



# Düzce Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi

Araştırma Makalesi

## Türkiye'de Yetişen Üç Ahlat Türünün Arbutin İçeriğinin Değerlendirilmesi

Rukiye KAYHAN<sup>a</sup> Safiye E. KORCAN<sup>b</sup> İbrahim BULDUK<sup>c,\*</sup>  
 Mustafa KARGIOĞLU<sup>d</sup> Emrah ŞELLİ<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Uşak Üniversitesi, Uşak, Türkiye

<sup>b</sup> Sağlık Hizmetleri MYO, Uşak Üniversitesi, Uşak, Türkiye

<sup>c,\*</sup> Sağlık Yüksekokulu, Uşak Üniversitesi, Uşak, Türkiye

<sup>d</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Fen Edebiyat Fakültesi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyonkarahisar, Türkiye

<sup>e</sup> Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Fen Edebiyat Fakültesi, Uşak Üniversitesi, Uşak, Türkiye

\* Sorumlu yazarın e-posta adresi: [ibrahim.bulduk@usak.edu.tr](mailto:ibrahim.bulduk@usak.edu.tr)

DOI : 10.29130/dubited.556150

### ÖZET

Armut (*Pyrus spp.*) Dünya çapında en önemli meyvelerden biridir. *Pyrus* cinsi, Rosaceae ailesinin Pomoideae alt ailesine aittir. *Pyrus* türlerinin farklı organları farklı oranlarda arbutin içerir. Arbutin birçok tıbbi bitkide bulunan ve doğal olarak oluşan glikozittir. Arbutin, Lamiaceae, Ericaceae, Saxifragaceae ve Rosaceae gibi farklı familyalardan gelen farklı bitki türlerinde bulunur. Tirozinazı önleme kabiliyetinden dolayı beyazlatıcı bir madde olarak kullanılır. Bu çalışmanın amacı, Afyonkarahisar ilinde yetişen *Pyrus* Species (PEL (PEL), PAM (PAM) ve PAN (PAN)) 'nin arbutin içeriğini tespit etmektir. Örnekler oda sıcaklığında onbeş gün boyunca kurutuldu. Tüm yabancı *pyrus* türlerinin arbutin içerikleri, ters faz HPLC ile belirlendi. UV dedektörü ile donatılmış bir Agilent 1260 HPLC sistemi üzerinde miktar tayini yapılmıştır. Bir C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) analitik kolon kullanıldı. Mobil faz% 93 deiyonize su ve% 7 metanoldü. İzokratik elüsyon, 1 mL / dak akış hızında kullanıldı. Kolon sıcaklığı 25 ° C'de tutuldu ve tespit dalga boyu arbutin için 280 nm'de ayarlandı. Analitik yöntem, ICH Q7A Kılavuzuna göre doğrulandı. Çalışmamızın sonuçları üç *pyrus* türünün de arbutin içerdiğini göstermiştir. Yaprakların arbutin içeriği, üç yabancı arbutun meyvelerinden daha yüksektir. Her üç türün de yapraklarında yüksek oranda arbutin içeriği bulunmuştur. PAN, diğer türlerden daha yüksek oranda arbutin oranına sahiptir (Yaprak: 21,23 mg / g. Dal: 8,92 mg / g. Meyve: 0,81 mg / g).

**Anahtar Kelimeler:** Yabancı ahlat türleri, Arbutin, Hplc

## Evaluation of Arbutin Content of Three Wild Pear Species Growing in Turkey

### ABSTRACT

Pear (*Pyrus spp.*) is one kind of the most important worldwide fruit. The genus *Pyrus* belongs to the subfamily Pomoideae of family Rosaceae. Different organs of the *Pyrus* species contain arbutin in different proportions. Arbutin is a naturally occurring glycoside found in many medicinal plants. Arbutin is found in different plant species from different families such as Lamiaceae, Ericaceae, Saxifragaceae and Rosaceae. Due to its ability to inhibit tyrosinase, it is used as a whitening agent. The aim of this study was to determine arbutin content of

Pyrus Species (PEL(PEL), PAM(PAM) and PAN(PAN)) growing in Afyonkarahisar province of Turkey. Samples were dried at room temperature for fifteen days. Arbutin contents of all wild pyrus species were determined by reversed phase HPLC. Quantification was performed on an Agilent 1260 HPLC system equipped with a UV detector. A C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) analytical column was used. Mobile phase was 93% deionized water and 7% methanol. İsocratic elution was used at a flow rate of 1 mL / min. The column temperature was maintained at 25 0C and the detection wavelength was set at 280 nm for arbutin. The analytical method was validated according to ICH Q7A Guideline. The results of our study showed that all three pyrus species contain arbutin. The arbutin content in the leaves is higher than the fruits of all three wild pears. A high proportion of arbutin content was found in the leaves of all three types. PAN has a higher proportion of arbutin than the other species (Leaf: 21,23 mg / g. Brunch: 8,92 mg / g. Fruit: 0,81 mg / g).

**Keywords:** *Pyrus spp, Arbutin, Hplc*

## **I. GİRİŞ**

Gülgiller familyası ot, çalı ve ağaç formunda, yaprakları basit ya da birleşik, kenarları sıklıkla dişli olan, gövdede alternat bağlanmış ve genellikle stipullu bitkilerdir. Gülgiller; Türkiye’ de 36 cins ve bu cinslere bağlı 400 tür ve tür altı taksonla, [1] dünyada ise 91 cins ve bu cinslere bağlı 4828 türle temsil edilen bir çiçekli bitki familyasıdır. En zengin cinsler arasında Alchemilla (270), Sorbus (260), Crataegus (260), Cotoneaster (260), Rubus (250), ve Prunus (yaklaşık 200 tür) sayılabilir.

