

## HPLC ve Kağıt Kromatografisi Tekniklerinin Kombinasyonu ile Flavonoidlerin Saflaştırılması

Dr. Sedat VELİOĞLU — Prof. Dr. Bekir CEMEROĞLU

A. Ü. Ziraat Fakültesi, Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü — ANKARA

### ÖZET

Bu çalışmada, kağıt kromatografisi ve yüksek basınç likit kromatografisi (HPLC) yöntemlerinin birlikte uygulanması ile flavonoidlerin saf olarak elde edilme olanakları incelenmiştir. Whatman 3MM kromatografi kağıdı ve BAW solvent sistemi kullanılarak inen tipte kağıt kromatografisi tekniğiyle 7 bant elde edilmiş ve bu bantlar üzerindeki flavonoidler MAW solvent sistemiyle elue edildikten sonra HPLC kolonuna enjekte edilmiştir. Araştırma bulguları, bu yolla 15 adet pikin saf olarak elde edilebileceğini göstermiştir. Yöntemin, karmaşık yapıdaki diğer bazı bileşiklerin saflaştırılması amacıyla da kullanılabileceği düşünülmektedir.

### ABSTRACT

#### PURIFICATION OF FLAVONOIDS BY COMBINING HPLC AND PAPER CHROMATOGRAPHY TECHNIQUES

Separation of flavonoids by the combining of descending paper chromatography and High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) techniques were investigated. For paper chromatography Whatman 3MM chromatography paper and BAW solvent were used and 7 bands obtained. Flavonoids on the bands were eluted with MAW solvent and injected to the HPLC column. Results revealed that 15 peaks can be obtained purely. This method could be used for purification of different kinds of complex compounds.

### GİRİŞ

Yüksek basınç likit kromatografisi'nin (HPLC) nitel ve nicel analizlerdeki kullanım alanları son 10 yılda büyük bir artış göstermiştir. Önceleri kağıt ve ince tabaka kromatografisi yöntemlerine dayalı analiz yöntemleri, günümüzde yerini büyük ölçüde HPLC yöntemine bırakmıştır. Bu yöntem kullanılarak son derece karmaşık yapıdaki maddelerin kimyasal yapıları geniş ölçüde aydınlatılmıştır. HPLC'nin en büyük avantajı duyarlılığı, hızı ve nicel analizde kullanım kolaylığıdır.

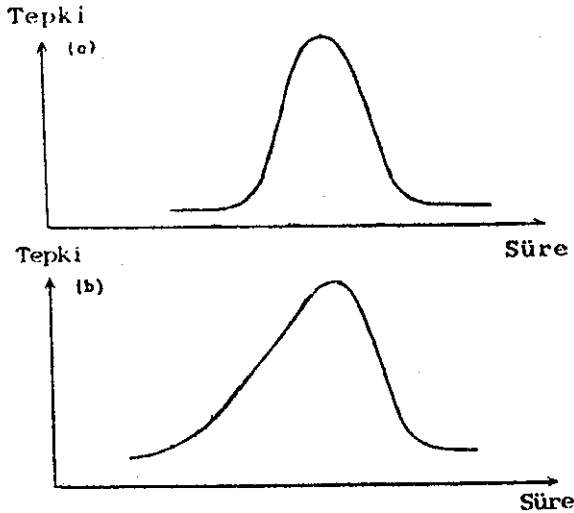
HPLC ile bileşiklerin tanımlanmasında esas ilke, piklerin dedektöre geliş zamanlarının, standardın geliş zamanı ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bunun yanı sıra piklerin tanımlanmasında pikin spektral karakteristikleri büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle spektral dedektörler geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. Spektral dedektörlerin yanı sıra daha az kullanılmakla birlikte floresan dedektörleri, elektrokimyasal dedektörler, refraktif indeks dedektörleri ve viskozimetrik dedektörler de değişik amaçlarla kullanılmaktadır.

