamatsu, S., Murazumi, K., Makino, S., 1999, Chiral separation of a pharmaceutical intermediate by a simulated moving bed process, *Journal of Chromatography A*, 832, 55-65.
- Nicola, J.D., 25 May 2004, US Patent 6740241, Chromatography column system and method of packing of a chromatography column.
- Olson, B.J., Markwell, J., 2007, Assays for determination of protein concentration, *Current protocols in protein science/editorial board*, Chapter 3, Unit 3.4.
- Özdural, A. R., Alkan, A., Kerkhof, P. J. A. M., J., 2004, Modeling chromatographic columns: Non-equilibrium packed-bed adsorption with non-linear adsorption isotherms, *Journal of Chromatography A*, 1041, 77-85.
- Özdural, A.R., Tanyolaç, D., Özdural, N., A novel technology for virus vaccine purification: Modeling and operation of continuous annular chromatography unit", *AIChE Annual Spring Meeting, Conference Proceedings, Houston, USA, April 22 - 27, 2007*.
- Pais, L., Loureiro, J., Rodrigues, A. E., 1997, Separation of 1,1-bi-2-naphthol enantiomers by continuous chromatography in simulated moving bed, *Chemical Engineering Science*, 52, 245-257.
- Pais, L.S., Loureiro, J. M., Rodrigues, A. E., 1998, Separation of enantiomers of a chiral epoxide by simulated moving bed chromatography. *J. Chromatogr. A*, 827, 215–233.
- Pais, L.S., Rodrigues, A.E., 2003, Design of simulated moving bed and varicol processes for preparative separations with a low number of columns, *J. Chromatogr. A*, 1006, 33–44.
- Paredes, G. and Mazzotti, M., 2007, Optimization of simulated moving bed and column chromatography for a plasmid DNA purification step and for a chiral Separation, *Journal of Chromatography A*, 1142, 56–68.
- Pavone, D. and Hotier, G., 2000, System approach modelling applied to the eluxyl process, *Revue IFP*, 55, 437.
- Pedefferri, M.P., Zenoni, G., Mazzotti, M. and Morbidelli, M., 1999, Experimental analysis of a chiral separation through SMBC, *Chemical Engineering Science*, 54, 3735-3748.
- Pedersen, L., Mollerup, J., Hansen, E., Jungbauer, A., 2003, Whey proteins as a model system for chromatographic separation of proteins, *Journal of Chromatography B*, 790, 161-173.

- Pedersen, L., 2003, Modelling retention volumes, isotherms and plate heights for whey proteins in anion-exchange chromatography, Ph.D. Thesis, Department of Chemical Engineering, Technical University of Denmark.
- Rajendran, A., Paredes, G., Mazzotti, M., 2008, Simulated moving bed chromatography for the separation of enantiomers, *Journal of Chromatography A*, CHROMA-349392, 30.
- Rajendran, A., Peper, S., Johannsen, M., Mazzotti, M., Morbidelli, M., Brunner, G., 2005, Enantioseparation of 1-phenyl-1-propanol by supercritical fluid-simulated moving bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 1092, 55-64.
- Reissner, K., Prior, A., Wolfgang, J., Bart, H.-J., Byers, C. H., 1997, *J. Chromatogr. A*, 763, 49.
- Rhee, H.K., Aris, R., Amundson, N.R., 2001, First-order partial differential equations, Dover Publications, vol 2., Mineola, NY.
- Rhee, H.-K., Aris, R. and Amundson, N.R., 1970, On the Theory of Multicomponent Chromatography, *Phil. Trans. Roy. Soc. London A*, 296, 419.
- Rodrigues, A. E., Azevedo, C. S., 2001, Design methodology and operation of a simulated moving bed reactor for the inversion of sucrose and glucose-fructose separation, *Chemical Engineering Journal*, 82, 95-107.
- Rodrigues, A. E., Mata, V. G., 2001, Separation of ternary mixtures by pseudo-simulated moving bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 939, 23-40
- Ruthven, D.M., 1984, Principles of adsorption and adsorption processes, J. Wiley and Sons, New York.
- Ruthven, D. M., Ching, C. B., 1989, Counter-current and simulated counter-current adsorption separation processes, *Chemical Engineering Science*, 44, 1011-1038.
- Schramm, H., 2005, Ph.D. Thesis, Otto-von-Guericke Universität, Magdeburg.
- Schramm, H., Kaspereit, M., Kienle, A., Seidel-Morgenstern, A., 2003, Simulated moving bed process with cyclic modulation of the feed concentration, *Journal of Chromatography A*, 1006, 77-86.
- Schulte, M., Nicoud, R. M., Kinkel, J. And Charton, F., 1996, *Chemical Engineering Technology*, 68.
- Schulte, M., Strube J., 2001, Preparative enantioseparation by simulated moving bed chromatography, *Journal of Chromatography A*, 906, 399-416.