Rosaceae familyasındaki Pyrus türleri (Armut) çoğunlukla taze meyve olarak tüketilir. Armut türlerinin çeşitli fizyolojik etkileri vardır. Bu türler arbutin, fenolikler ve flavonoidler gibi çeşitli faydalı bileşikler içerir. Bu nedenle, armutlar doğal antioksidanların potansiyel kaynakları olarak son zamanlarda daha fazla dikkat çekmektedirler [2].

Pyrus türleri ayrıca endüstride kozmetik ürünlerde yaygın olarak kullanılan ve beyazlatma ajanı olarak bilinen arbutin (4-hidroksifenil β-D-glikopiranosid) bakımından da zengindir [3]. Arbutin pek çok bitkide doğal olarak bulunan hidrokinun glikozitidir. Farklı pyrus türlerinin kimyasal içerikleri üzerine pek çok çalışma bildirilmiştir [4]. Anti oksidatif [5; 6] ve anti-mikrobiyal etkiler gösterir [7].

Badem yaprağı armut olarak bilinen PAM, Akdeniz, Güney Avrupa ve Batı Asya'ya özgü [8] iken, PAN ise Türkiye'ye endemiktir [9]. PEL da rosaceae familyasının bir üyesidir. Her üç yabancı armut türleri Türkiye'de doğal olarak yetişmektedir. Bunlar genellikle Ahlat olarak bilinirler [10]. Üç farklı pyrus türü ve arbutinin molekül yapısı Şekil 1’de verilmiştir.



(a)

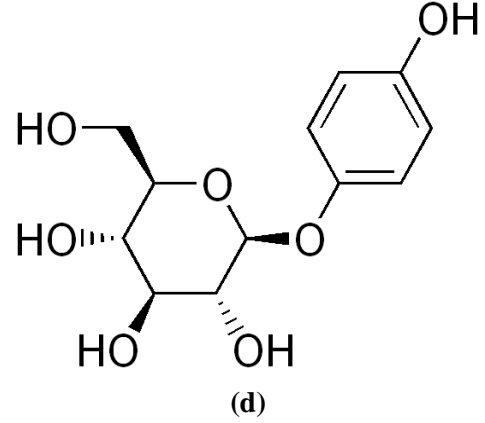


(b)

**Şekil 1. (a) PAN, (b) PAM, (c) PEL, (d) Arbutin**



(c)



(d)

Şekil 1. (devam). (a) PAN, (b) PAM, (c) PEL, (d) Arbutin

Arbutin inhibe edici etksi nedeniyle kozmetiklerde cilt beyazlatma ajanı olarak kullanımının yanısıra, üriner enfeksiyonları tedavi etmek için bir antiseptik olarak kullanılır [11, 12]. Bakterisidal aktivitesi muhtemelen  $\beta$ -glukozidazın etkisiyle arbutinden salınan hidrokinon tarafından sağlanır [13, 14]. Yutulduktan sonra, arbutin gastrointestinal sistemden emilir ve aglikon hidrokinonu oluşturmak için bağırsak florası ile hidrolize edilir [12, 13, 15]. Patojenik mikroorganizmalarla savaşmak için kullanılan bitkisel preparatlarda, hidrokinon, etki bölgesinde (idrar yolu) aktif bir madde olarak kabul edilir ve terapötik aktivite için çok önemlidir. Hidrokinon hepatotoksik, nefrotoksik ve genotoksik potansiyele sahip gibi görüldüğü için ve sadece arbutin olarak glikolize edilmiş formda değil, aynı zamanda birçok bitki ailesinin yapraklarında serbest formda tespit edilmiştir [16], insan idrar enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanması, hem hidrokinonun hem de glikozit türevi arbutininin diyet alımının izlenmesi gibi gıda güvenliği sistemleri ile kontrol edilmelidir.

Farklı bitkilerin yapraklarında arbutin ve hidrokinonun miktarının belirlenmesi için pek çok yöntem DAD Dedektörlü Hplc [17-19], UV dedektörlü hplc [20, 21], kütle spektrometrisi [22], gaz kromatografisi [23], nükleer manyetik rezonans spektrometrisi [24] ve dansitometri [25] bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, üç farklı *Pyrus* türünün yaprak, dal ve meyvelerindeki arbutin içeriğini belirlemektir.

## II. MATERYAL VE METOD

### A. MATERYAL I

#### A. 1. Bitki Materyali I

Çalışmada kullanılan bitki materyali 2018 yılının eylül ayında Ege Bölgesinden toplanmıştır. Bitkiler Mustafa Kargıoğlu tarafından toplandı ve teşhis edildi. Bitki örnekleri Afyon Kocatepe Üniversitesi'ndeki Herbaryum Deposunda saklandı. Bu bitkilerin yaprakları, dalları ve meyveleri açık havada oda sıcaklığında on beş gün süreyle kurutuldu. Bitki örneklerinin dalları, meyveleri ve yaprakları analiz için 80 mesh partikül boyutuna öğütüldü.

#### A. 2. Kimyasallar I

Tüm çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktaydı. Kromatografik amaçlar için kullanılan tüm kimyasallar HPLC saflığıydı. Tüm çözücüler, 0.45  $\mu$ m'lik bir filtre (Millipore, Bedford, MA, ABD) kullanılarak süzüldü. Arbutin standardı Sigma Chemical Co.'dan satın alındı.

## B. METOD II

### B. 1. Ultrasonik Destekli Ekstraksiyon II

Ultrasonik destekli ekstraksiyon Bandelin Sonorex marka ultrasonik banyo ile 50 kHz frekansta yapıldı. 1 g. kurutulmuş ve öğütülmüş numuneler tartıldı ve her bir bitki numunesi 30 ml (0.1 M. HCl) çözeltisi ile ayrı ayrı 30 dakika boyunca ekstrakte edildi. Ekstraksiyondan sonra, karışım beyaz bant filtre kağıdı (Whatman) ile filtre edildi ve ekstre analize kadar +4 ° C buzdolabında saklandı. Arbutin miktarları bu bitki ekstraktları kullanılarak belirlendi.

