

Arbutinin LC-MS/MS Tekniği ile Zorlanmış Koşullardaki Bozunurluk Ürünlerinin Tayini

Süleyman GÖKCE^{1*}, İbrahim BULDUK², Selahattin BOZKURT³

¹Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi, Uşak, Türkiye

²Uşak Üniversitesi Sağlık Yüksek Okulu, Uşak, Türkiye

³Uşak Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Sağlık Meslek Yüksek Okulu, Uşak, Türkiye

*suleyman.gokce@usak.edu.tr

(Geliş/Received:15.03.2016; Kabul/Accepted: 10.06.2016)

Özet

Arbutin bir çok tıbbi bitkide bulunan ve doğal olarak oluşan glikozittir. Arbutin içeren ilaçlar başta cilt kanseri tedavisi olmak üzere idrar yolları enfeksiyonlarının tedavisi, böbrek taşı tedavisi, yetişkinlerin cildinde görülen çil ve leke gibi rahatsızlıkların tedavisinde cilt beyazlatma ajanı olarak kullanılır. Arbutin bazı bitkilerde, yüksek derişimde bulunan bir glikosile hidrokinondur. İnsan metabolizmasındaki tirozinaz enzimi üzerindeki önleyici etkisi, doğal olarak oluşan arbutin anomerininkinden daha güçlü olduğu için kozmetik endüstrisinde büyük uygulama potansiyeline sahiptir [1]. Metabolizmada ilaç etken maddeleri farklı pH şartlarıyla ve kimyasal ortamlarda ayırmakta ve emilim göstermekte ve bozunmaktadırlar. Bu etken maddelerin ruhsatlandırılması için Uluslararası Uyum Konseyinin (ICH) [2], belirlediği şartlar doğrultusunda Arbutinin LC-MS/MS tekniği ile farklı stres koşullarında (asidik, bazik, oksidatif, termal ve UV) davranışı incelenmesi önem arz etmektedir. Bu çalışmada Arbutinin zorlanmış koşullardaki bozunurluk ürünleri analiz edilmiştir. HPLC tekniği ile MS/MS analizleri için optimum koşullar belirlenmiştir. Analizlerde ACE 5 C18 250*4,6 mm kolonu kullanılmıştır. Ayırma 10:90 (v/v) metanol-su ve %0,1 formik asit ortamında gerçekleştirilmiştir. Kütle analizlerinde EJS-ESI tekniği ve pozitif iyon modda bozunurluk ürünleri gözlemlenmiştir [3-4-5].

Anahtar kelimeler: 1-Arbutin, 2-LC-MS/MS, 3-Bozunurluk Ürünleri.

Degradation Products Of Arbutin By Lc-Ms/Ms Technique in Forced Conditions

Abstract

Arbutin is found in many medicinal plants and naturally occurring glycosides. Drugs containing arbutin is used to treat urinary tract infections, including particularly skin cancer, kidney stone, disorders such as freckles and stains on observed the skin of adults as a skin-whitening agent. Arbutin is glycosylated hydroquinonein present at high level concentration in some plants. As The prevent effect on human tyrosinase inhibitory enzyme is stronger than naturally occurring arbutin anomeric has great potential for application in the cosmetic industry. Pharmaceutically active compounds in metabolism are separated in different pH, absorbed and degraded. In accordance with requirements of the International Compliance Council Compliance, The behavior of arbutin under different stress conditions (acidic, basic, oxidative, thermal and UV) must be examined with LC-MS / MS technique for the licensing of these agents. In this study, Degradability products of arbutin under forced conditions. Optimum conditions for HPLC technique MS / MS analysis were determined. ACE 5 C18 250x4,6 mm column was used during the analysis. Separation was carried out with the mobile phase10:90:0.1 (v / v / v) methanol-water-0.1% formic acid. Degradation products have been observed in mass analysis in EJS-ESI technology and positive ion mode.

