

Rapana venosa'da Bulunan İndigoid Boyarmaddelerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi - Diyod-sıralı Dedektör (HPLC-DAD) ile Belirlenmesi

Çağlar DEMİRBAĞ, Serap AYAZ SEYHAN, Emre DÖLEN

ÖZET

İndigo ve indigoid boyarmaddeler deniz kabuklularında bulunurlar ve Roma öncesi zamandan beri bilinmektedirler. İndigoid boyar maddeler tekstil, gıda, ilaç ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadırlar. Günümüzde kanser ve diyabet gibi bazı önemli hastalıkların tedavisi için indigoid boyarmaddelerin yeni analogları sentezlenmektedir. İndigo ve indigoid boyarmaddeler birçok deniz kabuklusu türünden elde edilmektedir. Bu türlerden biriside *Rapana venosa* (Sinonimleri: *Rapana thomasiana* or *pontica*)'dır. Bu çalışmanın amacı *Rapana venosa* türünde bulunan indigoid boyarmaddelerin diyod-sıralı dedektörle beraber ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi ile belirlenmesidir. Yedi adet indigo türevi boyarmaddenin bir arada ayrılması için ters faz kromatografik yöntem geliştirildi. kromatografik ayrılma C18 kolon, hareketli faz olarak asetonitril/su/

trifloroasetik asit sistemi ve dereceli elüsyon ile sağlanmıştır. *Rapana venosa* dimetilsülfoksit ekstresinde aynı yöntemle analiz edilmiştir. Bu çalışmada elde edilen kromatogramlar ve maddelerin uv/vis spektrumları kıyaslanarak *Rapana venosa* ekstresinde 6,6'-dibromoindirubin ve 6,6'-dibromoindigotin boyarmaddelerin bulunduğu belirlenmiştir. Sentetik boyaların çevre ve insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri nedeniyle toksisiteyi çok daha az olan doğal boyaların kullanım oranları giderek artmaktadır. Bu nedenle doğal boya kaynaklarının üretilmesi ve yeni kaynakların bulunması önemlidir. *Rapana venosa* 6,6'-dibromoindirubin ve 6,6'-dibromoindigotin boyarmaddelerinin elde edilmesi için kaynak olarak kullanılabilir.

Anahar Kelimeler: İndigo, 6,6'-dibromoindirubin, 6,6'-dibromoindigotin, Doğal boya, *Rapana venosa*, HPLC

Çağlar Demirbağ
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD
Tıbbiye Cad. 34668 İstanbul- TÜRKİYE
E-posta: cdemirbag@marmara.edu.tr
caglardemirbag@gmail.com

Serap Ayaz Seyhan
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD
E posta: sayaz@marmara.edu.tr

Emre Dölen
emredolen@gmail.com

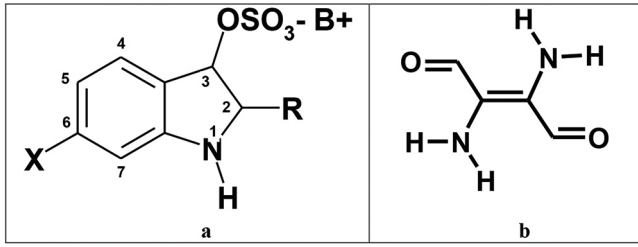
Yazı Sorumlusu:

Çağlar Demirbağ
Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya ABD
Tıbbiye Cad. 34668 İstanbul- TÜRKİYE
Tel: 00 90 216 414 29 62
Fax: 00 90 216 345 29 52
E-posta: cdemirbag@marmara.edu.tr
caglardemirbag@gmail.com

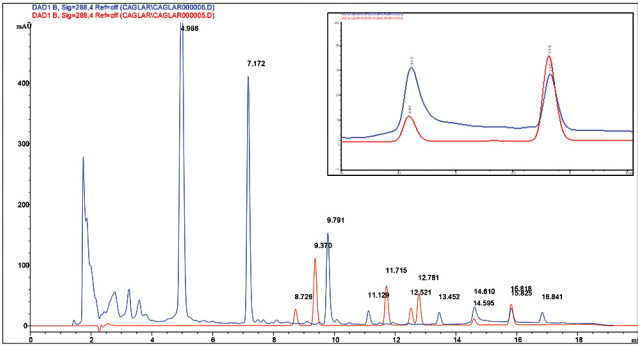
GİRİŞ

Bitki, hayvan, mantar gibi kaynaklardan elde edilen indigotin, antrakinin, flavon ve flavonol gibi bileşikler boya ve pigment olarak kullanılan doğal boyarmaddelerdir. Doğal boyarmaddeler tarih öncesi zamanlardan beri tekstil, duvar resimleri, seramik desenleri gibi birçok alanda kullanılmışlardır (1).