### B. 2. Arbutin İçeriğinin HPLC ile Belirlenmesi II

Ekstraktların arbutin içerikleri HPLC ile belirlendi. Arbutin'in analizi için analitik koşullar Tablo 1'de verilmiştir. Miktar belirleme UV detektör ile donatılmış Agilent marka 1260 model HPLC sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Ayırma Agilent marka C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) kolon ile gerçekleştirildi. Mobil faz % 93 deiyonize su ve % 7 metanol karışımıydı. İzokratik elüsyon, 1 mL / dk akış hızında kullanıldı. Kolon sıcaklığı 25 ° C'de sabit tutuldu ve dedeksiyon dalga boyu arbutin için 280 nm'ye ayarlandı. Mobil faz kullanılmadan önce 0.45 µm'lik bir filtreden filtre edildi ve gazı giderildi. Numune enjeksiyon hacmi 10 µL idi.

*Tablo 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of Arbutin*

Parametre	Koşullar
Kolon	Agilent marka-C18 (C18, 4.6 mm x 250 mm, 5 µm)
Akış Hızı	1 mL/dk.
Enjeksiyon Hacmi	10 µL
UV Dedeksiyon	280 nm
Analiz Süresi	10 dk.

### B. 3. Analitik Yöntemin Validasyonu II

Analitik metot, ICH klavuzu ve diğer kılavuzların önerileri dikkate alınarak ICH kurallarına uygun olarak doğrusallık, hassasiyet, doğruluk ve stabilite açısından doğrulanmıştır. Analitik yöntemin validasyonu sırasında farklı parametrelerin test edilmesinden elde edilen sonuçlar Tablo 2'de verilmiştir.

#### B. 3. 1. Standart Çözelti ve Kalibrasyon Eğrileri II

Arbutinin deiyonize su içerisinde çözülerek 1000 mg / L. nihai konsantrasyonda standart stok çözeltisi hazırlanmıştır. Kalibrasyondan önce stok çözeltiden su ile seyreltilerek beş farklı konsantrasyonda (100, 200, 300, 400 ve 500 mg / L.) konsantrasyon aralığında arbutin çözeltisi hazırlandı. Arbutin için doğrusallık, pik alanın konsantrasyona karşı doğrusal regresyonu kullanılarak çizildi. Doğrusallığı değerlendirmek için korelasyon katsayısı (R<sup>2</sup>) kullanıldı. Test edilen bileşik için saptama limitleri (LOD) ve miktar limitleri (LOQ), sinyal / gürültü (S / N) oranı (Tablo 1) de verilmiştir.

## **B. 4. Hücre Kültürü II**

### **B. 4. 1. Ekstraksiyon II**

Kurutularak toz haline getirilen *PAN* yaprağı ve *PAM* yaprağından 1 gr tartılarak üzerine 10 ml metanol ilave edildi. Bu karışım bir gece boyunca +4°C'de inkübasyona bırakıldı. Filtrenen bitki örneklerine 5 ml daha metanol eklendi. Birleştirilmiş bu ekstarkt 6 ml nihai hacme kurutuldu. *PEL* yaprakları yeterli ekstraksiyon olmadığı için kullanılmadı.

### **B. 4. 2. Sitotoksite Analizi II**

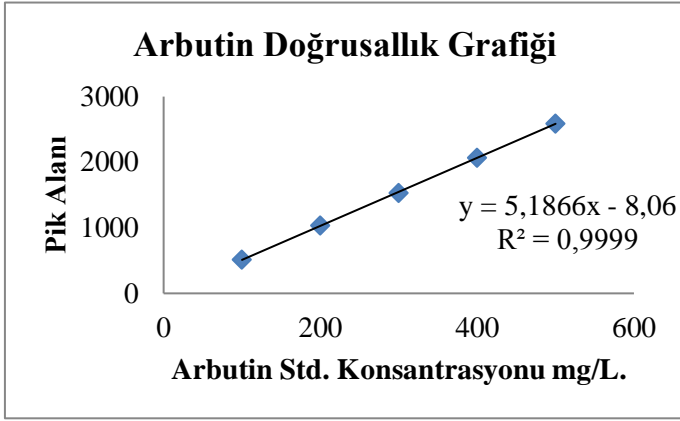
*Pyrus sp.* Yaprak ekstarktlarının meme kanseri hücresi proliferasyonuna olan etkilerini gözlemlemek amacıyla MCF-7 insan meme adenokarsinom hücre hattı kullanılmıştır. MCF-7 hücreleri epitelyal ve östrojen reseptör pozitifdir. MCF-7 hücre serisi Celal Bayar Üniversitesi histoloji ve embriyoloji bölümünden temin edildi. Çalışma Uşak Üniversitesi Bilimsel Analiz ve Teknolojik Uygulama ve Araştırma Merkezi hücre kültürü laboratuvarında yapıldı. MCF-7 hücreleri nemlendirilmiş, %5 CO<sub>2</sub> içeren ve 37°C'lik atmosferde, %10 FBS ve %1 penisilin-streptomisin içeren RPMI – 1640 besi yerinde kültüre edilmiştir. Hücrelerin pasajlanması %80-90 konflüent olduktan sonra, Flask içerisinde bulunan ortam kontaminasyon yaratmayacak bir şekilde uzaklaştırıldı. Hücreler önce serumdan arındırılmak için 8 ml PBS ile yıkandı. PBS aspire edildikten sonra önceden 37 °C'de ısıtılmış olan tripsinden 2,5 mL eklendi. Tripsin eklenmesinden sonra flask 4 dakika inkübatörde bekletildi ve tripsini nötralize olması için tripsinin 2 katı kadar serum ilave edildi. İnkübasyondan sonra flask yüzeyi hücrelerin kalkıp kalkmadıklarını anlamak için kontrol edildi. Eğer hücreler yüzeyden kalkmamışsa flask yumuşak darbelerle kenarından sallanarak hücrelere zarar vermeyecek şekilde kalkma süreçleri hızlandırılabilir. Hücreler flask yüzeyinden kalktıkları zaman içerisine 6 ml RPMI-1640 (büyüme ortamı) ilave edildi. Steril falkon tüpünde 1500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tek seferde tüpün üst kısmını tamamen döküldü ve tüpün içerisine 2 ml büyüme ortamı koyuldu. Hücre ve besi ortamı iyice karıştırıldı. Daha sonra bu karışımdan 850 µl alınıp 12 ml besi ortamı ile karıştırıp 96 kuyucuklu plakalara 90 µl hücre içeren besi ortamında konuldu ve bir gece % 5 CO<sub>2</sub> ile 37 ° C'lik termostat inkübatörde inkübasyona bırakıldı.

