

**CİLT RENGİNİ AÇICI YENİ KREM
FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ VE
İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Mustafa Kutlu KAYTAN

Eskişehir 2020

**CİLT RENGİNİ AÇICI YENİ KREM FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ
VE *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ**

Mustafa Kutlu KAYTAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Aralık 2020

Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1903S017 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

JÜRİ ve ENSTİTÜ ONAYI

Mustafa Kutlu KAYTAN'ın "Cilt Rengini Açıcı Yeni Krem Formülasyonu Geliştirilmesi ve *İn Vitro* Değerlendirilmesi" başlıklı tezi/....../2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı, Kozmetoloji Bilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN	
Üye	: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL	
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Gülşah GEDİK	

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU KARABURUN
Enstitü Müdürü

ÖZET

CİLT RENGİNİ AÇICI YENİ KREM FORMÜLASYONU GELİŞTİRİLMESİ ve *İN VİTRO* DEĞERLENDİRİLMESİ

Mustafa Kutlu KAYTAN

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Aralık 2020

Danışman: Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN

İlaç ve kozmetik sanayileri satış verilerine göre ciltte oluşan kahverengi lekeler hastaların ve kozmetik kullanıcılarının en çok rahatsızlık duyduğu konuların başında gelmektedir. Melasma olarak da adlandırılan bu leke problemi için farklı etkin maddeler kullanılarak formülasyonlar geliştirilmiş ve bu konuda çözüm amaçlı çeşitli seçenekler ortaya çıkmıştır. Tirozinaz inhibitörleri, melanozoma transferini azaltan ajanlar, bakır iyonları ile şelat oluşturan etkin maddeler ve kimyasal soyucular gibi gruplar melasma tedavisinde çok etkili sonuçlar sunmaktadır. Bu grupların içindeki bazı etkin maddeler bitkisel kökenli iken, diğerleri sentetik olarak geliştirilmiş ve etki/yan etkileri incelenerek tasarlanmış gruplardır. Arbutinin dikkat çekici özelliği ise Hidrokinon benzeri etki ile tirozinaz inhibisyonu yapmasına rağmen daha az yan etki göstermesidir. Bu bağlamda hem sentetik hem de bitkisel kökenli etkin maddelerin etki mekanizmaları, yan etkileri ve taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi noktasında yapılacak çalışmalar, çözüm açısından hayati önem arz etmektedir. Ayrıca retinoik asit gibi deri yenilenmesini hızlandıran asidik maddeler cilt rengini açmalarına rağmen deri üzerinde yaptıkları tahriş ile hasta uyumunu zorlaştırmaktadır. Tüm bu sebepler ciltte tahriş yapmayan ve hasta uyumunu artıran bir formülasyon geliştirilmesini zorunlu kılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, bitkisel kökenli bir etkin madde olan arbutin içeren, bazik pH yapısı ile deri yenilenmesinde (deskuamasyon) asidik özellikteki formülasyonlara alternatif olarak gösterilebilecek yeni bir formülasyon tasarlamak ve standart olarak gösterilebilecek özellikteki bu formülasyonu kullanıma sunmaktır.

Anahtar Sözcükler: Arbutin, Melanin, Tirozinaz inhibitörü, Melasma, Cilt lekesi, Krem.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EVALUATION OF A NEW SKIN WHITENING CREAM FORMULATION

Mustafa Kutlu KAYTAN

Department of Pharmaceutical Technology

Department of Cosmetology

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, December 2020

Supervisor: Assist.Prof.Dr. Murat Sami BERKMAN

According to the sales data of pharmaceutical and cosmetics industries, brown spots on the skin are the most disturbed issue of patients and cosmetic users. Various options have emerged for this purpose with the development of formulations with different active substances to overcome this stain problem which is also known as melasma. Groups such as tyrosinase inhibitors, melanosome transfer reducer agents, chelating active ingredients with copper ions and chemical peelers offer very effective results in the melasma treatment. Some active ingredients in these groups are vegetable origin and the others are synthetically developed and designed by the investigation of the effects/side effects. Arbutin acts as a tyrosinase inhibitor like hydroquinone with few side effects. In this context, the action mechanism, side effects and carrier systems development studies of active substances of both synthetic and plant origin ingredients are vital for the problem solution. In addition, acidic substances such as retinoic acid, which accelerate the skin regeneration make patient harmony difficult despite the whitening of the skin. All these reasons necessitated the development of a new formulation that does not irritate the skin and increases patient compliance.

The purpose of this study is to develop a new formulation containing an herbal origin active ingredient Arbutin. This standard formulation with alkaline pH structure can be used as an alternative to the skin regenerative (desquamation) acidic formulations.

Keywords: Arbutin, Melanin, Tyrosinase Inhibitor, Melasma, Skin Blemish, Cream.

TEŞEKKÜR

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, hayatımın her aşamasında bana maddi ve manevi destek olan ve yüreklendiren babam Ecz. Musa KAYTAN ve annem emekli Banka memuru Emine Reyhan KAYTAN'a,

Hayatımın her alanında ve her zaman yanımda olan, desteğini her zaman hissettiğim kardeşim Dr. Öğr. Üyesi Saadet Mutlu KAYTAN'a,

Kritik kararlarımda her zaman doğru yön veren, sevgisini ve güvenini her zaman hissettiğim eşim Diş Hekimi İlgin Revna KAYTAN'a,

Sevgileri ve tutkuları ile her zaman yaşam amacım olan, hayatımı dolduran biricik çocuklarım Musa Tuğrul KAYTAN ve Tuğçe Ebrar KAYTAN'a,

Tez çalışmalarım süresince geniş bilgi ve deneyimleriyle yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Müzeyyen DEMİREL'e,

Gerek tez çalışmalarım, gerekse iş hayatım süresince geniş bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, her konuda yardımlarını esirgemeyen tez danışman hocam Dr.Öğr.Üyesi Murat Sami BERKMAN'a,

Çalışmalarımda yakın ilgi gösteren ve yardımlarını esirgemeyen Anabilim Dalı hocalarım Doç.Dr. Mustafa Sinan KAYNAK, Doç.Dr. Ebru BAŞARAN, Doç.Dr. Evrim YENİLMEZ, Dr. Öğr. Üyesi Gülsel YURTDAS KIRIMLIOĞLU, Doç. Dr. Ahmet Alper ÖZTÜRK ve Araş.Gör. Sinan ÖZER'e,

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve arkadaşlığını esirgemeyen Kadri GÜLEÇ'e teşekkürlerimi sunarım.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programıyla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Mustafa Kutlu KAYTAN

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
GÖRSELLER DİZİNİ	xvi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. KAYNAK BİLGİSİ	2
2.1. Melasma	2
2.2. Melasma Tedavisinde Kullanılan Etkin Maddeler	3
2.3. Tirozinaz İnhibisyonu Yapan Ajanlar	4
2.3.1. Arbutin	4
2.3.2. Hidrokinon	6
2.3.3. Azelaik asit	7
2.3.4. Meyan kökü (<i>Licorice</i>) ekstraktı	7
2.3.5. Mekuinol	8
2.4. Melanozoma Transferini Azaltan Ajanlar	8
2.4.1. Niasinamid	8
2.4.2. Retinoidler	8
2.4.3. Soya	9
2.5. Bakır ile Etkileşime Giren Ajanlar	9
2.5.1. Askorbik asit	9
2.5.2. Kojik asit	10
2.6. Kimyasal Soyucu Ajanlar	10
2.6.1. Glikolik asit	10
2.6.2. Salisilik asit	10
2.6.3. Laktik asit	11
2.6.4. Triklorasetik asit	11

2.6.5. Tretinoin	11
2.7. İlaç Uygulama Yolları	12
2.8. Topikal Uygulama ve Taşıyıcı Sistemler	12
2.9. Emülsiyon Sistemler	12
2.9.1. Emülsiyon sistemlerin karakterizasyonu	14
2.9.1.1. <i>Görünüş</i>	14
2.9.1.2. <i>Damlacık büyüklüğü</i>	14
2.9.1.3. <i>pH</i>	14
2.9.1.4. <i>Viskozite</i>	14
2.9.2. Emülsiyonun oluşumu	15
2.9.3. Emülsiyon yapıcı madde	15
2.9.4. Klasik emülsiyon hazırlama yöntemleri	16
2.9.5. Emülsiyon kararlılığı	17
2.9.5.1. <i>Faz dönüşümü</i>	18
2.9.5.2. <i>Kimyasal ve fiziksel değişimler</i>	18
2.9.5.3. <i>Flokülasyon ve kremalaşma</i>	18
2.9.5.4. <i>Koalesans ve faz ayrışması</i>	19
2.9.5.5. <i>Kararlılık testleri</i>	19
2.9.6. Emülsiyonların reolojik özellikleri	22
2.10. Formülasyon ve Bileşenleri	23
2.10.1. Gliserin	24
2.10.2. Gliserol monostearat	24
2.10.3. Propilen glikol	25
2.10.4. Setil alkol	25
2.10.5. Stearik asit	25
2.10.6. Trietanolamin	26
2.10.7. Gül hidrolatı	26
2.10.8. Tatlı badem yağı	27
2.10.9. Zeytin yağı	27
2.11. Derinin Özellikleri ve Yapısı	28
2.12. Deri Rengi	28
2.12.1. Melanin	29

	<u>Sayfa</u>
2.13. Derinin Tabakaları	31
2.13.1. Epidermis	31
2.13.1.1. <i>Stratum corneum</i> (boynuzsu tabaka)	32
2.13.1.2. <i>Stratum lucidum</i>	33
2.13.1.3. <i>Stratum granulosum</i> (granüler tabaka)	33
2.13.1.4. <i>Stratum spinosum</i> (diken, sivri uç tabakası)	33
2.13.1.5. <i>Stratum germinativum</i> (bazal tabaka)	33
2.13.2. Dermis	33
2.13.3. Hipodermis (deri altı tabaka)	34
2.14. Deri Uzantıları	34
3. GEREÇLER	35
3.1. Kullanılan Maddeler	35
3.2. Kullanılan Cihazlar	36
4. YÖNTEMLER	37
4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları	37
4.1.1. Doğrusallık (Linearity)	38
4.1.2. Kesinlik (Precision)	38
4.1.3. Doğruluk (Accuracy)	39
4.1.4. Duyarlılık (Sensitivity)	39
4.1.5. Seçicilik (Specificity)	39
4.2. Optimum Formülasyonun Belirlenmesi	39
4.3. Arbutin İçeren Formülasyon Hazırlanması	41
4.4. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	42
4.4.1. Organoleptik kontroller	42
4.4.2. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması	42
4.4.3. pH analizi	42
4.4.4. Termal analiz	42
4.4.5. Reolojik analiz	43
4.4.6. Etkin madde miktar tayini	43
4.5. Stabilite Testleri	43
4.5.1. Organoleptik kontroller	43
4.5.2. pH analizi	43