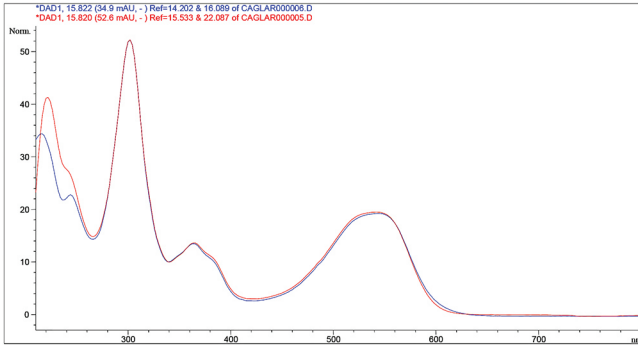
İndirubin, 6-bromo indirubin, 6'-bromo indirubin, 6,6'-dibromo indirubin, indigotin, 6-bromo indigotin ve 6,6'-dibromo indigotin deniz kabuklularının Muricidae familyasına ait türlerde bulunan prekürsör maddelerden elde edilen doğal boyarmaddelerdir. Bu boyarmaddeler bilinen en eski ve dünyada ilk endüstrisi yapılmış renklendiricilerdir. M.Ö. 13. yüzyıl civarında Lübnan'da üretiminin yapıldığına dair kanıtlar mevcuttur (1, 2).



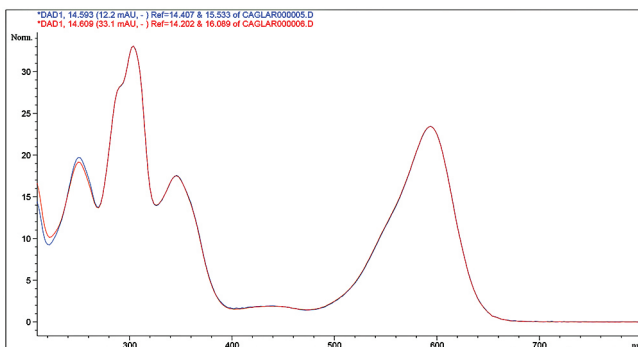
Şekil 1: Deniz kabuklularının hipobranşiyal salgı bezinde bulunan a) kromojen grupları ve b) indigonon kromofor grubu



Şekil 2: Kromatogram; λ : 288 nm: İndigoid boyarmadde standartlarının karışımı (kırmızı) ve *Rapana venosa* DMSO ekstresi (mavi)



Şekil 3. Uv/vis spektrum: 6,6'-dibromoindirubin (kırmızı) ve *Rapana venosa* DMSO ekstresi (mavi)



Şekil 4. Uv/vis spektrum: 6,6'-dibromoindirubin (kırmızı) ve *Rapana venosa* DMSO ekstresi (mavi)

Tablo 1. Dereceli elüsyon tablosu

t (dk)	H ₂ O-%0.1TFA (%)	ACN-%0.1TFA (%)
0	50	50
25	5	95
28	50	50

Pigmentlerin oluşabilmesi için gerekli prekürsörler veya diğer adıyla kromojen gruplar deniz kabuklusunun hipobranşiyal salgı bezinden elde edilir. İndoksilin sülfat esterleri olan bu kromojen gruplar suda çözünebilir, renksiz maddelerdir. Türlerin taşıdığı kromojenlerin farklılığı molekülün iki ve altı pozisyonlarında taşıdıkları süstituentlerin farklılıklarından kaynaklanmaktadır (Şekil 1). İki numaralı pozisyonda sülfür içeren bir süstituent varsa boyarmaddenin oluşabilmesi için fotokimyasal bir reaksiyon gereklidir. Boyarmaddenin renk tonunu belirleyen ise altı numaralı pozisyonda bromun varlığı veya yokluğudur (3).