Metanolde ekstarkte edilmiş bitki ekstraktlarından 400, 200, 100, 50 ve 10 µg/ ml konsantrasyonlarda hazırlanan ve yine metanolde çözdürülerek hazırlanan arbutin standartlarından 100, 50 ve 25 µg/ ml konsantrasyonlarda hazırlanan, kontrol olarak da ekstraksiyon içermeyen metanolden (çözücü olarak kullanıldığı için kontrol olarak tercih edildi) bir gecelik inkübasyondan sonra kuyucuklara 10 µl eklendi ve 48 saat inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda her kuyucuğa 10 µl CCK8 ilave edildi ve 2 saat süreyle inkübe edildi. Hücre çoğalması oranı, 450 nm de eliza da ölçülerek belirlendi.

## **III. SONUÇLAR**

### **A. ANALİTİK YÖNTEMİN VALİDASYONU I**

Kalibrasyon için hazırlanan arbutin standartlarının konsantrasyonları ve pik alanları ile çizilen doğrusallık grafiği aşağıda Şekil 2'de verilmiştir. Korelasyon katsayısı R<sup>2</sup>=0.9999 olarak elde edilmiş olup ICH Q7A klavuzunda istenilen standardı yakalamıştır [26].



Arbutin Std. Kons. mg/L.	Pik Alanı
100	513.1
200	1035.5
300	1534.6
400	2064.5
500	2591.9

*Şekil 2. Arbutin Doğrusallık Grafiği ve Pik Alanları*

### A. 1. Validasyon Parametreleri I

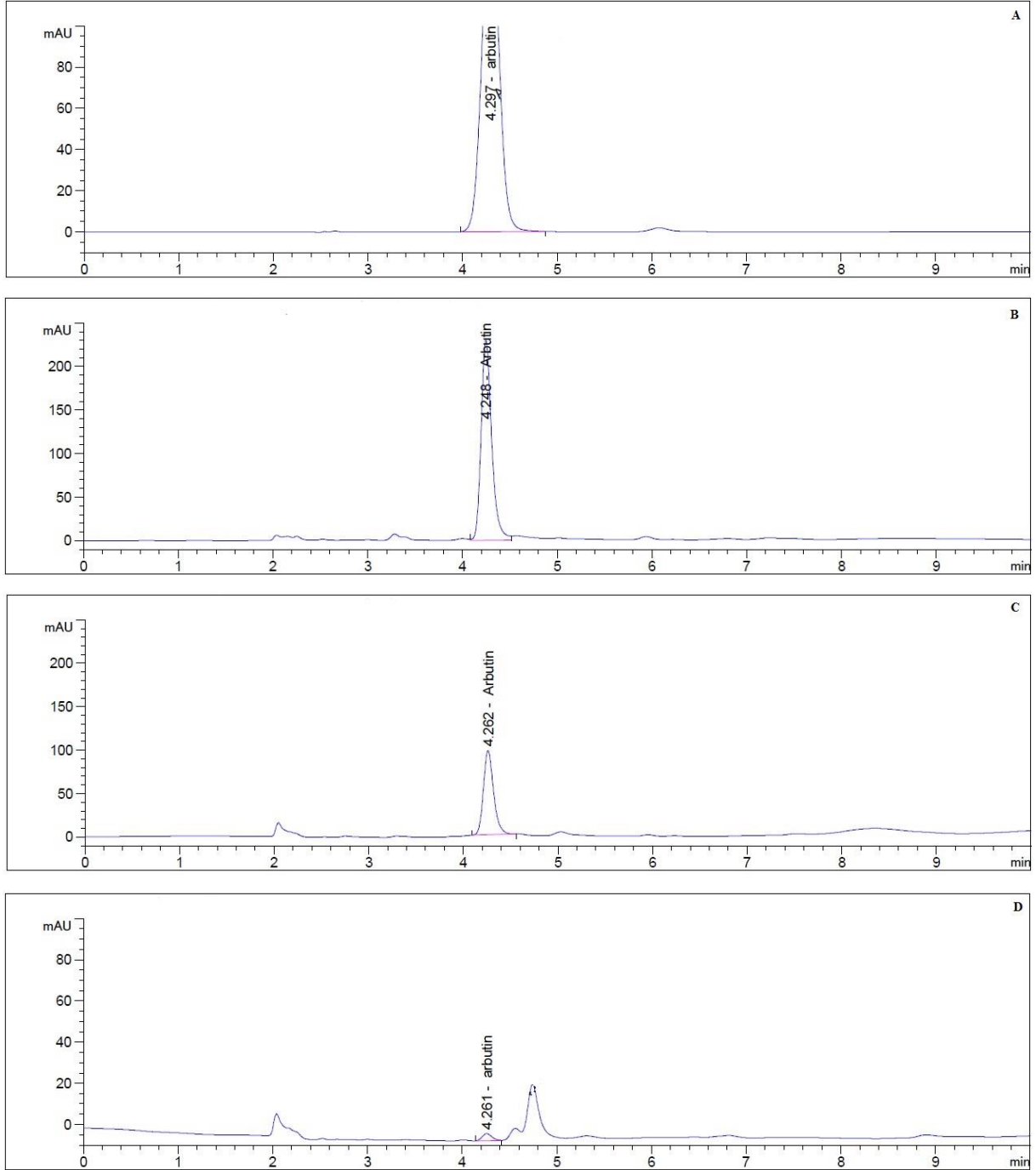
Analitik metot validasyonu için gerekli validasyon parametreleri Tablo 2'de özetlenmiştir.