	<u>Sayfa</u>
4.5.3. Termal analiz	44
4.5.4. Reolojik analiz	44
4.5.5. Etkin madde miktar tayini	44
5. BULGULAR ve TARTIŞMA	45
5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları	45
5.1.1. Doğrusallık (Linearity)	45
5.1.2. Kesinlik (Precision)	47
5.1.2.1. <i>Tekrar edilebilirlik (Repeatability)</i>	47
5.1.2.2. <i>Ara ürün kesinliği (Intermediate precision)</i>	48
5.1.3. Doğruluk (Accuracy)	49
5.1.4. Duyarlılık (Sensitivity)	51
5.1.5. Seçicilik (Specificity)	51
5.2. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları	52
5.2.1. Organoleptik kontroller	52
5.2.2. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması	52
5.2.3. pH analizi	53
5.2.4. Termal analiz	53
5.2.5. Reolojik analiz	54
5.2.6. Etkin madde miktar tayini	56
5.3. Stabilité Testleri	56
5.3.1. Organoleptik kontroller	56
5.3.2. pH analizi	59
5.3.3. Termal analiz	62
5.3.4. Reolojik analiz	65
5.3.5. Etkin madde miktar tayini	71
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	76
KAYNAKÇA	78
ÖZGEÇMİŞ	92

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Damlacık büyüklüğü ve emülsiyon görünüşü arasındaki ilişki	12
Çizelge 4.1. Ultra performanslı sıvı kromatografisi çalışma koşulları	38
Çizelge 4.2. Farklı oranlarda hazırlanan klasik emülsiyonlar	40
Çizelge 4.3. Hazırlanan emülsiyonlarda yapılan organoleptik kontroller	41
Çizelge 5.1. Seri 1 UPLC sonuçları ve değerlendirilmesi	45
Çizelge 5.2. Seri 2 UPLC sonuçları ve değerlendirilmesi	45
Çizelge 5.3. Seri 3 UPLC sonuçları ve değerlendirilmesi	45
Çizelge 5.4. Doğrusallık hesabı için 3 seriden elde edilen ortalama Alan/R _t değerleri.	46
Çizelge 5.5. Doğrusallık çalışması regresyon istatistiği sonuçları	47
Çizelge 5.6. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün	48
Çizelge 5.7. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün	48
Çizelge 5.8. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün	48
Çizelge 5.9. Kesinlik sonuçlarının raporlanması	49
Çizelge 5.10. 40 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	50
Çizelge 5.11. 60 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	50
Çizelge 5.12. 80 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması	50
Çizelge 5.13. Doğruluk çalışması özet sonuçları	51
Çizelge 5.14. 10-100 µg/mL konsantrasyon aralığındaki doğrusallık çalışması sonucu	51
Çizelge 5.15. Karakterizasyon çalışmaları - organoleptik kontroller	53
Çizelge 5.16. Etkin maddeli formülasyonun sıfırıncı zaman pH değerleri	53
Çizelge 5.17. Arbutin içeren krem formülasyonunun reolojik analizi	55
Çizelge 5.18. Taze hazırlanan krem formülasyonlarında arbutin miktar tayini	55
Çizelge 5.19. Stabilite testleri - organoleptik kontroller / genel görünüş	57
Çizelge 5.20. Stabilite testleri - organoleptik kontroller / kıvam	57
Çizelge 5.21. Stabilite testleri - organoleptik kontroller / faz ayrışması	58
Çizelge 5.22. Stabilite testleri - organoleptik kontroller / koku	58
Çizelge 5.23. Stabilite testleri - organoleptik kontroller / renk	59
Çizelge 5.24. 4±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların pH değerleri	59
Çizelge 5.25. 25±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların pH değerleri	60
Çizelge 5.26. 40±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların pH değerleri	60
Çizelge 5.27. Ortalama pH değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları	61

Çizelge 5.28. Two way ANOVA değerlendirme tablosu	62
Çizelge 5.29. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reoloji sonuçları.....	65
Çizelge 5.30. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reoloji sonuçları	65
Çizelge 5.31. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reoloji sonuçları	66
Çizelge 5.32. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reoloji sonuçları	66
Çizelge 5.33. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reoloji sonuçları	67
Çizelge 5.34. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reoloji sonuçları	67
Çizelge 5.35. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reoloji sonuçları	68
Çizelge 5.36. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reoloji sonuçları	68
Çizelge 5.37. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reoloji sonuçları	69
Çizelge 5.38. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reoloji sonuçları	69
Çizelge 5.39. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reoloji sonuçları	70
Çizelge 5.40. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reoloji sonuçları	70
Çizelge 5.41. Taze hazırlanan krem formülasyonlarında sıfırncı zaman arbutin miktar tayini	72
Çizelge 5.42. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 1. ay arbutin miktar tayini	72
Çizelge 5.43. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 2. ay arbutin miktar tayini	72
Çizelge 5.44. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 3. ay arbutin miktar tayini	73
Çizelge 5.45. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 1. ay arbutin miktar tayini	73
Çizelge 5.46. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 2. ay arbutin miktar tayini	73
Çizelge 5.47. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 3. ay arbutin miktar tayini	73
Çizelge 5.48. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 1. ay arbutin miktar tayini	74

Sayfa

Çizelge 5.49. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 2. ay arbutin miktar tayini	74
Çizelge 5.50. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 3. ay arbutin miktar tayini	74
Çizelge 5.51. Stabilite sonrası karşılaştırmalı % arbutin miktarları	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. α -arbutin ve β -arbutinin kimyasal yapıları	5
Şekil 2.2. Hidrokinon kimyasal yapısı	7
Şekil 2.3. Askorbik asit kimyasal yapısı	10
Şekil 2.4. Salisilik asitin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.5. Tretinoinin kimyasal yapısı	11
Şekil 2.6. Gliserin kimyasal yapısı	24
Şekil 2.7. Gliserol monostearat kimyasal yapısı	24
Şekil 2.8. Setil alkol kimyasal yapısı	25
Şekil 2.9. Stearik asit kimyasal yapısı	26
Şekil 2.10. Trietanolamin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.11. Melanin sentezi şeması	30
Şekil 2.12. Derinin tabakaları	31
Şekil 2.13. Epidermin yapısı	32
Şekil 2.14. Dermisin yapısı	33
Şekil 2.15. Hipodermisin mikroskopik görüntüsü	34
Şekil 5.1. Arbutin etkin maddesi için oluşturulan doğru denklemi	46
Şekil 5.2. Arbutin içeren formülasyon ve plasebo formülasyon	52
Şekil 5.3. Arbutin etkin maddesinin termogramı	54
Şekil 5.4. Plasebo krem formülasyonunun termogramı	54
Şekil 5.5. Arbutin içeren krem formülasyonunun termogramı	54
Şekil 5.6. Arbutin içeren krem formülasyonunun reogramı	55
Şekil 5.7. Farklı ortamlarda saklanan formülasyonların ortalama pH değerleri	60
Şekil 5.8. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1.ay termogramı	62
Şekil 5.9. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2.ay termogramı	62
Şekil 5.10. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3.ay termogramı	62
Şekil 5.11. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1.ay termogramı	63
Şekil 5.12. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2.ay termogramı	63
Şekil 5.13. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3.ay termogramı	63
Şekil 5.14. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1.ay termogramı	63
Şekil 5.15. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2.ay termogramı	64
Şekil 5.16. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3.ay termogramı	64

Sayfa

Şekil 5.17. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reogramı	66
Şekil 5.18. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reogramı	66
Şekil 5.19. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reogramı	67
Şekil 5.20. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reogramı	67
Şekil 5.21. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reogramı	68
Şekil 5.22. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reogramı	68
Şekil 5.23. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reogramı	69
Şekil 5.24. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reogramı	69
Şekil 5.25. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reogramı	70
Şekil 5.26. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reogramı	70
Şekil 5.27. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reogramı	71
Şekil 5.28. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reogramı	71

GÖRSELLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Görsel 2.1. Alın, yanaklar, burun, üst dudaklar ve çeneyi işgal eden lekeler	2
Görsel 2.2. <i>Arctostaphylos uva ursi</i> bitkisinin meyve ve yaprakları	4
Görsel 2.3. Meyan bitkisi	8
Görsel 2.4. <i>Rosa damascena</i>	27

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

BSS	: Bağıl standart sapma
CI	: Güven aralıkları (<i>Confidence intervals</i>)
cP	: Santipواز, (<i>Centipoise</i>)
CTAB	: Setil metil amonyum bromür
D	: Din, (<i>dyne</i>)
dk.	: Dakika
DOPA	: 3,4-dihidroksifenilalanin
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetri (<i>Differential scanning calorimetry</i>)
DTA	: Diferansiyel termal analiz
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (<i>United States Food And Drug Administration</i>)
GMS	: Gliserol monostearat
h:h	: hacim:hacim
ICH	: Uluslararası Harmonizasyon Topluluğu (<i>The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>)
ia.	: Arter içi, intraarteryel
id.	: Deri içi, intradermal
ik.	: Kalp içi, intrakardiyak
im.	: Kas içi, intramüsküler
ip.	: Periton içi, intraperitoneal
it.	: Soluk borusu içi, intratrakeal
iv.	: Damar içi, intravenöz
Konst	: Konsantrasyon
LOD	: Saptama sınırı (<i>Limit of detection</i>)
LOQ	: Miktar tayini sınırı (<i>Limit of quantitation</i>)
MEB	: Milli Eğitim Bakanlığı
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit

n	: Deney tekrar sayısı
o.	: Oral yol, ağızdan ilaç alımı
Ort	: Ortalama
Os.	: Oral yol, ağızdan ilaç alımı
PİH	: Post inflamasyon hastalığı
po.	: Oral yol, ağızdan ilaç alımı (<i>Per os, per oral</i>)
R	: Korelasyon katsayısı
R ²	: Determinasyon katsayısı
R _t	: Tutunma zamanı (<i>Retention time</i>)
rpm	: Dakikadaki dönüş (<i>Rotation per minute</i>)
RSS	: Artık kareler toplamı (<i>Residual sum of squares</i>)
s.	: Saniye
SALT	: Deri ile ilişkili lenfoit doku (<i>Skin associated lymphoid tissue</i>)
sc.	: Deri altı, subkutan
SCCS	: Tüketici güvenliği bilimsel komitesi (<i>Scientific Committee on Consumer Safety</i>)
SH	: Standart hata
SOS	: Sodyum oktil sülfat
SS	: Standart sapma
S/Y	: Yağ içinde su emülsiyonu
S/Y/S	: Su içinde S/Y emülsiyonu
UPLC	: Ultra performanslı sıvı kromatografisi (<i>Ultra performance liquid chromatography</i>)
UV	: Ultraviyole
Y/S	: Su içinde yağ emülsiyonu
Y/S/Y	: Yağ içinde Y/S emülsiyonu