Keywords: 1-Arbutin, 2-LC-MS/MS, 3-Degradation Products

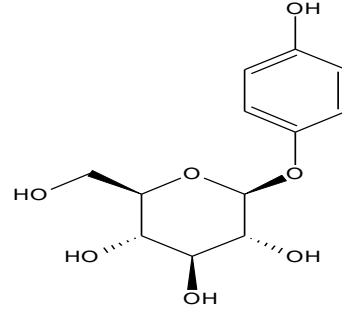
1.Giriş

Arbutin ihtiva bazı bitki familyaları şunlardır; nane, lavanta çiçeği, kekik gibi kokulu bitkileri içine alan ve iki çenekli bitişik taç yapraklılardan oluşan ballıbabagiller (*Lamiaceae*) familyası. Fundalar takımından, bayağı funda veya süpürge çalısı, açelya, yaban mersini, koca yemiş gibi çoğu her zaman yeşil birçok çalı ve ağaççığı içine alan fundagiller (*Ericaceae*) familyası. Ayrı taç yapraklı iki çeneklilerden, örnek bitkisi taşkıran otu olan taşkırangiller (*Saxifragaceae*) familyası. Çilek, armut, elma, badem vb. türleri içine alan, ayrı taç yapraklı iki çeneklilerden, örneği gül olan gülgiller (*Rosaceae*) familyasından olan bitkiler arbutin içerirler [6].

Arbutin; kojik Asit, azelaik asit benzeri etki gösterir. Ciltteki fazla melanini inhibe ederek cildin renk ayrışmalarını kısa sürede (8-12 hafta) azaltır. Leke ya da hiperpigmentasyon tedavisinde etkili aktiflerden biridir. Cilde uygulanmasından hemen sonra enzimlerle birleşerek fazla tirozin oksidasyonunu engeller. UV ile oluşan pigmentasyonda da etkili olduğu klinik olarak ispatlanmıştır [1]. Arbutin “(2R,3S,4S,5R,6S)-2-Hydroxymethyl-6-(4-hydroxyphenoxy)oxane-3,4,5-triol” (Şekil 1), vücut içerisinde damar büzücü, antimikrobiyal ve dezenfektan özelliklere sahip hidrokinona dönüştürülür [7]. Hidrokinon hiperpigmentasyon tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Arbutin fenolik olmadığı düşünölen glikolleşmiş benzokinondur. Ayrıca hidrokinona dönüştüğu için aşırı renklenmede etkilidir [7-8]. Sistemik olarak arbutin mide bağırsak sisteminde emilir ve biyolojik olarak hidrokinona dönüştürölür. % 65-75 aralığında sindirilen arbutin böbreklerden atılır. Melanin, trozinaz ile salgılanır. Hidrokinon trozinazı inhibe ederek melanin sentezini durdurur [9]. Arbutin topikal uygulamada, daha yüksek derişimlerde, daha az toksisite ve tahriş ile lokalize bir etki sağlar [9-10].

Bir ilaç maddesinin safsızlık profili ve kararlılığı, güvenlik değerlendirmesi ve üretim sürecinde çok önemlidir. Stres testleri, etkin maddelerin zorlanmış koşullardaki parçalanma ürünleri ve parçalanma mekanizmaları hakkında bilgi edinmek için yapılır [11]. Bu konu ile ilgili literatür araştırması yapıldığında Arbutinin

bozunma ürünlerinin analitik yöntem ile Kütle Spektrometrisiyle tespiti ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu yüzden Arbutinin bozunurluk ürünlerinin tayini için güvenilir ve kullanışlı bir yöntemin geliştirilmesi gereklidir. Bu amaçla, etken maddelerin asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullardaki bozunma ürünleri m/z değerleri ve parçacık örneklerine dayanarak tespit edilmiştir.



Şekil 1. Arbutin

2. Materyal ve Metot

2.1. Kimyasallar

Analizlerde kullanılan tüm kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıkta kullanılmıştır. Arbutin Alfa Easer (USA) firmasından temin edilmiştir. Metanol, formik asit, hidroklorik asit, sodyumhidroksit, hidrojenperoksit MERCK Kimyasal Türkiye firmasından elde edilmiştir. Ultrasaf su Thermo marka ultrasaf su cihazından temin edilmiştir.