Kabuğun kırılıp salgı bezinin çıkarılmasından sonra ölmeye başlayan hücrelerin içerikleri serbest kalır ve böylece prekürsör moleküller aril-sülfataz, purpuraz ve bromoperoksidaz enzimleriyle reaksiyona girerek hidroliz olurlar. Hidroliz sonucunda sarı renkli indoksil türevleri oluşur. İndoksil türevleri ışığa maruz bırakıldığında meydana gelen fotokimyasal reaksiyon sonucunda süflürlü süstituentleri serbest kalır ve mor renkli boyarmadde oluşur. Kuvvetli gün ışığında tüm bu işlemler on dakika gibi kısa bir sürede tamamlanır. İki pozisyonunda süstituent taşımayan indoksil türevleri havayla okside olarak fotokimyasal reaksiyona ihtiyaç duymadan indigoid pigmentlere dönüşür. İşlem sonucunda oluşan mor bileşik indirubin, 6-monobromoindirubin, 6'-monobromoindirubin, 6,6'-dibromoindirubin, 6-monobromoindirubin, 6,6'-dibromoindirubin ve bazı durumlarda eser miktarda isatin içerebilir (3-5).

İndirubin kronik hastalıkların tedavisinde kullanılan geleneksel bir Çin ilacı reçetesi olan Danggui Longhui Wan'ın aktif bileşenidir (6). Hücrede farklılaşma, büyüme ve proliferasyon, hücre metabolik işlemler, apoptosis kontrolü ve nöron fonksiyonlarında rol alan protein kinaz grubu enzimlere bağlanarak onları etkili veya etkisiz hale getirebilecek ilaç molekülleri üzerinde çalışmalar vardır (7). İndirubin ve analoglarının kanser, diyabet, alzheimer, bipolar bozukluk ve inflamasyon gibi hastalıkların tedavisinde hedef molekül olarak kullanılan protein kinaz enzimlerine Van der Waals ve hidrojen bağları ile bağlanarak kompleks oluşturdukları ve indirubin-3'-monoksim adlı analog molekülün büyük oranda hücre proliferasyonunu engellediği gözlenmiştir. İndirubin ve

Tablo 2. İndigoid boyarmaddeler

Moleküler Yapı	Süstitüent		Yaygın ismi	IUPAC ismi
	X ₆	X ₆ '		
	-	-	İndigotin	(E)-1H,1'H-[2,2']Biindolylidene-3,3'-dione
	Br	-	6-bromoindigotin	(E)-6-Bromo-1H,1'H-[2,2']biindolylidene-3,3'-dione
	Br	Br	6,6'-dibromoindigotin	(E)-6,6'-Dibromo-1H,1'H-[2,2']biindolylidene-3,3'-dione
	-	-	İndirubin	(Z)-1H,1'H [2,3']Biindolylidene-3,2'-dione
	Br	-	6-bromoindirubin	(Z)-1H,1'H [2,3']Biindolylidene-3,2'-dione
	-	Br	6'-bromoindirubin	(Z)-6'-Bromo-1H,1'H [2,3']biindolylidene-3,2'-dione
	Br	Br	6,6'-dibromoindirubin	(Z)-6,6'-Dibromo-1H,1'H-[2,3']biindolylidene-3,2'-dione

Deni kabuklularında bulunan indigo türebi boyarmaddelerin süstitüent varlığına göre yaygın ve IUPAC isimlendirmeleri

analoglarında protein kinazlar grubu bir enzim olan ve kanser hücrelerinin döngülerinde yer alan siklin-dependent kinaz (SDK) enzimlerini inhibe ettiği (6-8), 6-bromo indirubin ve onun sentetik türebi olan 6-bromo indirubin-3'-oksimin de GSK'ın selektif inhibitörleri olduğu bildirilmiştir (9, 10). Yapılan hayvan deneylerinde indirubinün kemik iliğini ve hemopoetik kök hücrelerini baskılamadığı gözlemlenmiştir. İndirubinün çözünürlüğünün ve emiliminin düşük olması nedeniyle bir çok analogu üretilmiştir ve bu analoglardan indirubin-3'-monoksimin bir çok tümör üzerinde indirubinün kendisi kadar etkili ve toksisitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir (11). Yapılan uzun dönem deneylerde karaciğer hasarı ve ishal gözlenmiş ancak hematopoez, elektroensefelogram aktivitesi ve böbrek fonksiyonlarında bir değişiklik görülmemiştir (6).