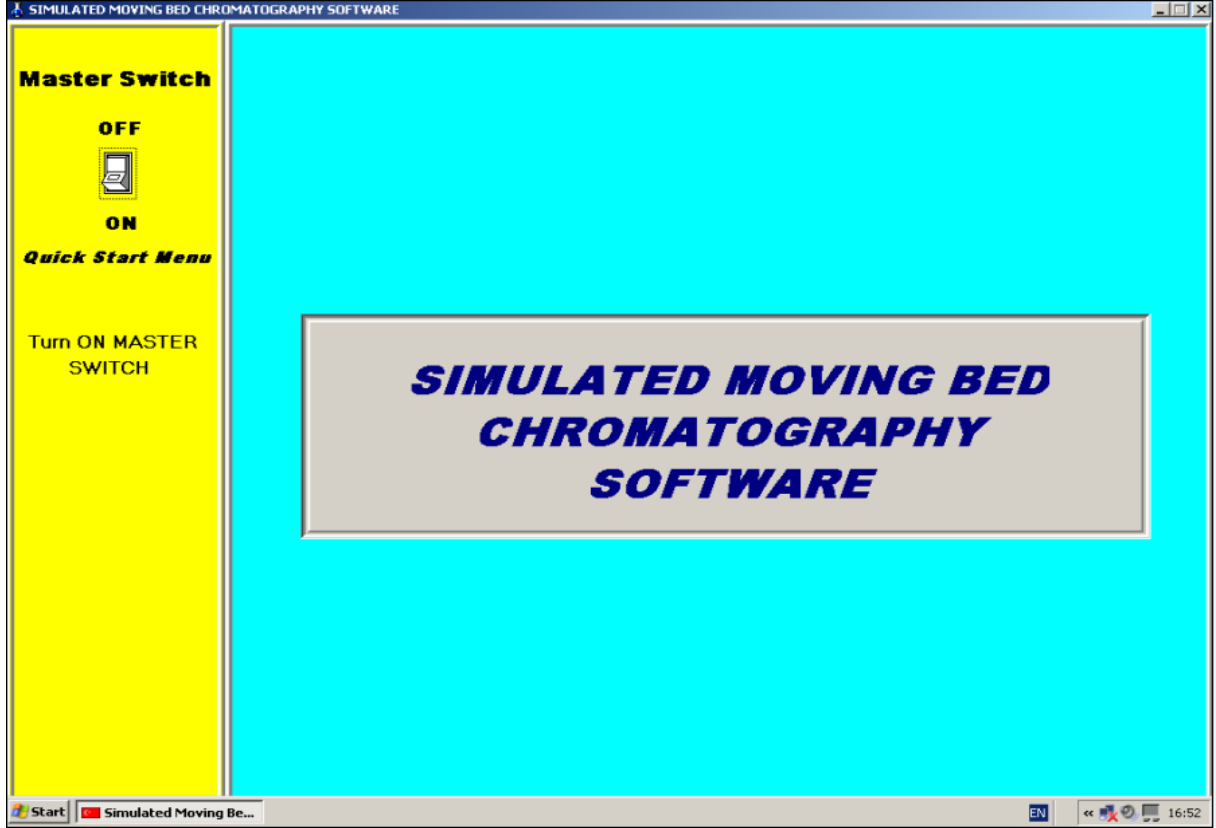
- Scott, C. D., Spence, R. D., and Sisson, W. G., 1976, Pressurized annular chromatography for continuous separations, *Journal of Chromatography*, 126, 381-400.
- Schmidt-Traub, H., Fricke, J., Meurer, M., 1999, Design and layout of simulated moving bed chromatographic reactors, *Chem. Eng. Technol.*, 22, 10.
- Seidel-Morgenstern, A., Keßler, L. C., Kaspereit, M., 2008, New developments in simulated moving bed chromatography, *Chemical Engineering Technology*, 31, 826–837.
- Seidel-Morgenstern, A., 1998, Optimization and comparison of different modes of preparative chromatography, *Analysis Magazine*, 26, 7.
- Seidel-Morgenstern, A., Keßler, L.C., 2008, Improving performance of simulated moving bed chromatography by fractionation and feed-back of outlet streams, *Journal of Chromatography A*, 1207, 55-71.
- Seidel-Morgenstern, A., Schramm, H., Kienle, A., Kaspereit, M., 2003, Simulated moving bed process with cyclic modulation of the feed Concentration, *Chem. Eng. Sci.* 2003, 58, 5217.
- Silva, V.M.T.M., Rodrigues, A. E., 2005, Novel process for diethylacetal synthesis, *AIChE. J.*, 51, 2752.
- Silvia, E. A., Souza, U. and Guelli, U. S., 2002, The use of simulated moving bed in chromatographic separation: Study of the SMB configuration, *Separation Science and Technology*, 37, 1489-1504.
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J., Crouch, S. R., 2003, *Fundamentals of analytical chemistry* (8th Ed.), Brooks Cole, Belmont.
- Smith, M. S., Guiochon, G., J., 1998, *Chromatogr. A*, 827, 241-257.
- Staby, A., Jensen, R.H., Bensch, M., Hubbuch, J., Dünnweber, D.L., Krarup, J., Nielsen, J., Jensen, I.H., 2007, Comparison of chromatographic ion-exchange resins. VI. Weak anion-exchange resins, *Journal of Chromatography A*, 1164, 82-94.
- Storti, G., Masi, M., Carra, S., and Morbidelli, M., 1989, Optimal design of multicomponent counter-current adsorption separation processes involving non-linear equilibria, *Chem. Eng. Sci.*, 44, 1329–1345.
- Storti, G., Mazzotti, M., Morbidelli, M. and Carra, S., 1993, Robust design of binary counter-current adsorption separation processes, *AIChE J.*, 39, 471–492. *Technology*, 68.