2.2. Stok çözeltisinin hazırlanması, kalibrasyon grafiği ve dedeksiyon limitleri

Arbutinin stok çözeltisi analitik saflıktaki metanol ile 100 ppm derişiminde hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği; 0.5-1-3-5-10-20 ppm derişimlerinde, stok çözeltisinden mobil faz ile (%0.1 formik asit içeren, 10:90 v/v, Metanol/Su) seyretilip 6 noktali olarak oluşturulmuştur, R²: 0.9997 olarak hesaplanmıştır. LOD (gözlenebilme sınırı): 0.560 ppm, LOQ (tayin alt sınırı): 1.998 ppm, eğim: 0.3188, kesim: -0.046

olarak bulunmuştur. Tüm çözeltiler ve standartlar +4 C⁰ de muhafaza edilmiştir.

2.3. Yüksek performanslı sıvı kromatografi-kütle spektrometresi koşulları

Kromatografik analizler için Agilent 1200 İfinity UPLC sistemi kullanılmıştır. UPLC sistemi yüksek basınç pompası, DAD dedektör, oto örnekleyici, degazör, kolon fırını, ve soğutucu kısımları içermektedir. 280 nm'de sistem Arbutin için optimize edilmiştir. ACE-C18 (250×4.6 mm, 5µ) kolunu kullanılmıştır,

sabit faz 40 C⁰'de tutulmuştur. Enjeksiyon hacmi 1 µL, mobil faz akış hızı 1.2 mL/dk olarak metod oluşturulup uygulanmıştır. LC-MS/MS analizleri Agilent 6460 triple quad kütle spektrometresiyle yapılmıştır. Elektrospray Jet Stream iyonlaştırma tekniği kullanılarak pozitif iyon modda bozunurluk ürünleri belirlenmiştir. Kütle taraması sonucunda Arbutinin kütle spektrumu 295 ([M+Na]⁺) m/z olarak gözlemlenmiştir. Kütle spektrometresi koşulları Tablo 1. de verilmiştir.

Tablo 1. Kütle spektrometresi koşulları

Genel Ayarlar	Değerler	Analiz Parametreleri	Değerler
Gaz Sıcaklığı	325 C ⁰	Ana Kütle	295.0 m/z
Gaz Akış Hızı	11 L/dk	Tanınma Ürünleri Kütleleri	248.7-160.7 m/z
Püskürtme Basıncı	45 psi	Kütle İzleme Süresi	45 ms
Taşıyıcı Gaz Sıcaklığı	400 C ⁰	Çarpışma Enerjisi	30
Taşıyıcı Gaz Akış Hızı	12 L/dk	Alıkonma Süresi	3.4 dk
Kapiler Voltajı	3000 Volt		