Yukarıda da değinildiği gibi HPLC ile yapılan analizlerde standart maddenin kullanılması zorunludur. Ancak pek çok durumda gerekli bazı standartların sağlanması mümkün olamamaktadır. Örneğin, yalnızca flavonoidlerin tanımlanmasında binin üzerindeki standart maddeye gereksinim duyulmaktadır. Bu maddelerin büyük çoğunluğu ise ticari olarak piyasada bulunmamaktadır. Bu durumda, piklerin tek tek toplanması ve standardının kullanılmasına gerek kalmaksızın diğer analiz yöntemleri ile tanısının sağlanması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır.

Bilindiği gibi HPLC sistemlerinde kolona enjekte edilebilecek örnek miktarı son derece sınırlıdır ve bu miktar 20-100 µL arasında değişmektedir. Kolona 100 µL örnek enjekte edilebildiği, örneğin 25 adet bileşik içerdiği ve bunların da miktarlarının eşit olduğu varsayılırsa, bu durumda teorik olarak kolon çıkışından her bir bileşikten ancak 4'er µL alınabilecektir. Bu 4 µL düzeyindeki örnek, ileri analiz yöntemleri uygulamak için son derece yetersiz bir miktardır. Üstelik bu hacimin büyük bir kısmı incelenecek olan saf bileşik olmayıp, içerisinde örneğin çözündürüldüğü çözücü maddedir. Ayrıca, pikler çoğu zaman kendisinden bir önce veya bir sonra kolondan ayrılan pik ile az veya çok karışmış durumdadır. İleri analizler için saf maddeye gereksinim duyul-

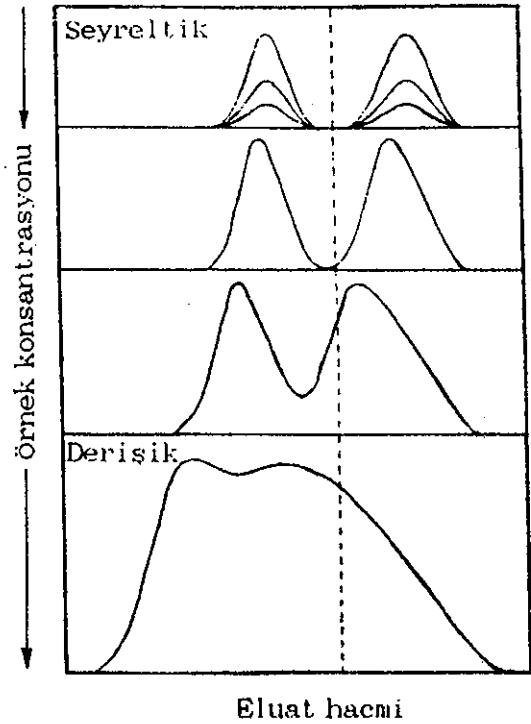
\* Bu araştırma makalesi TÜBİTAK (Ankara) tarafından desteklenen TOAG 669 nolu proje çalışmasının bir bölümünden hazırlanmıştır.

duğu düşünöldüğünde bu durum büyük bir olumsuzluk oluşturmaktadır. Bu durumda sürükleyici solventin oranı (linear gradient) azaltılarak program (run) süresinin uzatılması da soruna çözüm getirmemektedir. Bu şekilde hareket edildiği takdirde piklerin keskinliği (sharpness) azalmakta ve pikler yayvanlaşmaktadır (broadness). HPLC ile yapılan analizlerde kolona enjekte edilecek örneğin yoğunlaştırılarak kullanılması, ilk başta bir çözüm olarak akla gelebilmektedir. Bu uygulamada ise bu kez piklerin birbirlerinden ayrılma dereceleri yani kapasite faktörleri ( $k'$ ) büyük ölçüde azalmaktadır (Şekil 1) (Macrae 1982). Bunun yanı sıra piklerin geliş zamanları ( $t_r$ ) da değişmektedir (Şekil 2) (Macrae 1982).



Şekil 1. Kolona enjekte edilen örneğin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak kapasite faktöründe görülen azalma (a: normal konsantrasyon, b: yüksek konsantrasyon) (Macrae 1982).