*Tablo 2. Validasyon Parametreleri*

Parametreler	Arbutin
Keskinlik	Pik Sıfırlık Oranı 0.0010
Doğrusallık	Konsantrasyon Aralığı mg/L. 100-500
	Korelasyon Katsayısı 0.9999
	Kayma 8.0600
	Eğim 5.1866
Teşhis Limiti LOD (ppm)	3.5731
Tayin Limiti LOQ (ppm)	7.9390
Alıkonma Zamanı dk.	4.3220

## A. 2. Üç Farklı Ahlat Türünün Arbutin İçerikleri II

Üç farklı pyrus türünün kısımlarında belirlenen arbutin miktarları Tablo 3'te verilmiştir. Arbutin standardının ve ekstraktların kromatogramları Şekil 3'te verilmiştir.



**Şekil 3.** A: Arbutin Standart Solisyonu Kromatogramı (400 mg/L.), B: PAN'ın Yaprak Ekstarkı Kromatogramı C: PAN'ın Dal Ekstarkı Kromatogramı D: PAN'ın Meyve Ekstarkı Kromatogramı

**Tablo 3.** *Pyrus spp.* ekstraktlarında Arbutin miktarları

Ahlat Türü	Ekstrakt	Arbutin (mg/gr.)
<i>PAN</i>	Yaprak	21,23
	Dal	8,92
	Meyve	0,81
<i>PAM</i>	Yaprak	6,37
	Dal	3,35
	Meyve	1,13
<i>PEL</i>	Yaprak	0.96
	Dal	6.86
	Meyve	0.96

Arbutin içeriği üç türün HCl ekstraktlarında belirlenmiştir. Buna göre arbutin içeriği en fazla (21.23 mg/g) *PAN* yapraklarında saptanmıştır. Bunu aynı türün dal ekstraktları (8,92 mg/g) takip etmiştir. *PAM*'in yaprağının (6,37 mg/g) arbutin bakımından dal (3,35 mg/g) ve meyveye (1,13 mg/g) oranla daha zengin olduğu ancak *PEL*'nin dal (6,86 mg/g) ekstraktının diğer ekstraktlarına göre daha fazla arbutin içerdiği saptanmıştır.

Salta ve arkadaşları Portekiz'de yetişen bir armut çeşidi olan Rocha armutunun ve ticari olarak temin edilen armut çeşitleri Comice, Abate, General Leclerc ve Passe Crassane ile arbutin miktarlarını karşılaştırmışlardır. Çalışılan armut çeşitlerinin her birinde arbutin bulmuşlar ve en fazla Rocha armutta (22.5 mg/100 g Kuru Ağırlık) en az da G. Leclerc armutta (2.6 mg/100 g Kuru Ağırlık) arbutin içeriği belirlemişlerdir [27].

Yim ve arkadaşları tarafından test edilen 4 armut çeşidinde de arbutin saptanmıştır ve 124.45~26.21 mg/100 g Kuru Ağırlık arasında değişen değerler belirlenmiştir [28].

İzabella ve arkadaşları *Pyrus communis*'in yapraklarında arbutin miktarı 24,89±0,47 mg/g, çiçeğinde 14,13±0,28 mg/g geliştirdiği HPLC analizi ile belirlemişlerdir [29].

Dong ve arkadaşları *P. pyrifolia* yapraklarında 7,87 mg/g en fazla arbutin belirlemişlerdir. *P. Bretschneideri* yapraklarında en fazla 1,55 mg/g saptamışlardır [30].

## B. İN VİTRO SİTOTOKSİK AKTİVİTE II

Test edilen *P.anatolica*, *P.amygdaliformis* ve arbutin extractlarının MRC-7 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri (absorbans sonuçları ortalama ± SD; µg / ml ) olarak ifade edildi.

**Tablo 4.** Bitki Ekstraktlarının Hücre Kültürü Sonuçları

Ekstrakt	MCF-7
Kontrol( mcf-7 cell)	0.130±0.002 <sup>a</sup>
Metanol	3.072±0.198 <sup>cd</sup>
<i>PAN</i>	
Yaprak	



**Tablo 4. (devam). Bitki Ekstraktlarının Hücre Kültürü Sonuçları**

400 µg/ ml	3.131±0.023 <sup>cd</sup>
200 µg/ ml	3.127±0.060 <sup>cd</sup>
100 µg/ ml	3.150±0.076 <sup>cd</sup>
50 µg/ ml	3.142±0.072 <sup>cd</sup>
10 µg/ ml	3.145±0.040 <sup>cd</sup>
<b>PAM</b>	
Yaprak	
400 µg/ ml	3.090±0.203 <sup>cd</sup>
200 µg/ ml	3.191±0.042 <sup>d</sup>
100 µg/ ml	3.149±0.095 <sup>cd</sup>
50 µg/ ml	3.156±0.030 <sup>d</sup>
10 µg/ ml	3.111±0.096 <sup>cd</sup>
<b>Arbutin</b>	
25 µg/ ml	3.026±0.078 <sup>bcd</sup>
50 µg/ ml	2.941±0.188 <sup>cb</sup>
100 µg/ ml	2.864±0.138 <sup>b</sup>

SD: : Standard Deviation standart sapma; a,b,c; tür içi karşılaştırmayı, x,y,z; türler arası karşılaştırma (p≤0,05)

*Pyrus spp* ekstraktlarının karşılaştırılması tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi. Farklılıklar p≤0,05 ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak ekstraktlar arasında anlamlı bir fark olduğunu ifade ederken aynı harfler anlamlı bir fark olmadığını ifade etmektedir.