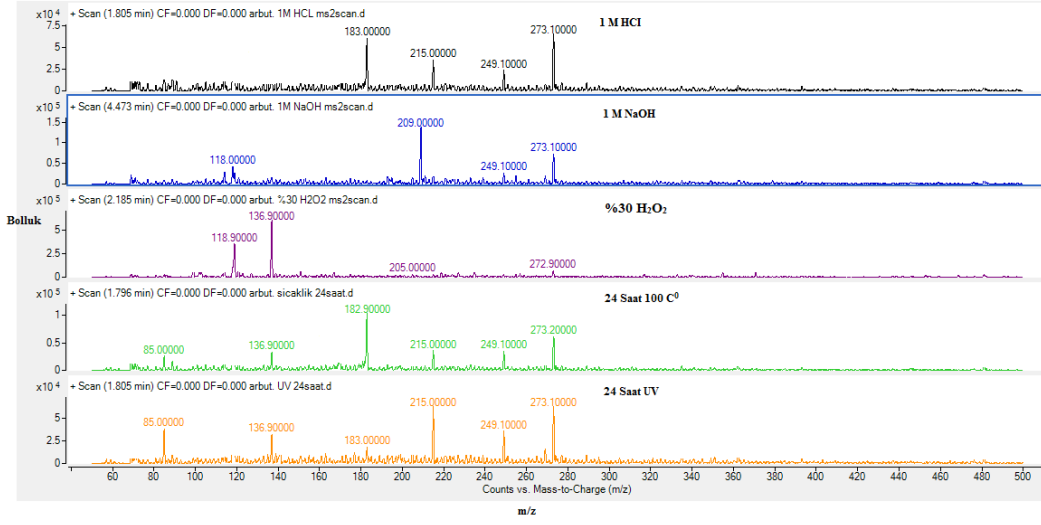
3. Sonuçlar

3.1. Arbutinin bozunma prosedürü

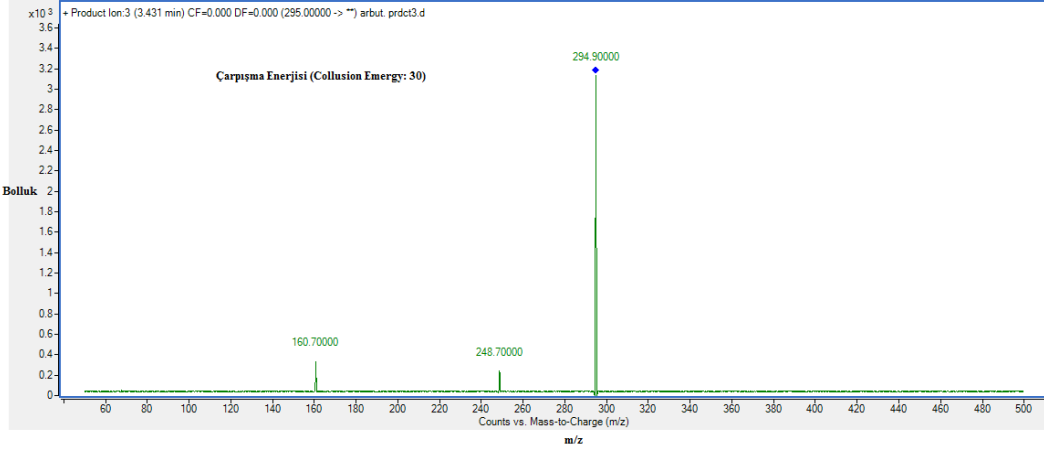
ICH bozunma çalışmasına uygun olarak Arbutinin parçalanma ürünleri; asidik, bazik, oksidatif, termal, UV ışık, koşulları altındaki davranışı LC-MS/MS tekniği ile incelenerek belirlenmiştir. Bu koşullar; 1 M HCl 100 C⁰ -30 dk, 1M NaOH 100 C⁰ -30 dk, %3-%30 H₂O₂ 100 C⁰ -30 dk, 6-24 saat 100 C⁰ termal bozunma, 6-

24 saat 254 nm dalga boyunda-oda sıcaklığında UV ışık altında bozunma şartlarında, ICH prosedürü uygulanarak sonuçlar değerlendirilmiştir. ICH şartları uygulanarak elde edilen MS pikleri ve Arbutinin çarpışma enerjisi altında elde edilen parçalanma ürünleri Şekil 2. ve Şekil 3.'te gösterilmiştir. MS piklerindende açıkça anlaşıldığı gibi; Arbutin en fazla oksidatif koşulda olmak üzere, tüm stres testlerinde parçalanmış, stabil kalmamıştır.