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Deri, vücudumuzun en büyük organıdır (Büyükköroğlu, 1998). Yaklaşık 2.0 m² olan yüzey alanı (Jungueira ve Carneiro, 1993) ve 10 kg ağırlığı (Yazan, 1996) ile vücut ağırlığının yaklaşık %15'ini oluşturur. Derinin kalınlığı 0.5-3.0 mm kadardır. Hareket etmeye imkân verebilecek kadar esnek ve uyarıları algılayabilecek derecede incedir. Bütün vücudu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere karşı korur (Büyükköroğlu, 1998). Vücut sıcaklığının korunmasında bir termostat gibi rol oynar. Ayrıca UV ışınlarına karşı iyi bir koruma sağlar. Derinin yüzeyi bir asit mantosuyla kaplıdır ve pH'sı 5.2-5.6 arasındadır. Ayrıca yüksek miktarda kalsiyum iyonu (yaklaşık 1.0 mg/g doku) içerir. Bunlardan başka deri, vücudu antijenik uyarılardan korur. İmmün sistemin bir parçası olarak çalışan derinin bu bölümüne deri ile ilişkili lenfoid doku (SALT, *skin associated lymphoid tissue*) denir.

Deri yaşlanması, özellikle kozmetik ve sağlık açısından otuzlu ve daha üstü yaş grubundaki kişilerin yoğun olarak etkilendikleri durumlardan biridir. Doğal ya da çevresel etmenlere bağlı olarak gelişen deri yaşlanması sonucu deride görülen kuruluk, kırışıklık, esneklik kaybı ve istenmeyen lekelenme sorunları her zaman kozmetoloji ve dermatolojinin konusu olmuş ve hastaların çözüm bekledikleri önemli konuların başında gelmiştir.

Çalışmamızda, melasma tedavisinde altın standart olarak kabul edilen, Kligman, Pathak ve Westerhoof formüllerinde yer alan ve tahriş yapıcı hidrokinon maddesine ve yine ciltte tahriş yapan asit pH'ya alternatif özellikte ve yan etkileri daha az olan bitkisel arbutin etkin maddesini içeren, bazik pH özellikli bir taşıyıcı sistem hazırlanarak en yüksek hasta ve kozmetik kullanıcısı memnuniyeti sağlayacak formülasyon tasarlanması amaçlanmıştır. Projenin sonunda hedeflenen, melasma tedavisinde ve ciltteki kahverengi lekeleri açmada başarılı olan, kararlılık sorunları olmayan, deri yenilenmesinde ve derinin epitel tabakasının iri veya ufak parçalar halinde dökülmesinde (deskuamasyon) asidik özellikteki formülasyonlara alternatif olarak gösterilebilecek tahriş ve dermatit gibi yan etkileri minimize edilmiş, kullanımı kolay, standart kabul edilebilecek etkin ve güvenli bir formülasyon geliştirmek ve kullanıma sunmaktır.

2. KAYNAK BİLGİSİ

2.1. Melasma

Bir cilt yaşlanması olarak melasma, yüz bölgesinde ve güneş maruziyeti ile açık ve koyu kahverengi tonlarında (**Görsel 2.1**) gelişir (Kwon vd., 2016). Kadınlarda daha yaygındır. Hasta popülasyonu bildirilen olgularda %10 erkek ve %90 kadın olarak gerçekleşmektedir. (Cüre, Kocatürk ve Kızıltaç, 2016). Güney ve Doğu Asya kökenli kişiler Fitzpatrick deri tipi 4-5 olarak adlandırılırlar ve yoğun ultraviyole (UV) radyasyona maruz kaldıkları için daha sık rastlanan gruptadırlar. (Grimes, 1995).

Patojenisi henüz tam olarak anlaşılmamasına rağmen cilde uygulanan girişimsel işlemler, kronik UV maruziyeti, bazı besinler, over tümörleri, intestinal parazitolar, hormon replasman tedavileri, bazı kozmetikler, foto duyarlaştırıcı ilaçlar, oral kontraseptif ve steroid kullanımı, inflamasyonu tetikleyen durumlar, stres, gebelik ve genetik, tetikleyici faktörler arasında sayılabilir (Handel, Miot ve Miot, 2014).



Görsel 2.1. *Ahn, yanaklar, burun, üst dudaklar ve çeneyi işgal eden lekeler (Sehgal vd., 2011)*

Bireyler arası cilt rengindeki farklılık ve çeşitliliğin ana sebepleri UV ışınlarına maruziyet, genetik faktörler, cildimizde yer alan pigmentler ve çevresel faktörlerdir. Epidermiste yer alan melanin, cilt rengini etkileyen temel pigment olarak kabul edilir. Bu nedenle melanin sentezini sağlayan melanositlerin sayısı, melanojenik aktivite, melanin tipi, melanozomların büyüklüğü, sayısı ve dağılımı da cilt rengini belirleyen önemli faktörlerdendir (Rawlings, 2006).

Melasma hastalığında genetik faktörler ve UV ışınlarına maruz kalma temel faktörlerdir (Algın Yapar, 2017). UV ışınları maruziyetiyle deride renk koyulaşması yapan oluşumlar;

- melaninin oksidasyon ve polimerizasyonu,
- melanozomların dağılımının değişimi,
- melanositlerde melaninin artmasını sağlayan enzimin aktivasyonu,
- melanosit uyarıcı hormon salınımının artması ve
- derinin UV radyasyondan zarar görmesini engellemek için melaninin epidermin üst kısımlarına transferidir (Coelho vd., 2009; Yamaguchi, Brenner ve Hearing, 2007).

Günümüz estetik ve güzellik anlayışında cildin parlak, kırışksız ve lekesiz bir görüntüde olması popülerlik kazanmış bir olgudur. Bu nedenle ciltte oluşan kahverengi lekeler olarak adlandırdığımız Melasma kabul edilmeyen bir estetik ve güzellik sorunu olarak çözüm arayışlarının odağında yer almaktadır.

2.2. Melasma Tedavisinde Kullanılan Etkin Maddeler

Melasma tedavisinde kullanılan etkin maddeler ya da cilt beyazlatıcı ajanlar yapılarına ve etki mekanizmalarına göre ikiye ayrılır (Algın Yapar, 2017).

Yapılarına göre;

- kimyasal kökenli tirozinaz inhibitörleri (hidrokinon vb.),
- doğal bileşikler (bitki ve alg kaynaklı),
- anti-oksidan etkili bileşikler,
- vitaminler (Vitamin A, B, C ve E),
- peptidler,
- alfa ve beta hidroksi asitler ile türevleri olarak sınıflandırılabilir (Kamakshi, 2012).

Etki mekanizmalarına göre ise;

- melanin sentezi öncesi (melanozomların yapı ve fonksiyonlarını değiştirme, transkripsiyon inhibisyonu veya glikosilasyon inhibisyonuna) etkili ajanlar. Örneğin tretinoin,
- melanin sentezi sırasında (tirozinaz inhibisyonu, peroksidaz inhibisyonu, reaktif oksijen süpürücüleri, lipidler) etkili ajanlar. Örneğin hidrokinon, arbutin, kojik asit, azeleik asit, vitamin C, vitamin B5, glutatyon,

- melanin sentezi sonrası (melanozom transfer inhibisyonu, melanin dispersiyonu) etkili ajanlar. Örneğin alfa hidroksi asitler (glikolik, laktik, sitrik, malik, piruvik ve salisilik asitler) ve bunların türevleri, vitamin B3 (Briganti, Camera ve Picardo, 2003).

2.3. Tirozinaz İnhibisyonu Yapan Ajanlar

2.3.1. Arbutin

Ericaceae (bearberry, çilek ağacı, huckleberry, funda), *Saxifragaceae*, *Asteraceae*, *Rosaceae*, *Lamiaceae* ve *Apiaceae* aileleri gibi çeşitli bitkilerden elde edilir. Ayı üzümü olarak bilinen *Arctostaphylos uva ursi* (Bearberry) bitkisi (**Görsel 2.2**) fitoterapide özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında kullanılır ve yapraklarında %17 oranında arbutin bulunur (Rychlińska ve Nowak, 2012, Cüre, Kocatürk ve Kızıлтаç 2016).