- Strube, J., Altenhöner, U., Meurer, M., Schmidt-Traub, H., Schulte, M., 1997, Dynamic simulation of simulated moving bed chromatographic processes for the optimization of chiral separations, *Journal of Chromatography A*, 769, 81-92.
- Svensson, H., Agrell, C. E., Dehlen, S.O., Hagdahl, L., 1955, *Sci. Tools* 2, 17
- Synder, et al., 1992, July 14, US Patent no: 5,130,001.
- Taylor, T. L., 2008, Supercritical fluid chromatography for the 21st century, *The Journal of Supercritical Fluids*, in press, available online in 27 September 2008.
- Thiele, A., Falk, T., Tobiska, L., Seidel-Morgenstern, A., 2001, Prediction of elution profiles in annular chromatography, *Computers and Chemical Engineering*, 25, 1089-1101.
- Toumi, A., Engell, S., Diehl, M., Bock, H.G., Schloder, J., 2007, Efficient optimization of simulated moving bed processes, *Chemical Engineering and Processing*, 46, 1067–1084.
- Toumi, A., Engell, S., Ludemann-Hombourger, O., Nicoud, R.M., Bailly, M., 2003, Optimization of simulated moving bed and Varicol processes, *J. Chromatogr. A*, 1006, pp. 15.
- Tscheliessnig, A., Hahn, R., Jungbauer, A., 2005, In situ determination of adsorption kinetics of proteins in a finite bath, *Journal of Chromatography A*, 1069, 23-30.
- Tuğcu, N., Roush, D.J., Göklü, K.E., 2008, Maximizing productivity of chromatography steps for purification of monoclonal antibodies, *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 599-613.
- Tuthill, E., J., 1970, *Journal of Chromatography Science*, 8, 285.
- Uretschlager, A., Jungbauer, A., 2002, Preparative continuous annular chromatography (P-CAC), A Review, *Bioprocess Biosyst Eng*, 25, 129-140.
- Vogel, J. H., Nguyen, H., Pritschet, M., Wegen, R. V., Konstantinov, K., 2002, Continuous annular chromatography: General characterization and application for the isolation of recombinant protein drugs, *Biotechnology and Bioengineering*, 80, 5.
- Wankat, P.C., 1977, *AIChE J.*, 23, 859.
- Weaver, L.E., Carta, G., 1996, Protein adsorption on cation exchangers: Comparison of macroporous and gel-composite media, *Biotechnology Progress*, 12, 342-355.