Arbutinin LC-MS/MS Tekniği ile Zorlanmış Koşullardaki Bozunurluk Ürünlerinin Tayini



Şekil 2. Stres testi bozunma ürünleri MS pikleri

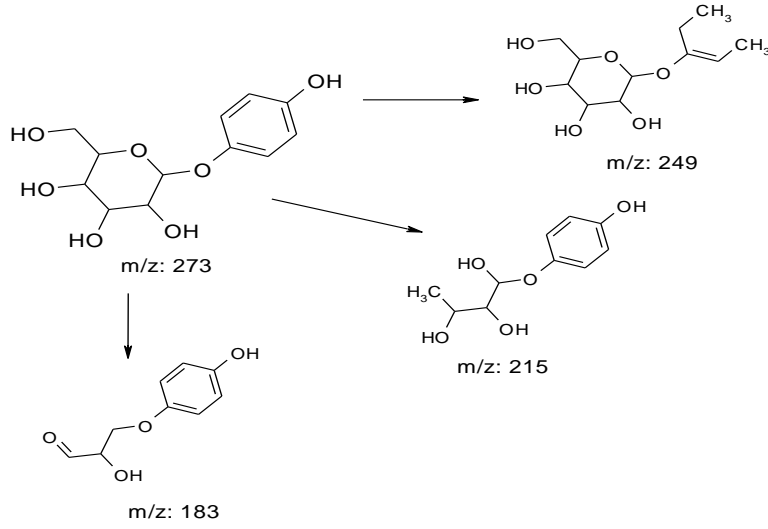


Şekil 3. Çarpışma enerjisiyle elde edilen Arbutinin parçalanma sonucu oluşan MS pikleri

3.2. Arbutinin asidik koşullardaki bozunması

100 ppm stok olarak hazırlanan Arbutin çözeltisinden 10 pmm'e 1 M HCl ile seyreltme yapıldı. Amber vialle alınan bu çözelti 100 C⁰ de 30 dakika boyunca fırın içersinde bekletildi. LC-

MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Arbutinin kısmen bozunmuş olduğu 249.1-215.0-183.0 m/z kütle piklerinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 4.'de şematize edilmiştir.

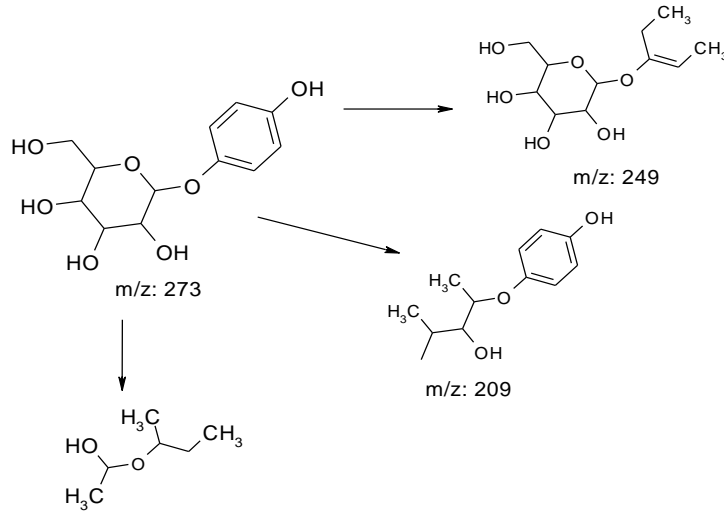


Şekil 4. Arbutinin asidik şartlardaki bozunurluk ürünleri

3.3. Arbutinin bazik koşullardaki bozunması

100 ppm stok olarak hazırlanan Arbutin çözeltisinden 10 pmm'e 1 M NaOH ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 100 C⁰ de 30 dakika boyunca fırın içerisinde bekletildi. LC-

MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Arbutinin kısmen bozunmuş olduğu 249.1-209-118 m/z kütle piklerinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 5.'de şematize edilmiştir.