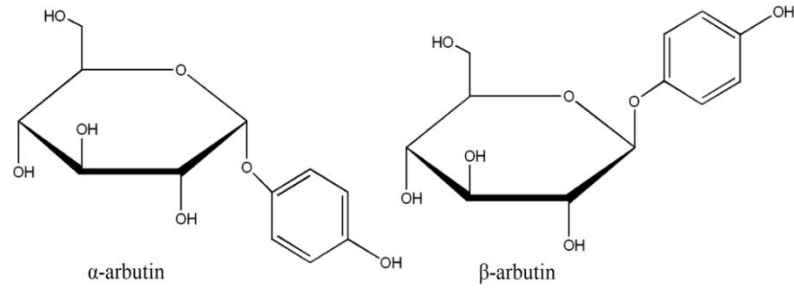


Görsel 2.2. *Arctostaphylos uva ursi* bitkisinin meyve ve yaprakları (<http-1>; <http-2>)

Güçlü bir tirozinaz inhibitörü olan arbutin, iki izomerli 4-hidroksifenil grubu içeren bir glukonopiranozittir. Mesajcı ribonükleik asit (mRNA) ekspresyonunu etkilemeden tirozinaz etkinliğini azaltır ve melanozom olgunlaşmasını inhibe eder. Arbutin, glikozile bir hidrokinondur. Güneş ışınlarına karşı koruyucu ve antioksidan özellik gösterir (Migas ve Krauze-Baranowska, 2015). Arbutinin geri dönüşümsüz hipopigmentasyona neden olma olasılığı hidrokinona göre daha azdır. Tahrişe neden olmaz ve hücreye daha az toksik şekilde etki eder, hücre fonksiyonlarını daha az etkiler; hidrokinonun stabil bir türevidir (Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2015).

Suda, metanolde, etanolde, propilen glikolde ve gliserinin sulu çözeltisinde çözünür ve çözüldükten sonra çökelti yoktur. Kloroform, eter ve petrol eteri, vb. içinde çözünmez (http-3). Sudaki çözünürlüğü oda sıcaklığında 10-15 g/100 mL olarak tanımlıdır (Mathew ve Adlercreutz, 2013). Kremler, losyonlar ve jeller içindeki kullanım oranı %1-3 arasındadır (Degen, 2015).

Birçok çalışma arbutinin hidrokinon kadar etkili olduğunu, ancak daha az toksik olduğunu göstermektedir. α ve β olarak iki çeşit optik izomeri vardır (Şekil 2.1). α -arbutin, memeli tirozinazlarına karşı daha büyük inhibitör aktiviteye sahiptir, ultraviyole radyasyonunun neden olduğu hasar görmüş cildi onarabilir (Sugimoto vd., 2005).



Şekil 2.1. α -arbutin ve β -arbutinin kimyasal yapıları (Garcia-Jimenez vd., 2017)

Karşılaştırma yapılacak olursa α -arbutinin kahverengi leke açıcı etkisi, β -arbutinin yaklaşık 10 katıdır (Sugimoto vd., 2005). Deriye hızla nüfuz edebilir ve kromoplast kütikülünün derinliklerinde bulunan tirozinaz aktivitesini inhibe edebilir. Daha sonra cildin yüzeyinde çift bir etki oluşturur ve melanin oluşumunu engeller (Pillaiyar, Manickam ve Namasivayam 2017). Tirozinaz, bir bakır enzimidir. Cildin pigmentasyonuna neden olan ve UV kaynaklı hasarlardan koruyan melaninin üretiminde rol oynar (Garcia-Jimenez vd., 2017). Tirozinaz enzimi iki tip reaksiyonu katalize eder:

- monofenollerin orto-hidroksilasyonu, o-difenollere (monofenolaz etkinliği)
- o-difenollerin o-kinonlara oksidasyonu (difenolaz etkinliği)

Her iki reaksiyon kosubstrat olarak moleküler oksijen kullanır (Sánchez-Ferrer vd., 1995).

Hidrokinonda olmayan glikozun arbutinin yapısında olması sebebiyle, hidrokinonun yaptığı dermatit gibi yan etkiler arbutin etkin maddesinin kullanımı sırasında fazla görülmez (Masse vd., 2002). Ayrıca deriye uygulandığında emilerek hidrokinona indirgenir ve benzer etki gösterir (Vashi ve Kundu, 2013). Yapılan bazı

çalışmalarda, cilt mikroflorasında arbutinin hidrokinona hidrolize olduğu ve böylece asıl aktiviteden de hidrokinonun sorumlu olduğu gösterilmiştir (Masse vd., 2002).

Cilt bakım ürünlerinde α ve β arbutinin güvenli kullanım konsantrasyonları sırasıyla %2 ve %7'dir. Kozmetik preparatların içerisinde bu orandan fazla kullanıldığında ışığa duyarlılık gösterebilir. Bununla birlikte β arbutinin %5 gibi düşük konsantrasyonda kullanımında, formölasyona C vitamini eklenirse daha kalıcı, daha kararlı bir yapı elde edilir ve cilt üzerinde tahriş edici bir etki yaratmaz. Prednizolon, deksametazon veya indometasin ile kombinasyon halinde kullanılırsa kontakt dermatit engellenebilir (Couteau ve Coiffard, 2016).

Arbutinin hidrokinona göre en önemli avantajı, etkili dozlarda önemli yan etkilerin, mutajenik veya karsinojenik özelliğinin olmamasıdır (Nordlund, Grimes ve Ortonne, 2006). α -arbutin, kojik asit ve hidrokinon gibi leke rengini açıcı maddelerden biri olmakla birlikte kararlı olması nedeniyle kojik asitten ve zararsız olması nedeniyle de hidrokinondan daha etkili bir maddedir (Cüre, Kocatürk ve Kızıldağ, 2016; Yazan, 2010). Özellikle ferulik asit ve C vitamini gibi maddelerle birlikte kombine kullanıldığında etki düzeyi oldukça artmaktadır. Arbutin ayrıca, antioksidan, büzücü ve dezenfektan gibi özellikler de gösterir (Migas ve Krauze-Baranowska, 2015). Sonuç olarak, arbutin ve türevleri etkili ve güvenli antimelanojenik maddelerdir ve böylece çeşitli kozmetik ürünlerde hiperpigmentasyonu gidermek amacıyla kullanılır (Lim vd., 2009; Maeda ve Fukuda, 1996). Temel fiziksel ve kimyasal özellikleri,

Fiziksel Durum: Beyaz kristal yapıda toz

Renk: Beyaz

Erime Noktası: 202 °C- 206 °C (± 0.5)

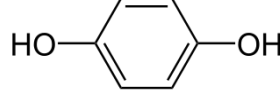
Katı Madde: %100

Suda Çözünürlük: Çözünür, 5.0 g / 100 mL

2.3.2. Hidrokinon

Melanogenez sürecini inhibe eden bir depigmentasyon ajanıdır (Chavin vd., 1980; Makino vd., 2013). Tirozinaz inhibisyonu yaparak 3,4-dihidroksifenilalaninin (DOPA) melanine dönüşümünü engeller. Genellikle %2-5'lik konsantrasyon aralığında kullanılır (Cüre, Kocatürk ve Kızıldağ, 2016). Etkisi *reversible* yani geriye dönüşümlüdür. Etkileri tam olarak 4 ay gibi bir sürede görülür (Ertam, Özkapu ve Ünal, 2013). Yan etkileri tahriş, eritem, batma, iritan veya allerjik kontakt dermatittir (Jimbow vd., 1974). Bu nedenle

kullanımında hasta uyumu zordur. **Şekil 2.2** de kimyasal yapısı açık olarak görülmektedir.



Şekil 2.2. Hidrokinon kimyasal yapısı (<http-5>)

Avrupa Birliği'nde hidrokinonun kozmetik ürünlerde kullanımı yasaklanmıştır (Migas ve Krauze-Baranowska, 2015). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından kozmetik ürünlerde kullanımına %2 konsantrasyona kadar izin verilmektedir (Cüre, Kocatürk ve Kızıлтаç, 2016; Yazan, 2010). Türkiye'de ise kozmetik amaçlı kullanımı yasaklanmıştır (Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihaz Kurumu, 2015).

2.3.3 Azelaik asit

Pitrosporom ovale derivesidir (Tarımcı ve Badıllı, 2017). Tirozinaz inhibisyonu yapmakla birlikte bu etkisi dönüşümlü ve zayıf olarak kabul edilir. (Kim ve Uyama, 2005). Çalışmalar, %20 azelaik asit etkinliğinin %4'lük hidrokinondan daha yüksek olduğunu göstermiştir (Lee vd., 2008).

2.3.4. Meyan kökü (*Licorice*) ekstraktı

Antienflamatuar özellik gösteren bir maddedir (Yokota vd., 1998). İçeriğinde bulunan glabridin sayesinde tirozinaz inhibisyonu yapar (Hanson, Gratton ve Bardeen, 2006). Glabridin renk açıcı etkiden sorumlu olmasına rağmen, meyan ekstresinin antienflamatuar etkisi sebebiyle tirozinaz inhibitörü hidrokinon veya arbutin gibi etkin maddelerin yol açtığı tahriş ve dermatit gibi yan etkileri gidermek amacıyla formülasyonda kullanımı uygundur (Demirezer vd., 2017).

Kligman-Willis formülü olarak adlandırılan ve melasma tedavisinde standart kabul edilen %5 hidrokinon %0.1 tretinoin %0.1 deksametazon formülasyonunda hidrokinon ve tretinoin etkin maddelerinin yaptığı cilt tahrişini gidermek amacıyla formülasyona eklenen deksametazon yerine meyan ekstresi eklenirse, antienflamatuar etkisi ile cilt tahrişi azaltılırken bitkisel içerikle kozmetik formülasyonun reklam gücü ve satış miktarı artırılabilir (Cüre, Kocatürk ve Kızıлтаç, 2016; Küçük, 2018).



Görsel 2.3. *Meyan bitkisi* (Başer, 2016).

2.3.5. Mekuino

Hidrokinon türevidir ve yarışmalı tirozinaz inhibisyonu yapar (Draelos, 2007; Fleischer vd., 2000). Solar lentigo (güneş lekesi) tedavisinde %2 mekuinol ve %0.01 tretinoin karışımının hazırlandığı bir formülasyonla tedavi iyi tolere edilmiştir (Cüre, Kocatürk ve Kızıltaç, 2016). Başka bir çalışmada, koldaki solar lentigolara karşı %3 hidrokinondan daha üstün, yüz lezyonları için ise eşdeğer etkinlikte olduğu görülmüştür (MacKie, 2006).

2.4. Melanozoma Transferini Azaltan Ajanlar

Niasinamid, retinoidler ve soya melanozoma transferini azaltan ajanlar başlığı altında değerlendirilebilecek maddelerdir (Cüre, Kocatürk ve Kızıltaç, 2016).

2.4.1. Niasinamid

Cilt rengini açıcı kremlerin formülasyonunda çok yaygın olarak kullanılır. Geri dönüşümlü olarak melanozomun melanositlerden keratinositlere transferini önler (Greatens vd., 2005).