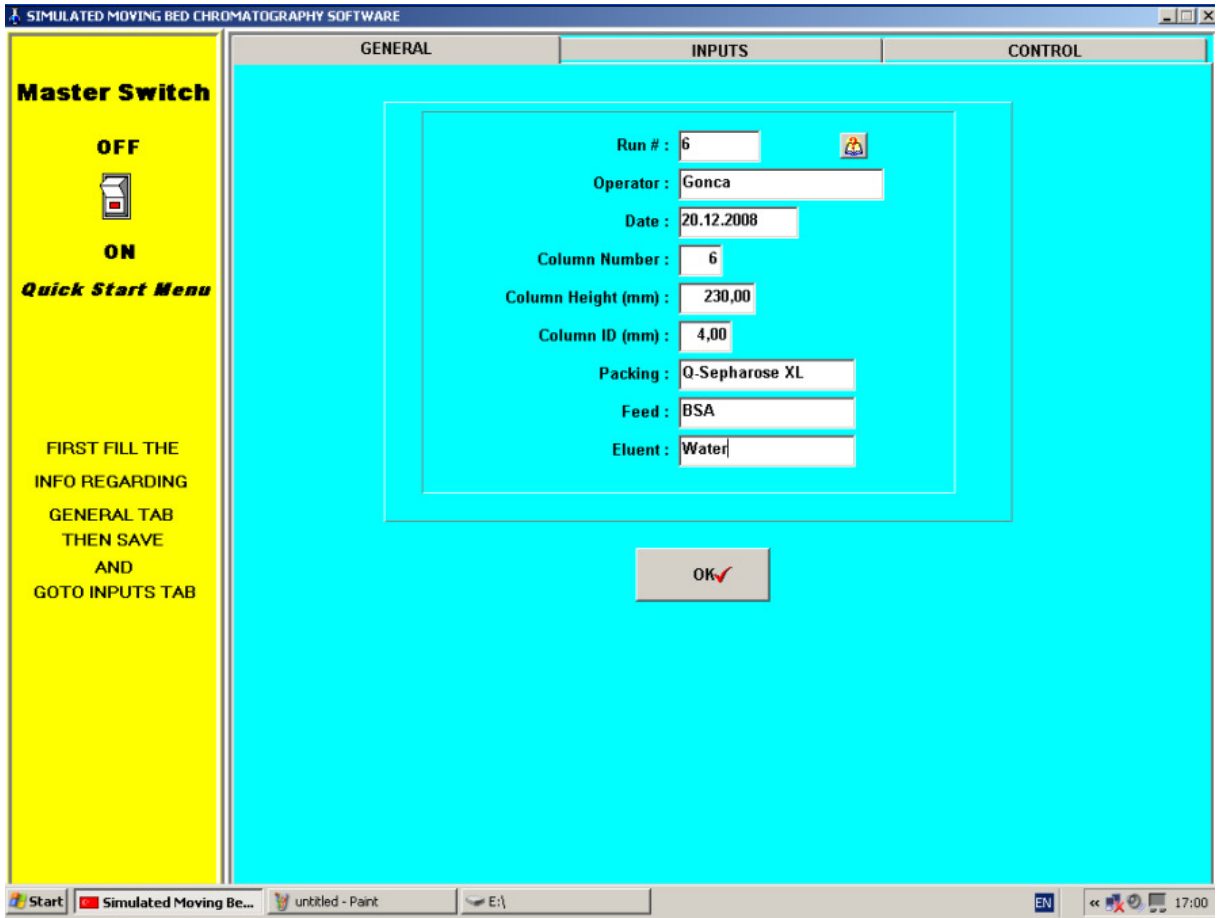
- Wilson, E.J., Geankoplis, C.J., 1966, Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals, 5, 9.
- Wirtschaftspark, V., 1999, Method for charging the particle bed space of a chromatograph, Prior Separation Technology, , A-6840 Götsis, Austria, WO 99/29389 PCT/AT98/00300.
- Wu, D. J., Ma, Z., Wang, H. L., 1999, Optimization of throughput and desorbent consumption in simulated moving-bed chromatography for paclitaxel purification, Journal of Chromatography A, 855, 71-89.
- Yao, C. Tien, 1992, Chem. Eng. Sci. 47, 457.
- Young, L., Jorgensen, S. B., 2004, A fast and accurate numerical method for solving simulated moving bed chromatographic separation problems, Chemical Engineering Science, 59, 1937-1947.
- Yu, H., Ching, C. B., 2003, Modeling, simulation and operation performance of a simulated moving bed for enantioseparation of fluoxetine on new β -cyclodextrin columns, Adsorption, 9, 213-233.
- Zhang, Z., Mazzotti, M., Morbidelli, M., 2004, Continuous chromatographic processes with a small number of columns: Comparison of simulated moving bed with Varicol, PowerFeed, and ModiCon, Korean J. Chem. Eng., 21, 454-464.
- Zhang, Z., Mazzotti, M. and Morbidelli, M., 2003, PowerFeed operation of simulated moving bed units: Changing the flowrates during the switching interval, J. Chromatography A, 1006, 87-99.