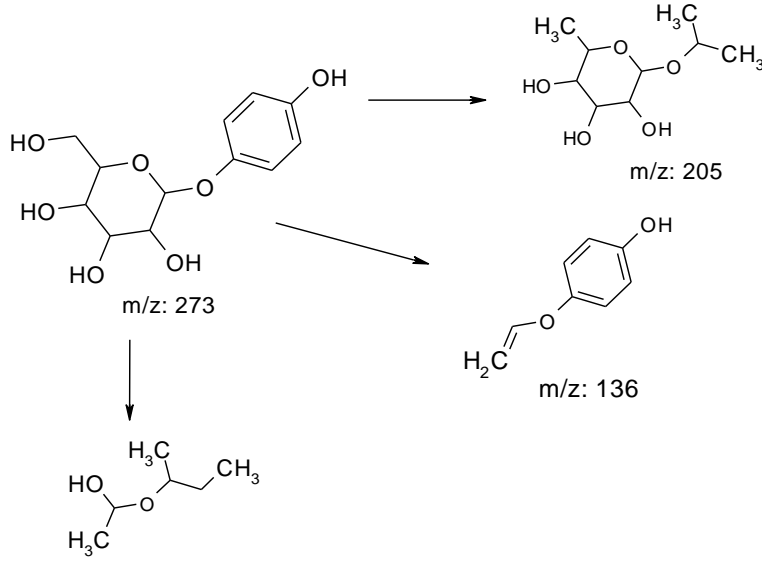


Şekil 5. Arbutinin bazik şartlardaki bozunurluk ürünleri

3.4. Arbutinin oksidatif koşullardaki bozunması

100 ppm stok olarak hazırlanan Arbutin çözeltisinden 10 pmm'e %30'luk H₂O₂ ile seyreltme yapıldı. Amber viale alınan bu çözelti 100 C⁰ de 30 dakika boyunca fırın içerisinde

bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Arbutinin tamamen bozunmuş olduğu 205-136.9-118.9 m/z kütle piklerinin oluşumundan anlaşılmıştır. Oluşan ürünler Şekil 6.'da şematize edilmiştir.

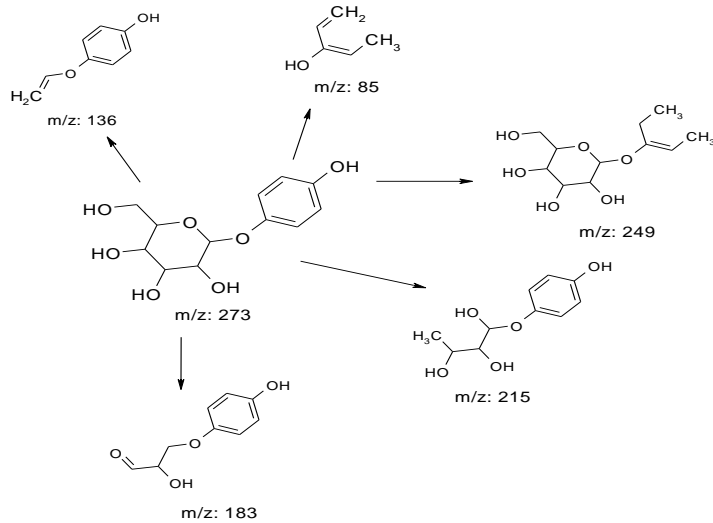


Şekil 6. Arbutinin oksidatif şartlardaki bozunurluk ürünleri

3.5. Arbutinin termal ve fotolitik koşullardaki bozunması

100 ppm stok olarak hazırlanan Arbutin çözeltisinden 10 ppm'e mobil faz ile seyreltme yapıldı. Amber vialde alınan bu çözelti 100 C⁰'de 24 saat boyunca fırın içersinde bekletildi. LC-MS/MS cihazına 1 µL hacminde enjekte edildiğinde, Arbutinin kısmen bozunmuş olduğu

kütle piklerinin oluşumundan anlaşılmıştır. Fotolitik bozunma ise Arbutin stok çözeltisinden 10 ppm'e mobil faz ile seyreltme yapılarak, 254 nm dalga boyunda 24 saat boyunca bekletilerek yapılmıştır. Hem termal hemde fotolitik şartlar altında Arbutin 249.1-215-182.9-136.9-85 m/z bozunurluk kütle piklerini vermiştir. Oluşan ürünler Şekil 7.'de şematize edilmiştir.