Özetle, karışımı oluşturan piklerin HPLC ile tek tek toplanıp ayrılması pek akılcı bir yöntem gibi görünmemektedir. Bu durumda yapılacak işlem, karışımı preparatif yüksek basınç likit kromatografisi (P-HPLC), kağıt kromatografisi (PC), ince tabaka kromatografisi (TLC) veya kolon kromatografisi (CC) gibi yöntemlerden birisi ile ön arıtmaya tabi tutmaktır. Bu araştırmada gül petallerinin flavonoidleri kağıt kromatografisi ile ön arıtmaya tabi tutularak bileşiklerin fraksiyonlar halinde kısmi saflaştırılması ve bunu izleyerek HPLC uygulamasıyla piklerin saf olarak elde edilmesi olanakları incelenmiştir.



Şekil 2. Kolona enjekte edilen örneğin konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak piklerin ayrılmasında görülen azalma ve geliş zamanlarının değişimi (Macrae 1982).

## MATERYAL VE METOT

1. **Materyal** : Araştırma materyali olarak, Isparta'da esas olarak gül yağı üretimi amacıyla kullanılan Isparta Gülü (*Rosa damascena*) taç yaprakları kullanılmıştır.

### 2. Metot :

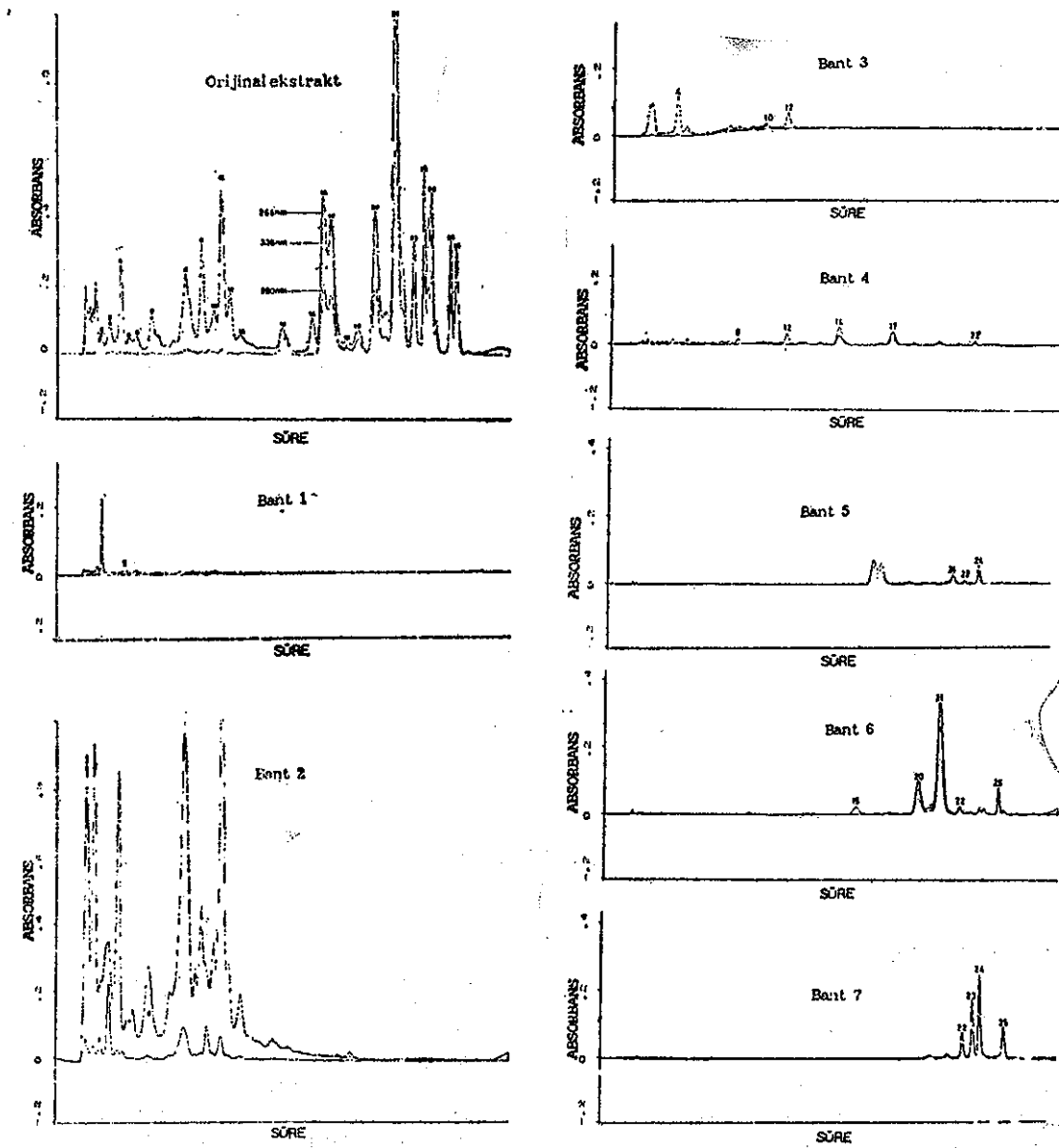
2.1. **Flavonoidlerin Yapraklardan Ekstraksiyonu** : 10 gram gül yaprağı MAW (Metanol : Asetik asit : Su, 10 : 1 : 9) çözeltisi ile bir blenderde parçalanmış ve ekstrakt Whatman No: 2 filtre kağıdından süzölmüştür. Filtre kağıdı üzerinde kalan tortu, aynı çözelti ile rengi tamamen giderilinceye kadar yıkanmıştır. Süzöntü bir rotary evaporatörde, 40°C sıcaklıkta yaklaşık 2-3 mL kalıncaya kadar evapore edilmiştir (Takeda vd 1989).