9. EKLER

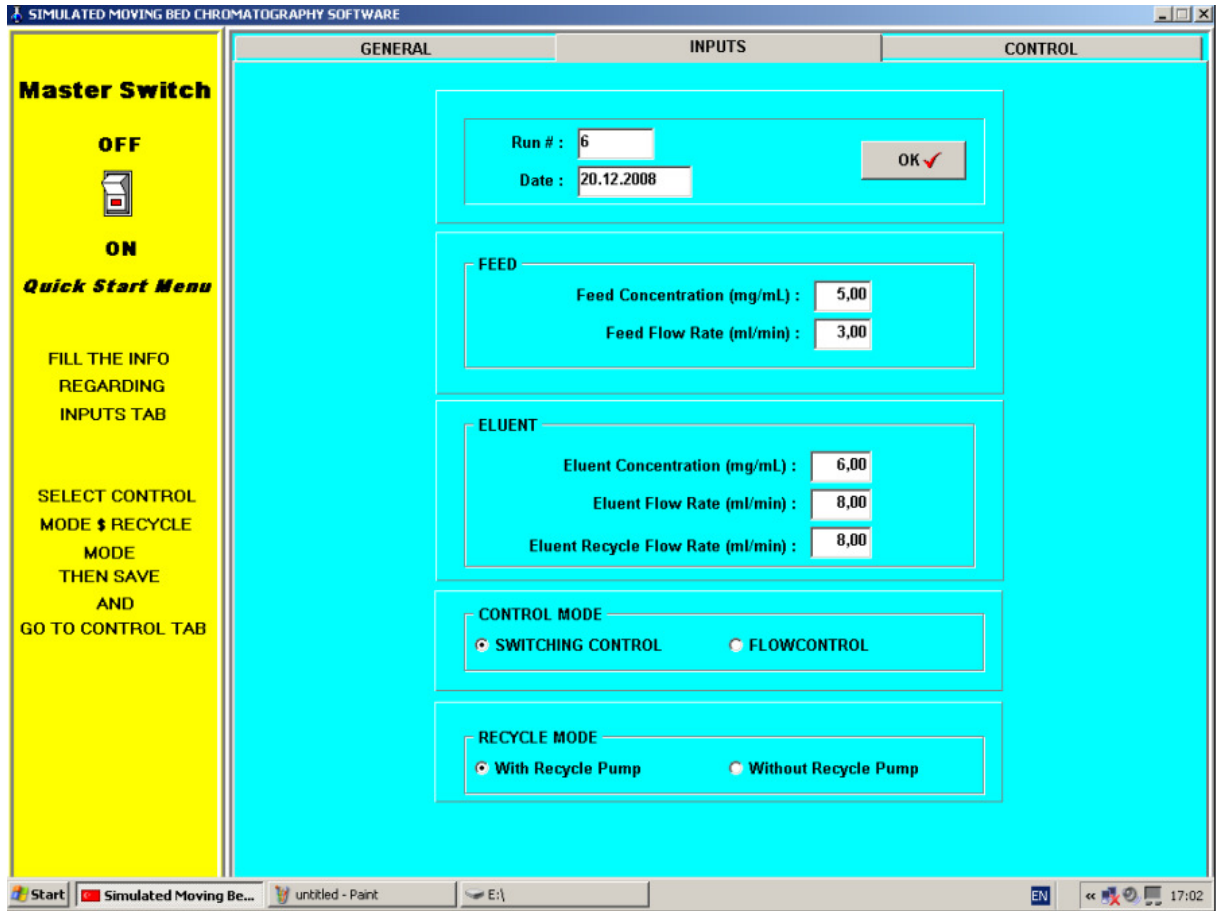
EK 1. HAREKETLİ YATAK BENZETİMLİ KROMATOĞRAF CİHAZI İÇİN