Mcf-7+besi metanol, arbutin ve bitki ekstraktlarına göre anlamlı, arbutin+mcf-7 (100 µg/ ml) nin de kontrol ortamlarına ve bitki ekstraktlarına göre anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ( p≤0,05 ). Bu çalışma sonucunda mcf-7 hücre hattına arbutinin sitotoksik etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bunun sebebi arbutinde konsantrasyona bağlı olarak bir artış var buda metanolden kaynaklanıyor olabilir. Bu yüzden farklı çözücüler kullanılabilir. Ayrıca bu duruma arbutinin bir glikozit türevi bileşik olması neden olabilir.

Hipertansiyon ve diyabette arbutin kullanılmaktadır. Arbutin ana bileşik olarak tedavi edicidir. *Jurica* ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Arbutus unedo L.* yaprak-su ekstraktlarının genotoksisite testlerinde alkalın comet assay, sitokinez blok mikronükleus sitome assay (CBMN Cyt assay), çift akrinin orange/etidyum bromür floresan boyaması teknikleri kullanılarak üç farklı yöntemle

araştırılmıştır. Bu türdeki yaprak-su ekstralarının arbutin miktarı 10,7 mg konsantrasyonda bulunmuştur (1 g kuru yaprakta 3,05 mg arbutine karşılık gelmektedir). Lenfosit etkisinin doza bağlı olduğu en yüksek lenfosit etkisinin 400 µg/ml arbutin içeren ekstrede %15 olduğunu saptamışlardır. Saf arbutin daha az sitotoksik etki göstermiştir. 200 µg/ml arbutin içeren ekstrakt yüksek konsantrasyonlara oranla apoptozu daha fazla indüklemiştir. 11, 4, 200, 400 µg/ml bu ekstraktlarda 24 saatte genotoksik etki saptanmıştır. 11, 4, 200, 400 µg/ml arbutin de aynı şekilde etki göstermemiştir. Yaprak-su ekstralarının güvenliği hakkında büyük bir boşluk vardır. Sonuç olarak bundan sonraki yapılacak çalışmalarda tümör hücre hattı çalışmaları yapılması gerektiğini bildirmişlerdir [31].

Bizim çalışmamızda *Pyrus spp.* ekstralarının 10, 50, 100, 200 ve 400 µg/ml arbutin standartının da 25, 50, 100 µg/ml konsantrasyonları MCF-7 hücre hattına uygulandı ve % hücre canlılığını mevcut çalışmalara benzer şekilde arbutinin hücre ölümüne bir etkisi olmadığı tespit edildi.

Jurica ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada *Arbutus unedo L.* yaprak ekstraktlarının ağız yoluyla alınımı ile arbutin ve hidrokinon ana hemotolojik etki, comet assay DNA hasarına bakılmıştır. Hidroksiquinon beyaz kan hücrelerini arttırırken, arbutin 14 günlük kullanım sonucunda düşmüştür ve comet deneyinde düşük genotoksisite olduğunu saptamışlardır [7].

Khana ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada arbutin kaynaklı sitotoksisitede insan bağırsak mikroflorası tarafından metabolizmanın olası bir rolü, insan hepatoma HepG2 hücreleri kullanılarak araştırılmıştır. Arbutin ve hidrokinonun (HQ), arbutinin deglikosile edilmiş bir metaboliti olan sitotoksik etkileri kıyaslandığında, HQ arbutinden daha toksiktir. Arbutin Bcl-2 ve Bax seviyelerini etkilememiştir. HQ ise proapoptotik Bax ekspresyonunda artış ve antiapoptotik Bcl-2'nin de düşmesine neden olmuştur. Ayrıca arbutin kaspaz-3 aktivitesi üzerine bir etki göstermemiştir. Sonuç olarak arbutin olmayan HQ hepG2 hücrelerinde toksisite ve apoptotik hücre ölümüne neden olabileceğini göstermiştir. Arbutinin toksisite için HQ'a dönüşmesi gerekmektedir [32].

Badiab ve arkadaşları anti-kanser bileşikleri olarak arbutin hakkında çok az çalışma olduğunu bildirmiş ve Li ve arkadaşlarının arbutinin, hücre döngüsü düzenlemesinde yer alan p21 ekspresyonundaki artışla TCCSUP insan mesane kanseri hücre proliferasyonunu azalttığını göstermişlerdir. Anti-kanser bileşiği olarak arbutin mekanizması, hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynayan hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazın (ERK) etkisizleştirilmesidir. Birçok doğal olarak türetilmiş arbutin türevi, farklı bitki türlerinden izole edilmiştir. Hidroksisinamoil arbutinlerin örnekleri, 4'-O - [(E) -p-koumaroil] arbutin (1), 4'-O - [(E) -kaffeoil] arbutin (2) ve 4'-O [(E) -feruloil] arbutin (3). Bu arbutin türevlerinin *Casaria multinervosa*'dan (Flacourtiaceae) izole edilmiştir. Bu türevlerin (1), (2) ve (3) P388 fare lenfositik lösemi hücre hattına karşı kanser önleyici aktivite gösterdiği bildirilmiştir. (1-3) 'ün LC50 değerleri 543, 179 ve 464 µg/ml olarak bulunmuştur. Sitotoksik aktiviteye sahip başka bir arbutin türevi, robustasidler D'dir. *Grevillea "Poorinda Kraliçesi"* nin (Proteaceae) yapraklarından ve dallarından izole edilen bu bileşik, insan embriyonik böbrek hücresi HEK-293'e karşı in vitro sitotoksik aktivite ve 195 µg/ml IC50 değeri insan hepatoma hücre çizgisi olan HEP-G2 ve IC50 değeri 221 µg/ml olan bir sitotoksisite göstermiştir. *Myrothamnus*'tan izole edilen önerilen yapı, Xu ve arkadaşlarından izole edilen arbutin türevlerine çok benzer. Bu nedenle, anti-kanser aktivite mekanizmasının benzer olabileceği öne sürülmüştür [33].