2.4.2. Retinoidler

Retinoidler, keratinosit döngüsünü uyarak, melanozoma transferi azaltarak ve diğer aktif içeriklerin penetrasyonunu artırarak etki gösterir (Morita, 2007). Retinoik asit (tretinoin), retinal (retinaldehit), retinol (vitamin A1), adapalen, beksaroten ve tazaroten retinoid türlerine örnek olarak verilebilir (Cüre, Kocatürk ve Kızıltaç, 2016). Retinoidlerin renk açıcı özelliklerinin yanında deskuamasyonu hızlandırarak cilt yenileyici özellik göstermeleri, kan dolaşımını artırarak dokulardaki oksijen miktarını

artırmaları ile cilt rengini açmaktan akne izlerini geçirmeye ve yaşlanma belirtilerini azaltmaya kadar çeşitli endikasyonlarda kullanımları vardır (Yazan, 2010). Cilt rengini açmak için monoterapik (tek bir ilaç ile tedavi) olarak veya steroid ve tirozinaz inhibitörü olan hidrokinon gibi etkin maddelerle de birlikte kullanılabilirler. (Vashi ve Kundu, 2013). Daha önce de bahsedilmiş olan Kligman-Willis formülü (%5 hidrokinon %0.1 tretinoin %0.1 deksametazon) içerisindeki retinoid tretinoinle birlikte çok etkili bir preparattır (Sheth ve Pandya, 2011). Melazmada etkili olan bir başka formül ise bu formülün benzeri ve modifiye edilmiş şekli olan %4 hidrokinon, %0.05 tretinoin ve %0.01 fluosinolon asetonidden oluşan kombinasyondur (Mutlu ve Özer, 2006).

2.4.3. Soya

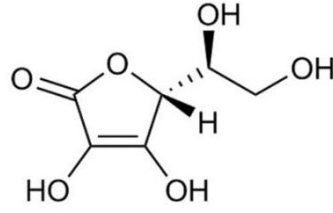
Soya, geri dönüşümlü olarak proteaz aktive reseptör-2 yolunu inhibe eder (Rendon vd., 2006). Östrojen benzeri etkisiyle de diğer etkin maddelerin yaptığı cilt tahrişini önleme amaçlı kullanılabilir (Rodrigues ve Pandya, 2015). Fakat son yıllarda genetiğinin değiştirilmesi sebebiyle kullanımı azalmıştır (Yılmaz, 2014).

2.5. Bakır ile Etkileşime Giren Ajanlar

Bakır iyonu ile etkileşime girerek yani şelat oluşturarak melanositlerde melanin oluşumunu engellerler (Cüre, Kocatürk ve Kızıldağ, 2016). Tirozinaz, L-tirosin'in L-DOPA'ya ve son olarak melanin'e dönüşümünü katalize eden tip-3 bakır içerikli bir enzimdir, bakır iyonu ile etkileşime giren etkin maddeler ise melanin sentezi noktasında gerekli olan tirozinaz enziminin etkin bölgesinde bakır iyonu ile etkileşerek ve dopakinonun oksidasyonunu azaltarak melanin sentezini azaltırlar (Tarımcı ve Badıllı, 2017). Pek çok organizma (insan, bitkiler ve mikroorganizmalar gibi) melanin sentezler (Valipour ve Arıkan, 2018).

2.5.1. Askorbik asit

Vitamin C olarak da bilinen askorbik asit bakır iyonlarını bağlayarak etki gösterir. Tedavi etkinliği hidrokinona kıyasla daha azdır; ancak, daha az iritasyon yaptığı saptanmıştır (Cüre, Kocatürk ve Kızıldağ, 2016). Daha çok hidrokinonu tolere edemeyen hastalarda tercih edilebilir (Espinal-Perez, Moncada ve Castaneda-Cazares, 2004). Stabil olmayan bir moleküldür ve monoterapi olarak etkisi azdır; meyan kökü ekstraktı ve soya ile kombine edilmesi tedavi başarısını artırabilir (Ichihashi vd., 2003).



Şekil 2.3. Askorbik asit kimyasal yapısı (Yavaşca, 2009)

Antioksidan etkisine rağmen zaman içinde kendisi de oksidasyona uğrayarak bozulur ve sarı bir renk alarak taşıyıcı sistemi boyar. Ayrıca klasik emülsiyon hazırlarken su fazında çözündüğü için 74°C’de formülasyona katılırsa yapısı bozulmakta ve etkinliği azalmaktadır (http-6). Bu nedenle 40°C’de formülasyona eklenmesi daha uygundur. Bu problemlerden dolayı yağ fazında çözünen ve daha dayanıklı olan askorbil palmitat formunun kullanılması stabilite sorununu çözmektedir (Smaoui, 2014).

2.5.2. Kojik asit

Aspergillus oryzae ve *Penicillium spp*’den üretilir (Kim ve Uyama, 2005). Kontakt dermatit ve eritem yapabilir (Draeos, 2007). Kojik asiti ilk bulan Japon bilim insanı, *Aspergillus* türlerini pirincin üzerine koyarak elde etmiştir ve bu nedenle bilimsel dalı eczacılık ve kozmetoloji olmayan kişiler tarafından pirincin cilt rengini açmasıyla ilgili yanlış düşünceler oluşmuştur (Burger vd., 2016).

2.6. Kimyasal Soyucu Ajanlar

Kimyasal soyucu ajanlar uygulanan bölgede irritasyona neden olup, dispigmentasyonun seviyesini artırabilir (Cüre, Kocatürk ve Kızıлтаç, 2016). Soyucu ajanların topikal tedavi ile kombinasyonunda tedavi başarı oranı daha yüksektir (Rodrigues ve Pandya, 2015).

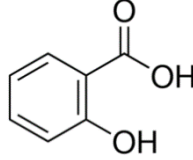
2.6.1. Glikolik asit

Yaygın olarak kullanılan kimyasal soyucu bir ajandır (Yazan, 2010). Formülasyonlarda %20-70 kullanım konsantrasyonu vardır (Yazan, 1998). Tek başına kullanımının topikal tedavilere üstünlüğü yoktur ve irritasyona yol açabilir (Cüre, Kocatürk ve Kızıлтаç, 2016). Topikal tedavilerle kombinasyonu daha etkilidir (Ichihashi vd., 2003).

2.6.2. Salisilik asit

Salisilik asit (Şekil 2.4), keratolitik etkisi nedeniyle sıkça tercih edilen bir moleküldür (Cüre, Kocatürk ve Kızıлтаç, 2016). Cilt üzerine soyucu etki gösterirken,

inflamasyon kaskadını neredeyse hiç uyarmayışı sayesinde post inflamasyon hastalığı (PIH) geliştirme yatkınlığı olan hastalarda güvenle kullanılabilen bir ajandır (Grimes, 1999). Fiyatının ucuz olması sebebiyle de düşük oranlarda formülasyona eklenebilir (Nantz vd., 2009).



Şekil 2.4. Salisilik asitin kimyasal yapısı (Özeker, 2005)

2.6.3. Laktik asit

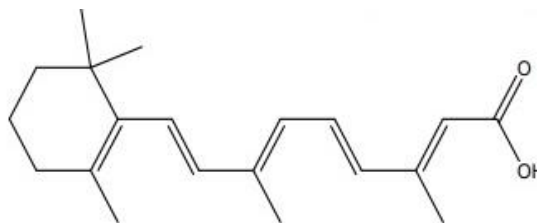
Yapılan çalışmalarda, glikolik asit ve *Jessner peeling* ile cilt soyma açısından benzer sonuçlar gözlenmiştir (Sharquie, Al-Tikreety ve Al-Mashhadani, 2005).

2.6.4. Triklorasetik asit

Solüsyondaki konsantrasyon oranlarının değiştirilmesi ile yüzeysel veya derin soyma işlemi yapabilme özelliği, triklorasetik asit için kullanım avantajı sağlamaktadır (Cüre, Kocatürk ve Kızıldağ, 2016). Triklorasetik asit %10-20 konsantrasyonlarda yüzeysel soyma, %35 konsantrasyonda ciltte bekletme süresine bağlı olarak orta-derin soyma etkisi göstermektedir (Landau, 2008).

2.6.5. Tretinoin

Randomize yapılan çift kör bir çalışmada %1 tretinoin ile %70 glikolik asit peeling karşılaştırılmış ve eş etkinlik saptanmıştır (Faghihi, Shahingohar ve Siadat, 2011). Aynı çalışmada %1 tretinoin kullanılan hastalarda işlem sonrası kızarma kaşınma tahriş gibi şikayetlerin daha az olduğu bildirilmiştir (Ramos-E-Silva ve Carneiro, 2001).



Şekil 2.5. Tretinoinin kimyasal yapısı (Sheliya, Shah ve Kapupara, 2014)

2.7. İlaç Uygulama Yolları

İlaçların canlı organizmaya veriliş yolları dört grup altında toplanır:

- *enteral yol*: oral (o, po, Os), sublingual (bukko-lingual, dil altı), rektal (rektum içi)
- *parenteral yol*: subkutan (sc, deri altı), intradermal (id, deri içi), intramüsküler (im, kas içi), intravenöz (iv, damar içi), intraarteryel (ia, arter içi), intraperitoneal (ip, periton içi), intratrakeal (it, soluk borusu içi), intrakardiyak (ik, kalp içi), intraartiküler (eklem içi)
- *respiratuvar yol*
- *topikal*: dermal (per kutan), mukozal, oküler (konjoktival), nazal, rinofaringeal, genito üriner, intramammar (meme içi) (Ruiz ve Montoto, 2018; http-7).

2.8. Topikal Uygulama ve Taşıyıcı Sistemler

Kozmetik taşıyıcı sistemler topikal kullanımda dört gruba ayrılırlar.

- Emülsiyon sistemler
- Veziküler sistemler
- Partiküler sistemler
- Moleküler sistemler (Yazan, 2010).