Şekil 7. Arbutinin termal şartlardaki bozunurluk ürünleri

4. Tartışma

Bu çalışmada kozmetik ürünü ve ilaç etken maddesi olan Arbutinin farklı stres koşulları altında parçalanma ürünlerinin tayini ICH rehberine uygun olarak LC-MS/MS tekniği ile incelenmiştir. Metabolizmada ilaçlar çeşitli pH ortamlarında ve farklı kimyasal koşullarla karşılaşabilmektedir. Aynı zamanda ilaçlar proses aşamasında ve uzun raf sürelerinde bozunma gösterebilmektedir. Bu yüzden bozunurluk ürünlerinin tayini ürünlerin daha sağlıklı ve verimli kullanılmaları açısından önem arz etmektedir. Konuyla ilgili literatür çalışmaları incelendiğinde Arbutinin ICH prosedürüne uygun bozunurluk çalışması olmadığı görülmüştür. Çalışma kapsamında Arbutinin farklı metabolik davranışları hakkında yeni ve özgün veriler elde edilmiştir.

Çalışmalar sonucunda Arbutinin asidik, bazik, oksidatif, termal ve fotolitik koşullarda kararlı olmadığı, oksidatif koşulda tamamen bozunduğu, diğer koşullarda ise tamamen olmasa bile yüksek oranda bozunuma uğradığı görülmüştür. Kütle spektrumlarında baskın pikler değerlendirilerek parçalanma ürünlerinin olası kimyasal yapıları değerlendirilmiştir.

5. Teşekkür

Bu çalışmanın tamamlanmasında katkılarından dolayı Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezine teşekkür ederiz.

6. Kaynaklar

1. Akiu S, Suzuki Y, Asahara T, Fujinuma Y, and Fukuda M (1991) Inhibitory effect of arbutin on melanogenesis-biochemical study using cultured B16 melanoma cells. *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* **101**, 609-613.
2. ICH. Stability testing of new drug substances and products, Q1A(R2), (2003). International Conference on Harmonisation, <http://www.ich.org/home.html>

3. A. Masia, M. Ibanez, C. Blasco, J.V. Sancho, Y. Picoa, F. Hernandez. (2013). Combined Use of Liquid Chromatography Triple Quadrupole Mass Spectrometry and Liquid Chromatography Quadrupole Time-Of-Flight Mass Spectrometry in Systematic Screening of Pesticides and Other Contaminants in Water Samples. *Analytica Chimica Acta* **761**, 117– 127
4. R. M. Borkar, B. Raju, P. S. Devrukhakar, N. Tondepu, A. B. N. Rao, R. Srinivas. (2013). Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of milnacipran and its stressed transformation products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **27**, 369.
5. B. Raju, M. Ramesh, R. Srinivas, S. S. Raju, Y. Venkateswarlu. (2011). Identification and characterization of stressed degradation products of prulifloxacin using LC-ESI-MS/Q-TOF, MSn experiments: Development of a validated specific stability-indicating LC-MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **56**, 560.
6. İbrahim Bulduk, Işıl Açıkgöz Sağlam (2015). Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of Arbutin from *Pyrus Communis L.* leaves by Response Surface Methodology. *Hacettepe J. Biol. & Chem.*, **43** (3): 167–178
7. Chemical Information Review Document for Arbutin and Extracts from *Arctostaphylos uva-ursi* (2006), *National Toxicology Program*.
8. Halder RM, Richards GM, (2004), Topical Agents Used in the Management of Hyperpigmentation, *Skin Therapy Lett.*, 1-3.
9. Draelos ZD, (2007), Skin Lightening Preparations and the Hydroquinone Controversy, *Dermatol Ther*, **308**-13.
10. Ertam I, Mutlu B, Unal I, (2008), Efficiency of Ellagic Acid and Arbutin in Melasma, A Randomized, Prospective, Open-Label Study, *J Dermatol*, **570**-4.
11. Edgar C. Nicolas, Thomas H. Scholz. (1998). Active drug substance impurity profiling part II. LC-MS/MS fingerprinting, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **16**: 825-836.