İndigo ve indigoid boyarmaddelerin bulunduğu bir diğer deniz kabuklusuda *Rapana venosa* (Sinonimleri: *Rapana thomasi* or *pontica*)'dır. Asya kökenli olan bu deniz kabuklusu Karadeniz'de istilacı bir tür olarak bulunmaktadır (12). Çalışmanın amacı *Rapana venosa* türünde bulunan indigoid boyarmaddelerin belirlenmesidir. Analizde diyod-sıralı dedektörle beraber ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemi kullanılacaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan N,N-Dimetilformamid (DMF)-Merck; Trifloroasetik asit (TFA)-Merck; Asetonitril (ACN)-Merck;

Dimetil sülfoksit (DMSO)-Sigma Aldrich; İndigotin -Sigma Aldrich firmalarından temin edilmiş; indirubin, 6-bromo indirubin, 6'-bromo indirubin, 6,6'-dibromo indirubin, 6-bromo indigotin ve 6,6'-dibromo indigotin boyarmaddelerinin ticari satışı mevcut olmadığından Avrupa Birliği 6. Çerçeve Programı FP6-2003-INCO-MPC-2 numaralı proje kapsamında sentezlenmişlerdir. İndigoid boyarmaddelerin molekül yapıları ve IUPAC isimlendirmeleri Tablo 1'de verilmiştir.

Standart Boyarmadde Çözeltilerinin Hazırlanması

İndirubin, 6-bromo indirubin, 6'-bromo indirubin, 6,6'-dibromo indirubin, indigotin, 6-bromo indigotin ve 6,6'-dibromo indigotin stok çözeltileri; konsantrasyonları 1mg/mL olacak şekilde, 10 mL'lik balon jöjelerde, çözücü olarak N,N-dimetil formamid (DMF) kullanılarak hazırlanmıştır. Stok çözeltiler DMF ile seyreltilip 0.45 µm naylon şırınga filtresinden geçirilerek HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

Rapana venosa Numunelerinin Hazırlanması

Kabukları kırılan 20 adet deniz kabuklusunun (*Rapana venosa*) hipobranşiyal salgı bezleri çıkarılmıştır. Salgı bezi içeriği süzgeç kağıtlarının üstüne sürülmüş ve 2 saat 254 nm uv ışığa maruz bırakılmıştır. Fotokimyasal reaksiyon sonucunda mor rengi alan süzgeç kağıtları küçük parçalar halinde kesilmiş ve 50 mL DMF çözücüsünde 100 °C'de 5 dakika ısıtıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığına gelmesi

için soğumaya bırakılmış ve siyah bantlı süzgeç kağıdından süzülmüştür. Elde edilen süzüntü 10000 rpm devirde 10 dakika santrifüjlenmiş ve süpernatant kısmı 0.45 µm naylon şırınga filtresinden geçirilip DMF ile seyreltildikten sonra HPLC sistemine enjekte edilmiştir.

HPLC Sistemi ve Kromatografik Koşullar

Deniz kabuklularından elde edilen boyarmaddelerin ayrılması ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisinde dereceli elüsyonla sağlanmıştır. Çalışmada Agilent 1260 serisi HPLC, diyod sıralı dedektör ve Chemstation veri işleme programı kullanılmıştır.

Analizlerde sabit faz olarak Nova-Pak C18 (3,9x150 mm, 4mm Part No: WAT086344 Waters) analitik kolon hareketli faz olarak %0,1 trifloroasetik asit (TFA) içeren asetonitril (ACN) ve %0,1 trifloroasetik asit (TFA) içeren bidistile sudan olu_an çözücü sistemi kullanılmıştır. Kolon sıcaklığı: 38 °C ve hareketli faz akış hızı: 0,5 mL/dk'dır. Analizler 288 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırmayı sağlayabilmek için Tablo 1'de verilen dereceli elüsyon sistemi kullanılmıştır. Örnekler kromatografik sisteme otomatik örnekleyici aracılığı ile enjeksiyon hacmi 15–50 µL olacak şekilde enjekte edilmiştir. Her enjeksiyondan sonra kolondan 10 dakika hareketli faz geçirilmiştir.

İndirubin, 6-bromo indirubin, 6'-bromo indirubin, 6,6'-dibromo indirubin, indigotin, 6-bromo indigotin ve 6,6'-dibromo indigotinin çalışma çözeltileri kromatografik sisteme tek tek enjekte edilerek alıkonma zamanları ve uv-vis spektrumları kaydedilmiştir. Daha sonra yedi boyarmaddenin karışımından oluşan çalışma çözeltisi enjekte edilmiş ve kullanılan hareketli faz sisteminde kromatografik ayrılmanın sağlandığı görülmüştür. Enjeksiyona hazır hale getirilmiş olan *Rapana venosa* numuneleri 1:5 oranında DMF ile seyreltilerek aynı kromatografik koşullarda HPLC sistemine enjekte edilmiştir. Herbir enjeksiyon üçer kez tekrarlanmıştır.