Kundakovic ve arkadaşları yaptığı çalışmada Arbutin, IC50 > 200 µg / ml ile in vitro olarak Fem-x ve MRC-5 hücrelerine karşı sitotoksik olmadığını bulmuşlardır. *P. pyraster*'in metanol ekstraktları (yapraklar ve kabuklar), 11.55 ila 46.78 µg / ml arasında değişen IC50 ve diklormetan ekstraktları 21.59 ila 13.34 µg / ml arasında değişen IC50 ile Fem-x hücrelerine karşı önemli sitotoksik etkiler sergilemiştir. *P. spinosa* kabuğunun diklormetan özü, test edilen her iki hücre hattına karşı da aktif olduğunu saptamışlardır (IC50 11.97 ve 12.92 µg / ml) [34].

Berdowska ve arkadaşları adriamisine dirençli MCF-7 / Adr ve vahşi tip MCF-7 / wt hücre hattında çalışmışlardır. Arbutinin bu iki insan meme hücre hattına karşı sitotoksisite sergilemediğini belirlemişlerdir [35].

Hong ve arkadaşları Licochalcone alfa / beta arbutin, B16 fare melanom hücrelerine ayrı ayrı uygulandığında, tirozinaz ekspresyonunu inhibe ettiğini ve ayrıca melanin sentezini engellediğini belirlemişlerdir. alfa / beta arbutinin bu hücrelerde tirozinaz ekspresyonunu arttırdığını ve melanin içeriğini daha da arttırdığını belirlemişlerdir [36].

#### **IV. TARTIŞMA**

Arbutin, çeşitli bitki türlerinin yapraklarında bulunan bir hidrokinon türevidir. Ya kimyasal sentez yoluyla üretilir ya da bulunduğu bitkilerden ekstrakte edilir. Son zamanlarda ciltte bulunan çil, leke ve akne tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal sentez yoluyla arbutin üretimi çok aşamalı işlem gerektirmekte olup çevre ve insan sağlığı açısından tehlikeli kimyasallar kullanılmaktadır. Maliyeti oldukça yüksektir. Bu nedenle çevre ve insan sağlığına değer veren ileri ülkelerde kimyasal sentez yolundan vazgeçilip doğal kaynaklardan ilaç etken maddelerinin ekstraksiyonu önem kazanmaktadır. Çalışmamız bu bağlamda son zamanlarda yaprak, dal ve meyvelerinden faydalanılmayan yabani ahlat türlerinden arbutin üretimi için yapılacak çalışmalara örnek teşkil edecektir. Bu üç türden tıbbi olarak faydalanma yolları araştırılacaktır. Ayrıca PAN türünün hem dal hem de yapraklarında arbutin içeriğinin yüksek oranda bulunması sadece ülkemize endemik olan bu türün önemini daha da artırmaktadır. Bu türlerin ekonomik değerini artırmak amaçlı türlerin arbutin içeriğini artırmaya yönelik ıslah çalışmaları yapılabilir.

#### **V. KAYNAKLAR**

- [1] P. H. Davis, "Flora of Turkey and the East Aegean Islands," *Edinburgh University*, Edinburgh, vol. 4, 1972.
- [2] H. I. Guk, K. H. Young, W. K. Sik, L. S. Hoon, L. Junsoo and J. H. Sang, "Isolation and Identification of the Antioxidant DDMP from Heated Pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai)," *Prev. Nutr. Food Sci.*, 18(1):76-79, 2013.
- [3] P. Dwivedi and P. Prakash, "Evaluation of Antioxidant Activity of *Pyrus Pyrifolia* Fruit Peel Extracts Using Different Extraction Methods," *Chemical Science Transactions*, vol. 3, no. 4, pp. 1511-1515, 2014.
- [4] J. Y. Cho, C. M. Kim, H. J. Lee, S. H. Lee, J. A. Cho, W. S. Kim, et al., "Caffeoyl triterpenes from pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) fruit peels and their antioxidative activities against oxidation of rat blood plasma," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61,no.19, pp. 4563-4569, 2013.
- [5] K. Ioku, J. Terao, N. Nakatani, "Antioxidative activity of arbutin in a solution and liposomal suspension," *Biosci Biotechnol Biochem*, 56:1658-1659, 1992.
- [6] S. H. Bang, S.J. Han, D. H. Kim, "Hydrolysis of arbutin to hydroquinone by human skin bacteria and its effect on antioxidant activity," *J Cosmet Dermatol*, 7:189-193, 2008.
- [7] K. Jurica, I. Gobin, D. Kremer, D. V. Cepo, R. J. Grubescic, I. B. Karaconji, I. Kosalec, "Arbutin and its metabolite hydroquinone as the main factors in the antimicrobial effect of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves," *J Herb Med*, 8:17-23, 2017.
- [8] D. Jiri, "Pyrus spinosa und ihre Hybriden in Südwestbulgarien," *Folia Geobotanica & Phytotaxonomica* (in German), 15 (1): 59-73, 1980.