HAZIRLANAN SOFTWARE



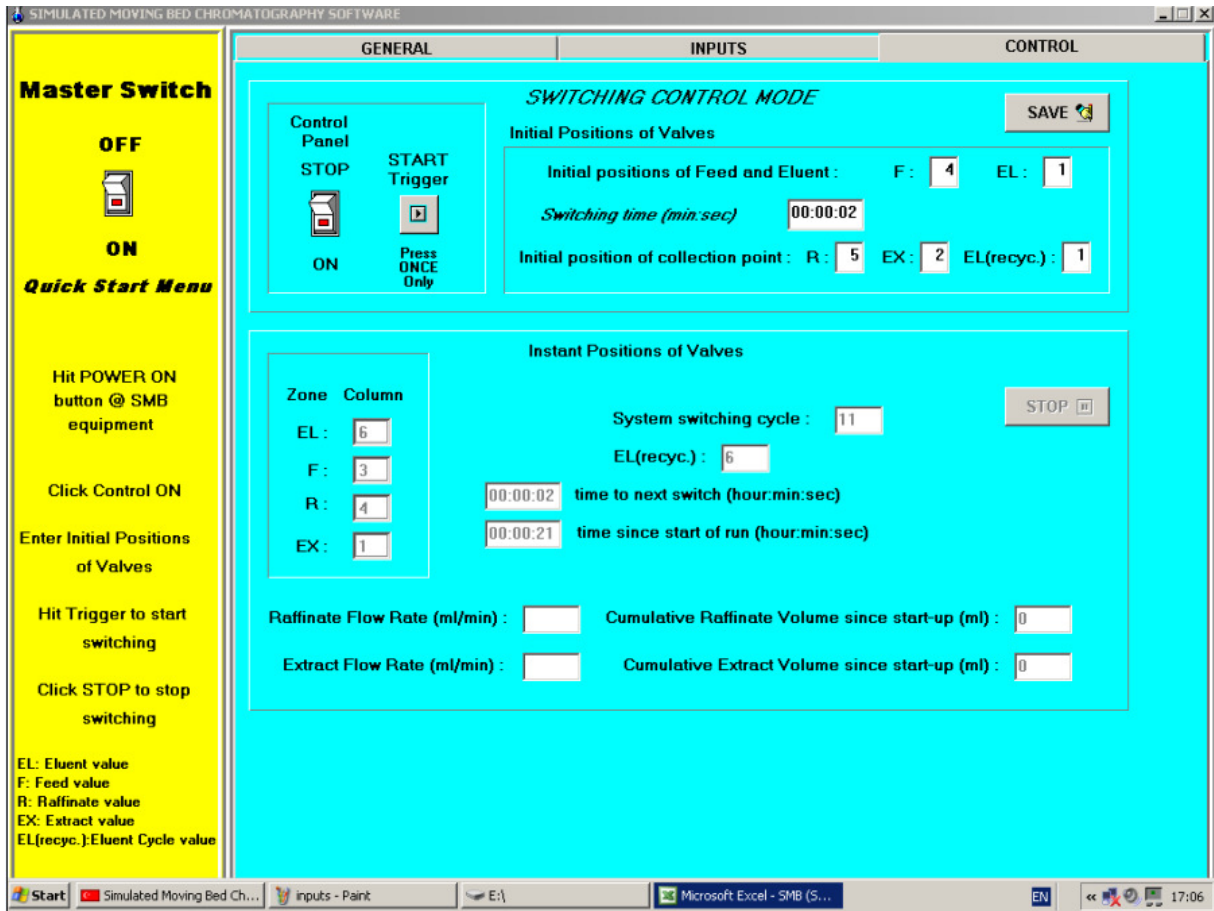
Şekil EK-1(a) SMB Software ana ekran.