BULGULAR

Çalışmada geliştirdiğimiz dereceli elüsyon sisteminde yedi adet indigoid boyarmaddenin bir arada kromatografik ayrılması sağlanmıştır. Standart boyarmadde karışımının 288 nm'de alınan kromatogramındaki piklerin alıkonma süreleri (Rt) sırasıyla; indigotin (8,726 dk), indirubin (9,370 dk), 6-bromoindigotin (11,715 dk), 6'-bromoindirubin (12,521 dk), 6-bromoindirubin (12,581 dk), 6,6'-dibromoindigotin (14,595 dk), 6,6'-dibromoindirubin (15,818 dk) olarak tespit edilmiştir.

Rapana venosa ekstresindeki maddelerin belirlenebilmesi içinde yöntemin uygun olduğu tespit edilmiştir. Ekstrenin ayrılma kromatogramında 14,610. ve 15,825. dakikalarda gelen piklerin standart boyarmadde kromatogramındaki piklerle çakıştığı gözlenmiştir (Şekil 2). Bu piklerden alınan uv/vis spektrumlarının standart boyarmaddelerinin uv/vis spektrumları ile örtüşmüştür. Spektrumların karşılaştırılmasıyla; Rt'si 14,610 olan pikin 6,6'-dibromoindigotin, Rt'si 15,825 olan pikin ise 6,6'-dibromoindirubin olduğu ispatlanmıştır (Şekil 3 ve 4).

SONUÇ

Çalışma sonucunda geliştirilen kromatografik yöntemin indigoid boyarmaddelerin ayrılmasında literatürde önerilen yöntemlere göre daha başarılı olduğu tespit edilmiştir (4, 13). Yöntem *Rapana venosa* numunesindeki maddelerin belirlenmesi içinde yeterli kromatografik ayırımı sağlamıştır.

Son yıllarda yapılan bilimsel araştırmalarda gündelik hayatımızın neredeyse her alanına girmiş olan sentetik boyaların çevre ve insan sağlığı üzerine olan olumsuz etkileri bildirilmiştir (14). Bu nedenle sentetik boyarmaddelere göre toksisiteyi çok daha az olan doğal boyarmaddelerin kullanım oranları birçok alanda giderek artmaktadır (15, 16). Bu nedenle doğal boyarmadde kaynaklarının üretilmesi ve yeni kaynaklar bulunması üzerinde durulması gereken bir noktadır.

Rapana venosa (sinonimleri: *Rapana thomasiana* veya *pontica*) Asya kökenli olan bu deniz kabuklusu Karadeniz'de istilacı bir tür olarak bulunmaktadır ve bölgede yerli olarak bulunmakta olan diğer türlerin popülasyonuna zarar vermektedir. *Rapana venosa*'nın ticari amaçla kullanılması bölgede bulunan popülasyonunun kontrolündeki etkenlerden biridir. 6,6'-dibromoindigotin ve 6,6'-dibromoindirubin boyarmaddelerinin elde edilmesi için kaynak olarak bu deniz kabuklusunun kullanımı da mümkün olabilir.

TEŞEKKÜRLER

Rapana venosa deniz kabukluları T.C. ,Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü, Trabzon Su Ürünleri Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Örneklerin sağlanmasında yardımcı olan Dr. Orhan Ak'a teşekkür ederiz.

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (SAG-D-110913-0371).

Identification of Indigoid Dyes Found in *Rapana venosa* by High Performance Liquid Chromatography with Diode-array Dedection

ABSTRACT

Indigo and indigoid dyes are molluscan dyes and have been known since pre-Roman times. Indigoid dyes are used in textile, food, medicine and cosmetic sectors as a colorant. At the present time their new analogous are synthesizing for the treatment of some important diseases as cancer and diabetes. Indigo and indigoid dyes are obtained from certain species of molluscs. One of this species is *Rapana venosa* (Synonyms: *Rapana thomasiana* or *pontica*). The aim of this study was to identification of indigoid dyes in *Rapana Venosa* by reversed phase high performance liquid chromatography with diod array dedector. A new chromatographic method was developed for the seperation of seven indigoid dyes in the same sample.