2.9. Emülsiyon Sistemler

Emülsiyonlar birbiriyle karışmayan iki sıvının birbiri içinde dağılmasından oluşmuş, çok düze görünüşlü heterojen sistemlerdir (Aralp, 1995; Isacoff, 1979). Dağılmış damlacıkları (globül) içeren faz iç fazı (dispers faz), diğeri ise dış fazı (sürekli faz, dispersiyon ortamı) oluşturur (Martin, Busmante ve Chun, 1993). Fazlardan biri polar diğeri nonpolar özelliktedir (Utku Türk, 2013). Emülsiyonun dış görünüşünü dispers fazın damlacık büyüklüğü belirler. Damlacıklar genellikle 0.1-10 µm büyüklüğündedir (Yazan, 2010).

Çizelge 2.1. Damlacık büyüklüğü ve emülsiyon görünüşü arasındaki ilişki (Özkan, 2011)

Emülsiyon Görünüşü	Damlacık Büyüklüğü
süt gibi beyaz	> 1 µm
mavimsi yeşil	1-0.1 µm
yarı saydam	0.1-0.05 µm
saydam	< 0.05 µm

Emülsiyonların oluşması için en az üç bileşene ihtiyaç vardır: yağlı faz, sulu faz ve emülsiyon yapıcı (Davis, 1977). Ayrıca fizikokimyasal ve mikrobiyolojik kararlılık

arttırıcı, koku verici ve tatlandırıcı yardımcı maddeler eklenebilir. Bu iki karışmayan sıvı mekanik olarak çalkalandığı zaman her iki fazda damlacıklar oluşur, çalkalama durunca damlacıklar bir araya gelir ve iki sıvı ayrışır (Çelebi, 2009). İşte bu ayrışmayı önlemek ve sıvıların birbiri içinde homojen dağılmasını sağlamak üzere emülsiyon yapıcı madde eklenir (Geçgil ve Geçgil, 1972). Genellikle birden fazla emülsiyon yapıcı kullanımı pratik olarak önerilen bir uygulamadır (Acartürk vd., 2007). Sulu fazda hidrofilik, yağlı fazda hidrofobik emülsiyon yapıcı kullanılarak ara yüzeyde kompleks film tabakası oluşturulabilir (Griffin, 1957). Emülgatörler ara yüzey gerilimini düşürerek dispersiyon ara yüzeyindeki serbest yüzey enerjisine etki eder. Böylece emülsiyonun dayanıklılığını sağlarlar (Çelebi, 2009).

Klasik emülsiyonlarda kararsızlık önemli bir problemdir. Bunun temel nedeni geniş yüzeyler arası alan ve bu alanla orantılı iç yüzey enerjisine sahip olmasıdır. Bu iki birbiri ile karışmayan sıvı birlikte karıştırıldığı zaman sıvılar birbiri içinde artan toplam yüzey alanı ile ufak damlacıklar halinde dağılır. Sıvıların karışmaması, ayrılan her sıvı molekülün arasındaki kohesif kuvvetin iki sıvı arasındaki adezif kuvvetten büyük olması sebebiyledir. Klasik emülsiyonların tipleri fazlarına göre Y/S, S/Y ve çok fazlı emülsiyon olarak sınıflandırılır (Güven, 1987). Y/S emülsiyonu yağ damlacıklarını su içinde, S/Y emülsiyonu ise su damlacıklarını yağ içerisinde taşıyan emülsiyon olarak adlandırılır (Swarbrick, Rubino ve Rubi, 2000). Çok fazlı emülsiyonlarda yağlı faz içindeki su damlacıklı emülsiyon tipi tekrar sulu faz içinde dağıtılmış (S/Y/S) veya sulu fazdaki yağ damlacıklı emülsiyon tekrar yağlı faz içinde dağıtılmıştır (Y/S/Y) (Çelebi, 2009).

Topik kullanım açısından etkin maddenin salımı emülsiyon tipi ile yakından ilişkiliyken, oral preparatlarda ise emülsiyon tipi hem etkin madde salımını hem de tadı belirlemektedir (Özkan, 2011). Y/S tipi emülsiyon su ile kolay uzaklaştırılabildiğinden ve daha az yağlı olduğu için topik kullanımda tüketici memnuniyeti daha yüksektir ve daha çok tercih edilir (Yazan, 2010). Ayrıca, deriye uygulandığı anda *Stratum corneum*'dan geçiş ve perkütan emilimin yüksek olmasının sebebi dış fazın büyük kısmı buharlaştığı için yapışkan hale gelen filmde suda çözünen etkin madde derişimi artmasıdır. Kıl bezleri ve yağ foliküllerinden penetrasyon doğrudan subkütan yağlı doku ile ilişkili olduğu için, su/yağ tipi emülsiyonlar da yağda çözünen etkin maddeler için sıklıkla tercih edilir (Swarbrick, Rubino ve Rubi, 2000). Emülsiyonlarda dispers fazın damlacıkları genellikle toplam hacmin %74'ünü kaplarken, geri kalan %26'lık kısmı ise dispersiyon ortamı doldurmaktadır. Bu sayede iki faz ayrılmamakta ve emülsiyonda

bozunma yaşanmamaktadır. İç faz hacim oranı %40-60 olanlar pratikte en kararlı emülsiyonlar olarak kabul edilir (İzgül, 1984).

2.9.1. Emülsiyon sistemlerin karakterizasyonu

Klasik emülsiyonların karakterizasyonu görünüş, damlacık büyüklüğü, pH ve viskozite başlıkları altında değerlendirilebilir.

2.9.1.1. Görünüş

Emülsiyonlarda görünüşünü etkileyen unsurlar viskozite, akış özelliği, parlaklık, pürüzsüz olma, opaklık ve yapı olarak söylenebilir (Uskan, 1985).

2.9.1.2. Damlacık büyüklüğü

Emülsiyonlar damlacık büyüklüğü küçükse ‘ince emülsiyon’, büyük ya da iri damlacıklardan oluşuyorsa ‘kaba emülsiyon’ olarak isimlendirilir. Damlacık büyüklüğü, emülsiyon yapıcının kalitesi, tipi, hazırlanma işlemleri ve eklenen yardımcı maddelere bağlı olarak değişmektedir (Gönül, 2000). Emülsiyonun viskozitesi ve görünüşü, dispers fazın oranı ve damlacık büyüklüğü ile belirlenir (Özkan, 2011). Dispers fazın damlacık büyüklüğü 0.1 µm’den ufak ise miseller emülsiyon veya mikroemülsiyon meydana gelmektedir. (Rieger, 1986).

2.9.1.3. pH

Deri pH’sı 4-6 arasındadır ve topik uygulama için formülasyonun deri pH’sına göre ayarlanması gerekir (Avşar ve Karadağ, 2018). Sabun tipi yani yağ asitleri ile bazların reaksiyona girdiği emülsiyonlarda pH değeri genellikle 8 veya biraz üzerindedir. Çünkü pH düşerse faz ayrışması olur. Etkin maddenin pH değeri de emülsiyon pH’sı üzerinde etkilidir. Noniyonik emülsiyon yapıcı içeren emülsiyonun pH’sı 3-10 arasında, katyonik emülsiyon yapıcı içeren emülsiyonun pH’sı ise 3-7 arasındadır (Gönül, 2000).

2.9.1.4. Viskozite

Viskozite değişimi önemlidir çünkü hem tüketici tarafından izlenebilir hem de etkinliği değiştirir. Ayrıca emülsiyonun viskozitesi ile dış fazın viskozitesi arasında doğrusal bir ilişki vardır (Özkan, 2011). Raf ömrü sırasında görülen damlacık büyüklüğü değişimi ile reolojik özelliklerde de değişim gözlenir ve bu durum kararlılığın izlenebilmesi açısından önemlidir. Emülsiyonda damlacıklar foliküle olursa viskozitede artış olur (Gönül, 2000).

2.9.2. Emülsiyonun oluşumu

Klasik emülsiyon teorisinde emülsiyonun oluşması için yüzey etkin madde ara yüzeyde adsorbe olarak damla koalesansını engellemek ve ara yüzey gerilimini düşürmek olarak tanımlanan görevleri yapmaktadır (Geçgil ve Geçgil, 1972). Ek olarak yapılan homojenizasyon işlemi sayesinde damlacık boyutu düşer ve ara yüzey alanı artar. Böylece küçülen boyuttaki damlacıklar emülsiyon yapıcı madde ile sarılarak komşu damlacıklar birleştirilir (Çelebi, 2009).

Emülsiyonlarda kararsızlık sebebi geniş yüzeyler arası alana ve bu alanla orantılı iç yüzey enerjisine sahip olmaları olarak söylenebilir (İzgü, 1984). Birbiri ile karışmayan iki sıvı karıştırıldığı zaman sıvılar birbiri içinde artan yüzey alanı ile ufak damlacıklar halinde dağılır. Sıvıların karışmama derecesi arttıkça ara yüzey gerilimi de artmaktadır (Çelebi, 2009).

2.9.3. Emülsiyon yapıcı madde

İki sıvının birbiri içerisinde karışmasını sağlamak ve emülsiyonun kararlılığını arttırmak için serbest yüzey enerjisini değiştirip düşürmek önemlidir (Geçgil ve Geçgil, 1972). İki damla birleşip tek damla olunca ara yüzey alanı düşer ve damlacıkların birleşmesiyle toplam yüzey enerjisi azalır (Özkan, 2011). Yani emülsiyon yapıcı madde (yüzey etkin madde, emülgatör, sürfektan) sistemin toplam yüzey enerjisini azaltır (Geçgil ve Geçgil, 1972). Emülsiyon yapıcı maddenin emülsiyon oluşmasındaki rolleri aşağıdaki gibidir.

- *Ara yüzey gerilimini düşürüp termodinamik kararlılık sağlamak*
Ara yüzey gerilimi düşürülürse böylece emülsiyon ara yüzeyindeki serbest yüzey enerjisi de düşer (Rieger, 1986).
- *Ara yüzey filmi oluşturmak ve koalesansa karşı mekanik engel oluşturmak*
Emülsiyon yapıcı madde su/yağ ara yüzeyinde monomoleküler film oluşturarak adsorbe olur ve bu film emülsiyonu adezyon ve koalesansa karşı korur. Bu noktada tek emülsiyon yapıcı madde yerine birden fazla emülsiyon yapıcının bir arada kullanılması tercih edilen bir yöntemdir (Acartürk vd., 2007). Sulu faz için hidrofilik, yağlı faz içinse hidrofobik emülsiyon yapıcı madde seçimi ile ara yüzeyde kompleks film oluşturulabilir. Hidrofilik Tween® ve lipofilik Span® türevlerinin farklı oranda karışımı ile Y/S veya S/Y tipinde çeşitli emülsiyonlar oluşturulabilir (Rieger, 1986).