2.2. **Kağıt Kromatografisi** : Ekstrakt, 46x57 cm boyutlarındaki Whatman 3MM kağıdının kısa kenarına şerit halinde uygulanmış ve kuruduktan sonra yukarıdan inen (descending) kağıt kromatografisi tekniğine göre develope edilmiştir. Sistemde BAW (Butanol : Asetik asit : Su, 4:1:5) solventleri karışımının üst fazı kullanılmıştır (Markham 1982). Develope işlemi takiben çeker ocak altında kurutulan kromatografi kağıdı, ultraviyole ışık altında incelenmiş

ve 7 bant gözlenmiştir. Bu bantlar UV ışık altında makasla kesilmiş, her biri 2.1'de belirtilen MAW solventi kullanılarak gene lineer tipte kağıt kromatografisi tekniği ile elue edilmiştir. Flavonoidleri içeren bu eluatlar ayrı ayrı toplanıp 40°C sıcaklıkta rotary evaporatörde yoğunlaştırılmış ve gözenek çapı 0,45 µm olan Millipore filtreden süzülerek HPLC kolonuna uygulanmıştır.

**2.3. Yüksek Basınç Likit Kromatografisi :** Araştırmada kullanılan HPLC sistemi (LKB-

Bromma, İsveç), 2 adet pompa (LKB Model 2150), kontrol ünitesi (LKB Model 2152), 20 veya 100 µl'lik lup içeren Rheodyne 7125 enjeksiyon ünitesi, ultrapak dolgulu 250x4,6 mm x10 µm boyutlarında Spheri 10 RP18 kolon (Brownlee Labs, Santa Clara, CA, ABD), fotodiyot array dedektör (LKB Model 2140) ve fraksiyon toplayıcıdan (LKB Model 2211 Suprac) oluşmaktadır. Tüm sistem IBM PC bilgisayara ve Canon A-1210 renkli yazıcıya bağlantılıdır.



**Şekil 3.** Orişinal örneğin ve kağıt kromatografisi ile elde olunan bantların HPLC ile elde olunan kromatogramları (FSD: 1.000; Süre: her bölüm 200 saniye).

Yapılan ön denemeler sonucunda belirlenmiş bulunan solvent sistemi ve eluasyon profili aşağıda açıklanmıştır :

Solvent A : formik asit - su; 5:95 v/v, solvent B : metanol. Eluasyon profili : 0 - 10 dak, % 17 - 22 B (linear gradient), 10 - 12 dak, % 22 - 27 B; 12 - 33 dak, % 27 - 37 B; 33 - 39 dak, % 37 - 55 B; 39 - 49 dak, % 55 - 59 B. Solvent akış hızı : 1 mL/dak, kolon basıncı : 34 - 40 bar'dir. Ayırma işlemleri 22 + 1°C'de yapılmıştır.