- [9] İ. Bulduk, M. D. Sahin, S. Sanli, "Arbutin Analysis in Leaves, Fruit and Branches of *Pyrus Anatolica*, Method Optimization," *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 11(5):233–244, 2016.
- [10] N. J. Rivas, J. R. Whitaker, "Purification and Some Properties of Two Polyphenol Oxidases from Bartlett Pears," *Plant Physiology*, 52:501–507, 1973.
- [11] A. Chisvert, J. Sisternes, A. Balaguer, A. Salvado, "A gas chromatography-mass spectrometric method to determine skin-whitening agents in cosmetic products," *j.talanta*, *Talanta*, 81:530-6, 2010.
- [12] European Medicines Agency Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium, displayed 14 September 2015, Available at [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Herbal\\_-HMPCassessment\\_report/2011/07/WC500108750.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-HMPCassessment_report/2011/07/WC500108750.pdf).
- [13] M. Blaut, A. Braune, S. Wunderlich, P. Sauer, H. Schneider, H. Glatt, "Mutagenicity of arbutin in mammalian cells after activation by human intestinal bacter," *Food Chem Toxicol*, 44:1940-7, 2006.
- [14] D.C Hildebrand, CC. Jr. Powell, S. M. Schroth, "Fire blight resistance in *Pyrus*: localization of arbutin and betaglucosidase," *Phytopathology*, 59:1534-9, 1969.
- [15] G. Schindler, U. Patzak, B. Brinkhaus, A. von Niecieck, J. Wittig, N. Krämer, I. Glöckl, M. Veit, "Urinary excretion and metabolism of arbutin after oral administration of *Arctostaphylos uva-ursi* extract as film-coated tablets and aqueous solution in healthy humans," *J Clin Pharmacol*, 42:920-7, 2002.
- [16] S. G. Arriba, B. Naser, K-U. Nolte, "Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos uva-ursi* folium herbal preparations," *Int J Toxicol*, 32:442-53, 2014.
- [17] B. Lukas, C. Schmiderer, U. Mitteregger, J. Novak, "Arbutin in marjoram and oregano," *Food Chem*, 121:185–90, 2010.
- [18] I. Parejo, F. Viladomat, J. Bastida, C. Codina, "A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography," *Phytochem Anal*, 12:336-9, 2001.
- [19] R. D. Pavlović, B. Lakušić, Z. Došlov-Kokorus, N. Kovacević, "Arbutin content and antioxidant activity of some Ericaceae species," *Pharmazie*, 64:656-9, 2009.
- [20] I. Fecka, S. Turek, "Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from Lamiaceae: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques," *Food Chem*, 108:1039-53, 2008.
- [21] I. Rychlinska, S. Nowak, "Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC," *Not Bot Horti Agrobo*, 40:109-13, 2012.
- [22] C. Pop, L. Vlase, M. Tamas, "Natural resources containing arbutin. Determination of arbutin in the leaves of *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. acclimated in Romania," *Not Bot Horti Agrobo*, 37:129-32, 2009.
- [23] A. Lamien-Meda, B. Lukas, C. Schmiderer, C. Franz, J. Novak, "Validation of a quantitative assay of arbutin using gas chromatography in *Origanum majorana* and *Arctostaphylos uva-ursi* extracts," *Phytochem Anal*, 20:416–20, 2009.

- [24] A. Fiorentino, S. Castaldi, B. D'Abrosca, A. Natale, A. Carfora, A. Messere, P. Monaco, "Polyphenols from the hydroalcoholic extract of *Arbutus unedo* living in a monospecific Mediterranean woodland," *Biochem Syst Ecol*, 35:809- 11, 2007.
- [25] A. Pyka, K. Bober, A. Stolarczyk, "Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*Vaccinium vitis idaea*)," *Acta Pol Pharm*, 64:395-400, 2007.
- [26] ICH Q7 Guideline: Good Manufacturing Practice Guide For Active Pharmaceutical Ingredients. Current Version Dated 10 June 2015.
- [27] J. Salta, A. Martins, R. G. Santos, N. R. Neng, M. F. Jose, "Nogueira, Jorge Justino, Ame'lia P. Rauter. Phenolic composition and antioxidant activity of Rocha pear and other pear cultivars – A comparative study," *Journal of Functional Foods*, pp. 153-157, 2010.
- [28] S-H Yim, S-H Nam, "Physiochemical, nutritional and functional characterization of 10 different pear cultivars (*Pyrus* spp.)," *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 89:73-81, 2016.
- [29] I. Rychlinska, S. Nowak, "Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC," *Not Bot Horti Agrobo*, 40(2): 109-113, 2012.
- [30] X. Dong, Y. Zheng, Y. Cao, L. Tian, Y. Zhang, D. Qi, H. Huo, D. Wang, "Evaluation of Phenolic Composition and Content of Pear Varieties in Leaves from China," *Erwerbs-Obstbau*, 60:331–340, 2018.
- [31] K. Jurica, I. Brcic Karaconji, A. Mikolic, D. Milojkovic Opsenica, V. Benkovic, N. Kopjar, "In vitro safety assessment of the strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) water leaf extract and arbutin in human peripheral blood lymphocytes," *Cytotechnology*, 70:1261–1278, 2018.
- [32] T. Khana, H. G. Kim, Y. P. Hwang, M. J. Kong, M. J. Kang, H. K. Yeo, D. H. Kim, T. C. Jeong, H. G. Jeong, "Role of metabolism by the human intestinal microflora in arbutin-induced cytotoxicity in HepG2 cell cultures," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 413, pp. 318-324, 2011.
- [33] A. Badiab, F. Nabbie, M. C. Tettamanzi, N. Patel, N. Jain and B. Peethambaran, "Research Article Specific Cytotoxicity of a Novel Arbutin Derivative from *Myrothamnus flabellifolius* Against Human Leukemia Cells," *Research Journal of Medicinal Plants*, 10:396-402, 2016.
- [34] T. Kundakovic, A. Ciric, T. Stanojkovic, M. Sokovic and N. Kovacevic, "Cytotoxicity and antimicrobial activity of *Pyrus pyraeaster* Burgsd. and *Pyrus spinosa* Forssk. (Rosaceae)," *African Journal of Microbiology Research*, vol. 8(6), pp. 511-518, 5 February 2014.
- [35] I. Berdowska, B. Zielinski, I. Fecka, J. Kulbacka, J. Saczko, A. Gamian, "Cytotoxic impact of phenolics from Lamiaceae species on human breast cancer cells," *Elsevier Food Chemistry*, vol. 141, pp. 1313-1321, 2013.
- [36] J-H. Hong, H-J. Chen, S-J. Xiang, S-W. Cao, B-C. An, S-F. Ruan, B. Zhang, L-D. Weng, H-X Zhu, Q. Liu, "Capsaicin reverses the inhibitory effect of licochalcone A/ $\beta$ -Arbutin on tyrosinase expression in b16 mouse melanoma cells," vol. 14, pp. 110-115, 2018.