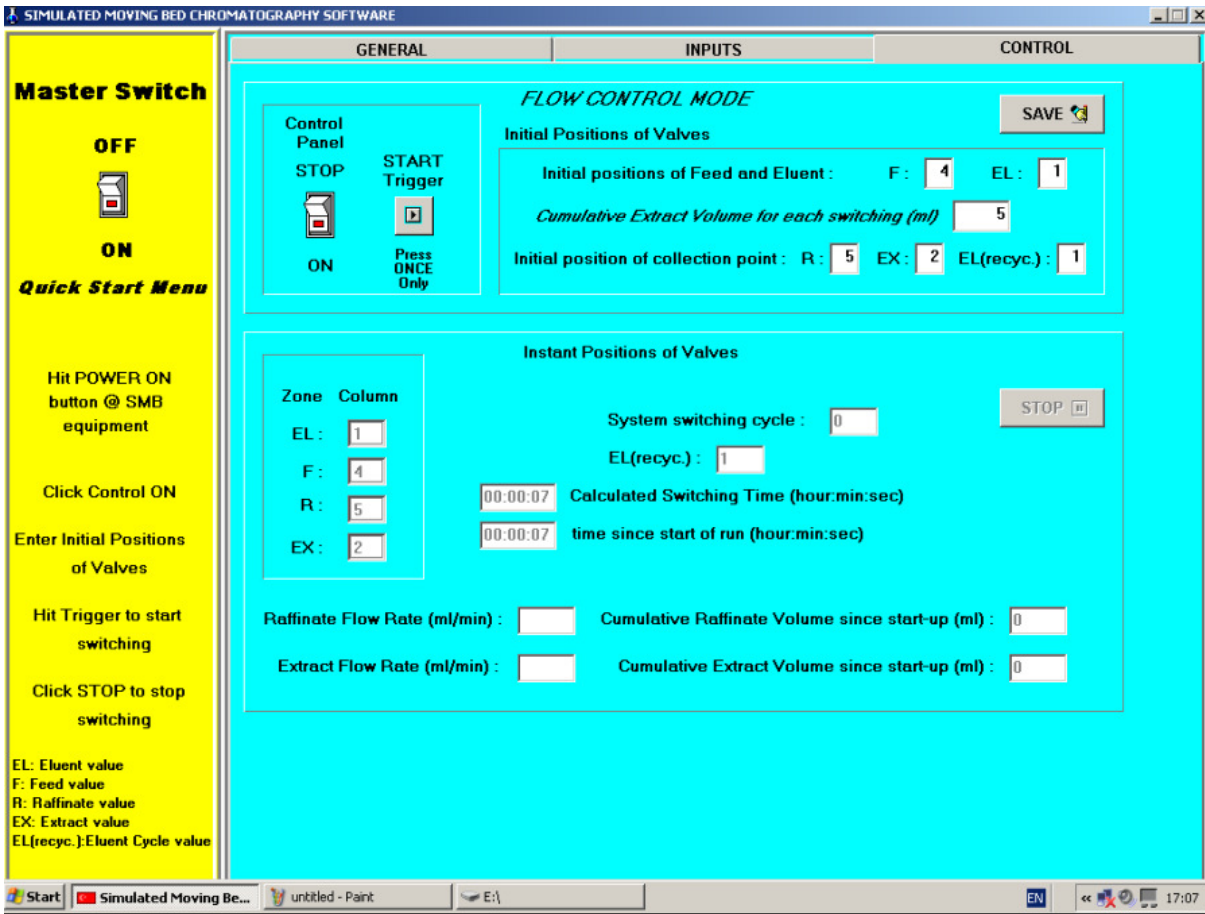
Şekil EK-1(b) SMB Software "GENERAL" tabı.



Şekil EK-1(c) SMB Software "INPUTS" tabı.



Şekil EK-1(d) SMB Software " SWITCHING CONTROL" tabı.



Şekil EK-1(e) SMB Software "FLOW CONTROL" tabı.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1									
2	SWITCHING CONTROL MODE								
3									
4	Switching time (min:sec) = 00:00:02								
5	Run # = 6								
6	Date = 20.12.2008								
7									
8	time(min:sec)	F	EL	R	EX	EL(recyc.)	R conc. (mg/cm³)	EX conc. (mg/cm³)	
9	since start of run								
10	00:00:00	4	1	5	2	1			
11	00:00:02	5	2	6	3	2			
12	00:00:02	6	3	1	4	3			
13	00:00:02	1	4	2	5	4			
14	00:00:02	2	5	3	6	5			
15	00:00:02	3	6	4	1	6			
16	00:00:02	4	1	5	2	1			
17	00:00:02	5	2	6	3	2			

Şekil EK-1(f) SMB Software deney verilerinin aktarıldığı Excel dosyası.