- *Elektriksel çifte tabaka ve elektriksel engel oluşturmak*

Yaklaşan damlacıklar arasında elektriksel itme kuvveti oluşmaktadır. Bu itme kuvvetini elektriksel yük gruplarının artması ve elektriksel çifte tabaka sağlamaktadır (Özkan, 2011). Negatif yüklü (anyonik) yüzey etkin maddelere sodyum oktil sülfat (SOS) ve pozitif yüklü (katyonik) yüzey etkin maddelere setil metil amonyum bromür (CTAB) örnek olarak gösterilebilir (Özkan, 2011).

2.9.4. Klasik emülsiyon hazırlama yöntemleri

Klasik emülsiyon hazırlanmasında tercih edilen yöntemler (Gönül, 2000);

- Kuru zamb yöntemi
- Yaş zamb yöntemi
- Şişe yöntemi
- Endüstriyel üretim yöntemi

Kuru zamb yönteminde, zamb yağlı faz ile ısıtılıp üzerine sulu faz eklenerek sürekli karıştırılıp primer emülsiyon oluşturulur, sonra üzerine kalan sekonder su eklenir. Primer emülsiyon için deneysel olarak bulunan yağ-su-zamb oranları 4:2:1 veya 2:1:1.5'dur. Yaş zamb yönteminde zamb su ile şişirilerek üzerine yağlı faz eklenip primer emülsiyon oluşturulur ve sonrasında kalan sekonder su eklenir. Eğer formülasyondaki yağlı faz uçucu yağ ise şişe yöntemi kullanılır. Bu yöntem ile çok ufak damlacıklı dispersiyon oluşturur. Endüstriyel üretim yönteminde temel prensip iç fazın dış faz içinde çeşitli aletler kullanılarak dağıtılmasıdır. İç faz su banyosunda 70°C'de ısıtılırken aynı şekilde dış faz da aynı sıcaklığa ısıtılır. Sonrasında sıcak olan iç faz dış faza sürekli karıştırılarak eklenir. Oluşan karışım soğuyuncaya kadar karıştırma işlemi sürdürülür (Gönül, 2000).

Klasik emülsiyon hazırlamada kullanılan endüstriyel tipte aletler basit tip karıştırıcı, homojenizatör, titreşim cihazı ve kolloid değirmenlerdir. Basit tip karıştırıcılar palet şeklindedir ve küçük miktar emülsiyon hazırlamada kullanılır. Ortama hava girişi bu yöntemin sakıncası, ısı oluşturmaması ise üstünlüğüdür. Kolloid değirmenlerde damlacık büyüklüğü ufaltılır ancak ısı oluşturmaması sakıncalıdır. Titreşim cihazında ise viskozluğu düşük olan ve diğer yöntemlerle bozulan maddelerin emülsiyonu hazırlanmaktadır (Gönül, 2000).

Emülsiyon hazırlanırken iç ve dış fazın bir araya getirilmesinde çeşitli yöntemler kullanılır. Fazları birbirinin içerisinde karıştırmadan önce hidrofobik ve yağda çözünen maddeler yağda, hidrofilik ve suda çözünen maddeler suda çözünür (Çelebi, 2009). Genel

olarak iç faz dış faza ilave edilir. S/Y tipi emülsiyonları suyun yağ fazına, Y/S emülsiyonları ise yağın su fazına ilavesi ile hazırlanabilir. Mum ve diğer katı maddeleri içeren emülsiyonların hazırlanmasında ise bu maddelerin su banyosunda eritilmesinden sonra yağda çözünebilen emülsiyon yapıcı maddeler karıştırılır. Suda çözünebilen diğer maddeler suda çözünür ve hafif bir sıcaklıkta yağ fazına ilave edilir. Daha sonra iki faz soğuyuncaya kadar karıştırılır. Bu yöntem daha çok emülsiyon bazlı merhem ve kremlerin hazırlanmasında kullanılır (Swarbrick, Rubino ve Rubi, 2000). Farklı bir yöntemde ise, Y/S tipi emülsiyon hazırlamak için, bir kısım yağ suda çözünebilen emülsiyon yapıcı madde ile karıştırılır, sonrasında ise suda çözünebilen emülsiyon yapıcı maddeyi içeren eşit miktardaki su ile birleştirilerek emülsiyon oluşuncaya kadar karıştırma işlemine devam edilir (Swarbrick, Rubino ve Rubi, 2000). Emülsiyon oluşumu (emülsifikasyon) işlemine etki eden önemli faktörlerden biri de sıcaklıktır, emülsifikasyonda sıcaklık değişimi yüzeyler arası gerilimi ve viskoziteyi değiştirir (Çelebi, 2009). Yüksek sıcaklık emülsiyon oluşumunu kolaylaştırırken aşırı yüksek sıcaklık veya düşük sıcaklık emülsiyonda damlacıkların koagülasyonuna neden olmaktadır (Çelebi, 2009). Ayrıca iç ve dış olarak adlandırılan fazlar genellikle 70-72°C'de karıştırılır. Emülsifikasyonda karıştırma süresince sıcaklık ve soğutma hızları emülgatörün ara yüzeye göç etmesine neden olduğu için çok önemlidir. Fazların birbirine ilavesinden sonra soğutma işlemi yavaş yapılmalıdır çünkü etkin maddenin dış fazda kristalleşmesinin önlenmesi böyle gerçekleşir (Eccleston, 2002).

S/Y/S tipi emülsiyonlar klasik iki aşamalı olarak hazırlanır. Birinci aşamada S/Y tipi emülsiyon oluşturulur. Sulu faz lipofilik yüzey etkin madde içeren yağlı faz üzerine eklenir ve karıştırılarak S/Y tipi emülsiyon hazırlanır. İkinci aşamada hazırlanan emülsiyon hidrofilik yüzey etkin madde içeren sulu faza eklenir ve çoklu emülsiyon oluşuncaya kadar karıştırmaya devam edilir. Y/S/Y tipi emülsiyonda ise yukarıdaki işlemlerin tersi yapılır (Gönül, 2000).

2.9.5. Emülsiyon kararlılığı

Klasik emülsiyonlar termodinamik olarak kararsız sistemler olarak tanımlanmaktadır (Büyükköroğlu, 1998). Kararlılık açısından önemli noktalardan biri dispers fazın damlacık büyüklüğünün korunabilmesi ve toplam ara yüzey enerjisinin değişmemesidir (Gönül, 2000). Bunun yanında renk, koku ve görünüş gibi özelliklerinin değişmemesi, iç fazda koalesans ve krema oluşmaması da önem taşır (Büyükköroğlu, 1998). Klasik emülsiyonlarda gözlemlenebilecek kararlılık sorunları aşağıdaki gibidir;

- Faz dönüşümü,
- Kimyasal ve fiziksel değişimler,
- Flokülasyon ve kremalaşma,
- Koalesans ve faz ayrışması (*breaking*) (Eccleston, 2002; Martin vd., 1993; Rieger, 1986).

2.9.5.1. Faz dönüşümü

Faz dönüşümünün emülsiyon hazırlandıktan sonra gerçekleşmesi önemli bir sorundur. Dönüşüm uygunsuz yardımcı madde eklenmesiyle veya faz/hacim oranının değişmesiyle gerçekleşebilir (Swarbrick, Rubino ve Rubi, 2000). Örneğin, sodyum stearat içeren Y/S emülsiyonuna kalsiyum klorür eklenmesi ile kalsiyum stearat içeren S/Y tipi emülsiyon oluşumu gözlemlenebilir. Bir emülsiyonun faz dönüşümü (inversiyon) yaşaması için Y/S tipinden S/Y tipine veya tersine dönmesi gerekir (Çelebi, 2009). Faz dönüşümü emülsiyonu oluşturan iki fazın karıştırılması, ısıtma ve soğutma basamaklarında görülebilir (Swarbrick, Rubino ve Rubi, 2000). Faz hacim oranının değişmesi veya elektrolit eklenmesi faz dönüşümüne neden olabilir. Emülsiyon pH'sının değişmesi veya S/Y oranının değişmesi de dönüşüme yol açabilir (Öner, 1993).

2.9.5.2. Kimyasal ve fiziksel değişimler

Emülsiyonda zamanla oksidasyona bağlı renk değişimi, şelasyon oluşumuna bağlı kimyasal ve fiziksel değişimler görülebilir. Emülsiyonlarda stabilite, emülsiyonun kendi fiziksel kararlılığı ve onu meydana getiren maddelerin fiziksel ve kimyasal kararlılıkları ile değerlendirilir (Büyükköroğlu, 1998).

2.9.5.3. Flokülasyon ve kremalaşma

Kremalaşma olarak da adlandırılan bu durum dispers fazın yoğunluğu dispersiyon ortamınınkinden daha düşük ise (genellikle Y/S tipi emülsiyonlar) damlacıkların üstte toplanması ve sedimentasyon hızının negatif olması olarak tanımlanır (Özkan, 2011). Aşağıya doğru kremalaşma ise iç fazın dış fazdan daha yoğun olmasıyla damlacıkların çökmesi (genellikle S/Y tipi emülsiyonlar) olarak adlandırılır (Gönül, 2000). İki fazın yoğunluk farkı ne kadar yüksek ise, yağ damlacıkları ne kadar büyük ise ve dış faz ne kadar az viskoz ise kremalaşma o denli fazladır (Özkan, 2011).

Dış fazın viskozitesinin artırılması, viskozite arttırıcı veya kalınlaştırıcı maddeler (*thickening agent*) ile (metil selüloz, kitre zamkı, sodyum aljinat, v.b.) sağlanabilir (Çelebi, 2009). Damlacık büyüklüğünün düşürülmesi ise homojenizasyonla sağlanabilir

(Özkan, 2011). İç ve dış fazın yoğunlukları eşitse kremalaşma olmaz (Acartürk vd., 2007). Kremalaşma geri dönüşümü olan (*reversible*) bir olaydır (Gönül, 2000).