Chromatographic seperation was achieved with C18 coloumn, cetonitrile/water/trifluoroacetic acid mobil phase system and gradient elution. Analyses of *Rapana venosa* dimethyl sulfoxide extracts were performed with same chromatographic conditions. Our study demonstrated that this novel chromatografic method we have developed can provided the simultaneously seperation of seven indigoid dyes. We identified 6,6'-dibromoindirubin and 6,6'- dibromoindigotin dyes in *Rapana venosa* extracts. Utilization of natural dyes are gradually increased by the reason of the toxic effects of synthetic dyes on enviromental and human health. Furthermore, production of natural dyes and discover the new natural dye sources are important problems in this area. *Rapana venosa* can be used as an alternative source for the production of 6,6'-dibromoindirubin ve 6,6'-dibromoindigotin dyes.

Keywords: İndigo, 6,6'-dibromoindirubin, 6,6'-dibromoindigotin, Natural dye, *Rapana venosa*, HPLC

KAYNAKLAR

1. Cardon D. Natural Dyes Sources, Tradition, Technology and Science. Archetype Publications Ltd, London. 2007. p. 607-710.
2. Perkin AG, Everest AE. The Natural Organic Colouring Matters. Longmans, Green and Co, London. 1918.
3. Balfour-Paul J. Indigo. British Museum Press, London. 2000.
4. In Meijer L, Guyard N, Skaltsounis L, Eisenbrand G. Indirubin, the red shade of indigo. Life in Progress Editions, Roscoff, France. 2006. p. 45-53.
5. Cooksey CJ. Tyrian purple: 6,6'-Dibromoindigo and related compounds. Molecules 2001; 6:736-69.
6. Hoessel R, Leclerc S, Endicott JA, Nobel MEM, Lawrie A, Tunnah P, Leost M, Damiens E, Marie D, Marko D, Niederberger E, Tang W, Eisenbrand G, Meijer L. Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases. Nat Cell Biol 1999; 1:60-7.
7. Noble MEM. Protein kinase inhibitors: Insights into drug design from structure. Science 2004; 303:1800-5.
8. Moon MJ, Lee SK, Lee JW, Song WK, Kim SW, Kim JI, Cho C, Choia SJ, Kima YC. Synthesis and structure-activity relationships of novel indirubin derivatives as potent anti-proliferative agents with CDK2 inhibitory activities. Bioorgan Med Chem 2006; 14:237-46.
9. Meijer L, Skaltsounis AL, Magiatis P, Polychronopoulos P, Knockaert M, Leost M, Ryan XP, Vonica CA, Brivanlou A, Dajani R, Crovace C, Tarricone C, Musacchio A, Roe SM, Pearl L, Greengard P. GSK-3-Selective Inhibitors Derived from Tyrian Purple Indirubins. Chem Biol 2003; 10:1255-66.
10. Zhang N, Jiang Y, Zou J, Zhang B, Jin H, Wang Y, Yu Q. 3D QSAR for GSK-3 β inhibition by indirubin analogues. Eur J Med Chem 2006; 41:373-8.
11. Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, Muehlbeyer S, Hippe F, Vatter S, Merz KH, Eisenbrand G, Jove R, Vogt PK. Indirubin derivatives inhibit stat-3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. P Natl Acad Sci USA 2005; 102:17:5998-6003.
12. Seyhan K, Mazlum ER, Emiral H, Engin S, Demirhan S. Diel feeding periodicity, gastric emptying, and estimated daily food consumption of whelk (*Rapana venosa*) in the south eastern Black Sea (Turkey) marine ecosystem. Indian J Mar Sci 2003; 32:249-51.
13. Karapanagiotis I, Lakka A, Valianou L, Chryssoulakis L. High-performance liquid chromatographic determination of colouring matters in historical garments from the Holy Mountain of Athos. Microchimica Acta 2008; 160:477-83.
14. Anliker R, Durig G, Steinle D, Moriconi EJ. List of colorants to be classified as toxic. J Soc Dye Colour 1988; 104:5,6:223-5.
15. Karslı-Çepioğlu S, Yurdun T. In vitro testing for genotoxicity of indigoid dyes by commet assay. MÜSBED 2012; 2:3:108-12.
16. Chavan RB. Environment-friendly dyeing processes for cotton. Indian J Fibre Text 2001; 26:93-100.