Solventler işlem öncesinde 0,45 µm'lik filtreden süzöldükten ve gaz çıkarma işlemi uygulandıktan sonra analizde kullanılmıştır. Dedeksiyon işlemi 190 - 370 nm'ler arasında yapılmıştır. Piklerin geliş sürelerinin ve spektral niteliklerinin hesaplanmasında Wavescan, Ver. 1,07 (LKB 2140 - 202) kodlu bilgisayar programından yararlanılmıştır.

Bu sistem kullanılarak tek tek ve saf olarak toplanan pikler, daha ileri analiz metodları kullanılarak tanımlanmıştır. Piklerin tanısının yapılmasıyla ilgili çalışmalar bu makalenin kapsamı dışında bırakıldığı için burada bunlara yer verilmemiştir. Bu hususta Velloğlu ve Mazza (1991) tarafından yayımlanmış makalede daha fazla ayrıntı bulunmaktadır.

#### ARAŞTIRMA BULGULARI

Orijinal ekstraktın HPLC ile elde olunan kromatogramı ile BAW solventi kullanılarak kağıt kromatografisi ile elde olunan 7 adet bantın HPLC kromatogramları Şekil 3'de verilmiştir.

Kromatogramlardan görüldüğü gibi 7 bantın 6'sından pikleri tek tek elde etmek mümkün olmaktadır. 2 nolu banttaki piklerin tek tek elde edilmesi için, banttaki piklerin elde edilen eluata kağıt kromatografisi tekniği ile ve farklı solventler kullanılarak 6 kez daha saflaştırma işlemi uygulanmış, ancak yine başarı sağlanamamıştır. Bu banttaki antosiyanin pigmenti (8 nolu pik) daha sonra kolon kromatografisi ile Sephadex LH-20 adlı reçine kullanılarak oldukça yüksek bir saflıkta elde edilmiş ve bunu izleyerek HPLC ile son saflaştırma gerçekleştirilmiştir. Bu bantın dışındaki diğer 6 banttaki toplam 15 adet pikin saf olarak elde edilebileceği açıkça görülmektedir. Özellikle birbirine çok geçmiş olan 23 ve 24 nolu piklerin birbirlerinden ayrılması bu yöntem ile başarılmıştır. Şekillerden görüldüğü gibi her bir bantta ortalama olarak 4 adet pik bulunmaktadır. Kolona 100 µL örnek enjekte edilmesi durumunda her bir pikten 25 µL saf bileşik elde edilebilecektir. Enjeksiyonun birkaç kez tekrar edilmesi ile, ileri analiz yöntemleri için yeterli miktarda saf bileşik elde edilebilecektir. Verilmiş bulunan tüm kromatogramlarda FSD (Full Scale Deviation) değeri 1,000 olarak alınmıştır. Bu nedenle bazı piklerin küçük görünmesi bir sakınca oluşturmamaktadır. Bu piklerin, toplama sırasında bilgisayar ekranında çok küçük görünmesinin önlenmesi için FSD değeri daha küçük değerlere, örneğin 0,200'ye ayarlandığı takdirde bu sorun da ortadan kaldırılabilir.

#### KAYNAKLAR

- (1) Macrae, R., 1982. Theory of Liquid Column Chromatography. In «HPLC in Food Analysis» Academic Press. London, New York. R. Macrae (Ed.). 1 - 26.
- (2) Markham, K.R., 1982. Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press. London. New York, Paris. 113 s.
- (3) Takeda, K., Enoki, S., Harborne, J.B., Eagles, J., 1989. Malonated Anthocyanins in Malvaceae: Malonyl malvin from *Malva sylvestris*. Phytochem. 28: 499 - 500.
- (4) Velloğlu, Y.S., Mazza, G., 1991. Characterization of Flavonoids in Petals of *Rosa damascena* by HPLC and Spectral Analysis. J. Agric. Food. Chem. 39: 463 - 467.