EK 2. SİĞİR KANI ÖN FİLTRASYON İŞLEMLERİ

Bovin Serum Albumin (BSA) Elde Edilmesi çalışması için Eskişehir ve Çubuk mezbahalarında kesilen sığırlardan proje amacıyla 15 Litre kan serumu üretilmiş ve -20 °C da depolanarak kromatografik ayırma için depolanmıştır. Bu şekilde deneyler sırasında kullanılacak serumda bir batch' den diğerine farklılık gözlenmesi olasılığına karşı tedbir alınmıştır. Sığır serumu hazırlanmasında Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Şap Enstitüsü Müdürlüğü ve bu kuruluşun uzman veteriner hekimlerinden danışmanlık ve yardım alınmıştır.

Sığır kan serumları Eskişehir ve Çubuk mezbahalarında kesilen sığırların kanlarından elde edilmiştir. Bu amaçla sığır kanı iki aşamada işlenmiştir. Tüm bu işlemler Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nün kan serumu elde edilmesi hakkındaki yapma bilgisi çerçevesinde yürütülmüştür.

1. AŞAMA

Birinci aşama' da kan mezbahada (kanın toplandığı yerde) aşağıda belirtildiği şekilde işlenmiştir.

- a) Hayvan boğazından kesilip ayağından asıldıktan sonra boynundan akan kan mide içeriği karışmamasına dikkat edilerek plastik leğenlere toplanır.
- b) Toplanan kan paslanmaz çelik defibrinatörlere boşaltılır.
- c) Burada kan içinde bulunan fibrinler defibrinatörün karıştırıcısı üzerinde toplanarak ortamdan uzaklaştırılır.
- d) Defibrinatördeki kan daha sonra paslanmaz çelik elekten süzülerek içinde kalan fibrinlerden ayrılır.
- d) TOMAZS marka plakalı santrifüj yardımıyla kan serumu ayrılarak plastik bidonlara konulur. Etiketlenerek -20 °C de saklanır.

2. AŞAMA

- a) Derin donduruculu kamyonla Şap Enstitüsü Müdürlüğüne nakledilen kan serumu -20 °C da 2. aşama için saklanır.

- b) Plastik bidon içerisinde -20 °C da saklanan kan serumu daha sonraki klarifikasyon ve filtrasyon işlemleri için 50 °C taki sıcak suda çözülmeye bırakılır.
- c) Çözülen serumlar paslanmaz çelik eleklerden “tülbent + pamuk + tülbent” kullanılarak hazırlanan filtre ortamından geçirilerek ilk süzme işlemi tamamlanır. Süzüntü paslanmaz çelik tanka alınarak mekanik karıştırıcı ile 15 dakika süre ile 100 devir/dak hızla karıştırılır.
- d) Karıştırılan süzüntünün klarifikasyonu plakalı filtreler (SEITZ, Almanya) kullanılarak yapılır. Bu şekilde klarifiye edilen kan serumu, aşağıda açıklandığı şekilde birbirini takip eden dört farklı filtrasyon işlemine tabi tutulur.
- e) İlk önce sıkıştırılmış selüloz (Seitz, K7 grade, Almanya) depth filtreden (15 – 6 µm) basınçlı hava yardımıyla süzülen kan serumu paslanmaz çelik tankta toplanır.
- f) Daha sonra (Seitz, EKI grade, Almanya) depth filtreden (2 – 0.5 µm) basınçlı hava yardımıyla süzülen kan serumu başka bir paslanmaz çelik tankta toplanır.
- g) Bu toplanan serum üçüncü olarak basınçlı hava yardımıyla 75 cm boyunda, 0,6 µm gözenekli polipropilen kartuş filtrelerden süzülür ve yine paslanmaz çelik tankta toplanır.
- h) Son olarak kan serumu yine basınçlı hava yardımıyla fakat bu sefer 75 cm, 0,2 µm; polietersulfon (PES) kartuş filtrelerden süzülür. Bu şekilde son filtrasyon işlemi tamamlanan kan serumu hepsine tek bir batch numarası verilerek proje kapsamında BSA saflaştırması yapılmak üzere 500 ml hacmindeki plastik şişelere doldurulur -20 °C de dondurularak saklanır

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : **Gonca SAĞLAM**

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : **1985**

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise 1999-2002 : T.E.D. Ankara Koleji.

Lisans 2002-2006 : Kimya Mühendisliği Bölümü,
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Yabancı Dil : İngilizce

İş deneyimi : Araştırma Görevlisi (2007 - ...)

Hacettepe Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi
Kimya Mühendisliği Bölümü