Flokülasyon iç faz damlacıklarının üç boyutlu kümeler halinde tersinir olarak birleşmesi yani bir araya gelmesidir (Özkan, 2011). Damlacık agregasyonu ve hızlı koalesans oluşumu ara yüzeyde mekanik koruyucu yoksa gerçekleşir. Agregasyonun geri dönüşümlü olması damlacıklar arası etkileşim kuvvetiyle doğrudan ilişkilidir (Çelebi, 2009). Kremalaşmaya paralel olarak gelişen flokülasyon, yüksek iç faz oranı ve yüksek emülsiyon yapıcı miktarı ile gerçekleşir (Çelebi, 2009).

2.9.5.4. Koalesans ve faz ayrışması

Faz ayrışması geri dönüşümsüz (*irreversible*) bir olaydır (Özkan, 2011) ve damlacıkları çevreleyen film hasarlanmıştır, karıştırma veya çalkalama ile damlacıklar dağıtılamaz, yağ birleşme eğilimi gösterir (Gönül, 2000). Faz ayrışmasının önlenmesi için;

- Damlacıklar optimum büyüklükte ve tekdüze olmalı,
- Dispersiyon ortamı optimum viskozitede olmalı,
- Sulu ve yağlı fazın faz-hacim oranı uygun olmalıdır (Özkan, 2011).

Emülsiyonlarda kritik nokta yağ oranı %74 ün üstüne çıktığı anda yağ damlacıklarının birleşmesi ve emülsiyonun fazlarına ayrışması olarak tanımlanır (Gönül, 2000). Ufak damlacıkların genişlemesi ile iri damlacıkların oluşması Oswalt Olgunlaşması olarak adlandırılır. Damlacıkların kütle transferinin sürekli fazdan diğer faza olması ile emülsiyon zamanla fazlarına ayrışır. Koalesansı engelleme yolu olarak katı parçacık veya makromolekül içeren kalın ara yüzey filmi oluşturmak olarak gösterilebilir (Acartürk vd., 2007).

2.9.5.5. Kararlılık testleri

Stabilite programını hızlandırmak için emülsiyonları zorlanmış koşullara (*stress*) tutmak gerekir. Karıştırma, santrifüj, ultrasantrifüj, sıcaklık ve zamanla bozulma fiziksel stabilite testleri için zorlanmış koşullar olarak kabul edilir (Rieger, 1986).

Zamanla bozunma ve sıcaklık: Yüksek sıcaklıklarda farklı sürelerde bekletilerek uygulanır (Seiller, Tokgöz ve Grossiord, 1993). Sıcaklık farklılığı emülsiyonun fiziksel ve kimyasal stabilitesinde etkilidir. Yüksek sıcaklıkta emülsiyonların viskozitesinde azalma gözlenir (Özkan, 2011). Bazı lipidlerin kristalizasyonu, faz dönüşümü, emülgatör dağılımı ve formülasyonda yer alan polimer ve kolloidal maddelerin hidratasyonuna sıcaklık değişimi yol açabilir (Çelebi, 2009). Raf ömrü değerlendirilmesinde 4-45°C

arasındaki sıcaklıklar değerlendirilir (Büyükköroğlu, 1998). Viskozite de değişimler, koalesans ve kremalaşma hızının artmasına yüksek sıcaklık neden olur. Emülsiyonlar 40-45°C'a dayanıklı olabilirlerken 55-60°C'ın üzerinde birkaç saat kalmaları bile bozunmalarını sağlar. Yüksek sıcaklık aynı zamanda koalesans ve kremalaşma hızını arttıran bir faktördür (Çelebi, 2009). Dondurma işlemi zorlanmış bir koşuldur ve emülsiyonun dayanıklılığına yüksek sıcaklıktan daha çok etki eder (Özkan, 2011). Emülsiyon damlacıklarının küresel şeklinin buz kristalleri oluşarak bozulmasına ve emülgatörlerin çözünürlüğünün değişmesine donma etkilidir (Çelebi, 2009).

Santrifüj ve ultrasantrifüj: Santrifüj ve ultrasantrifüj ile emülsiyonlarda *stress* yaratıp emülsiyonların stabilitesi değerlendirilir (Aralp, 1995). Santrifüj ile faz ayrışması çok hızlı olur ve emülsiyonun raf ömrünü önceden tahmin etmek için yararlı bir yöntemdir; ancak, viskoz veya yarı katı ürünler için uygun olmayabilir. Ultrasantrifüj sırasında uygulanan kuvvet emülsiyonlardaki damlacıkların yapısının bozulmasına neden olur, ayrıca santrifüjlemede uygulanan hızın da emülsiyon stabilitesi üzerine etkisi bulunmaktadır (Seiller, Tokgöz ve Grossiord, 1993). Ultrasantrifüj sonunda bir emülsiyonda alt tabaka (su tabakası), orta tabaka (koagule olmamış emülsiyon) ve üst tabaka (koagule yağ) meydana çıkar (Çelebi, 2009).

Karıştırma: Emülsiyonlarda koalesans görülmemesinin şartlarından birisi emülsiyon damlacıkları arasında Brown hareketleri nedeni ile çarpışma görülmemesidir (Özkan, 2011). İki damlacığın birbiriyle çarpışması için mekanik ve basit bir karıştırma gereklidir. Emülsiyonun parçalanması veya oluşması için çok hızlı ve aşırı çalkalama gerekir (Rieger, 1986).

Emülsiyonlarda damlacık büyüklüğü değişimi, elektroforetik özellikler, reolojik özellikler ve faz ayrışması incelenmesi, zorlanmış koşullar altında stabilizeyi değerlendirmek için gereklidir (Büyükköroğlu, 1998). Faz ayrışması çalışması, saklamadan sonra faz ayrışması ve görsel veya ayrılan fazın hacminin ölçülmesi ile değerlendirilebilir. Faz ayrışmasından önce genellikle kremalaşma, koalesans ve flokülasyon görülmektedir. Emülgatörün miktarı faz ayrışmasında çok önemlidir, düşük emülgatör derişiminde örneğin %0.1'in altında yağ fazının görünür koalesansı sadece 1 aylık bekleme sonunda görülürken, emülgatör derişimi %2 veya %5 olduğunda 2 yıllık bekleme sonunda bile görünür koalesans çok düşük değerdedir (Çelebi, 2009).

Emülsiyonların stabilitelerini değerlendirmek açısından viskozite ve reolojik özellikler de ayrıca incelenmelidir (Özkan, 2011). Reolojik özellikler ve viskozitedeki

değişimler raf ömrü çalışmalarında bekleme sonucu değerlendirilir. Viskozite değişimine sebep olan bazı etmenlerse faz ayrışması veya flokülasyon derecesi, damlacık çapındaki değişimler olarak adlandırılır. Emülsiyonların akış tipi NonNewtonian olarak genellikle adlandırılır (Büyükköroğlu, 1998). Globüllerin hızlıca foliküle olması S/Y tipi emülsiyonlarda görülmektedir. Sonuç olarak viskozite hızlıca azalmaktadır, sonrasında ise oda sıcaklığında 5-15 gün bağıl olarak sabit kalmaktadır. Y/S tip emülsiyonların farklılığı olarak ise globüllerin flokülasyonu bir anda artan viskozite ile sonuçlanır (Özkan, 2011).

Emülsiyonların stabilitelerinde ayrıca elektriksel özelliklerin yani damlacıkların yüzey yükü ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi önemlidir (Çelebi, 2009). Flokülasyon ve koalesansın önlenmesinde elektrostatik itme kuvvetinin önemli bir rolü vardır. Ayrıca flokülasyonun değerlendirilmesinde zeta potansiyeli gibi ölçümler partiküller arasındaki elektriksel yükler flokülasyon hızını etkiledikleri için önemlidir (Im-Emsap ve Siepmann, 2002). Raf ömrünün önceden hesaplanmasında partiküllerin yüzey yüklerinin saptanması kararlı yapının bozulması koalesansa dayanıyor ise faydalı değildir (Rieger, 1986). Ayrıca emülsiyonların elektriksel iletkenliklerinin ölçülmesi kararlılık değerlendirmesinde hazırlandıktan hemen sonra yapılmışsa faydalıdır. Platin elektrot S/Y ve Y/S emülsiyonların elektriksel iletkenliği tayininde kullanılır. Dispersiyonun derecesi ile elektriksel iletkenlik değişir. Y/S emülsiyonların düşük direnç göstermelerinin sebebi olarak düşük damlacık boyutu gösterilebilir. Damlacıkların agregasyona uğraması için direnç artmalıdır (Çelebi, 2009).

Emülsiyonların raf ömrünün saptanmasında damlacık büyüklüğü tayini her zaman kesin bir ölçü olmamakla birlikte damlacık büyüklüğü, ortalama damlacık büyüklüğü ve damlacıkların büyüklük dağılımının değişmesi emülsiyonlar için kararlılık değerlendirme parametreleri olarak adlandırılabilir (Kaş, 1997; Öner, 1993). Başlangıçta hızlı bir artış ve sonrasında yavaş bir değişim damlacık büyüklüğü açısından dayanıklı iki emülsiyon sisteminde gözlenmektedir (Çelebi, 2009). Partikül büyüklüklerinde değişim gözlenmemekle birlikte düşük emülgatör derişimi içeren emülsiyonlar kabul edilebilir bir koalesans gösterirler. Damlacıkların hacmi, yüzey alanı ve büyüklüğü zamanla değişebilen parametrelerdir (Rieger, 1986).

Kimyasal bileşimlerindeki değişimler ve mikrobiyolojik kontroller fiziksel parametrelere ek olarak emülsiyonların raf ömrü değerlendirmelerinde stabilite programlarına fiziksel parametrelere eklenilmelidir (Seiller, Tokgöz ve Grossiord, 1993).

2.9.6. Emülsiyonların reolojik özellikleri

Seyreltilmiş olanlar dışında emülsiyonlar genel olarak non-Newtonian akış özelliğindedir (Büyükköroğlu, 1998). Dispers faz hacmi konsantrasyonunun %0.05'den düşük olduğu durumda sistem Newton özellik gösterir (Gönül, 2000). Dispers fazın konsantrasyonu arttırılınca, sistem akışa direnç göstererek psödoplastik akış gerçekleşir. Yeteri kadar yüksek konsantrasyonda ise plastik akış ortaya çıkar (İzgü, 1984).

Emülsiyonların reolojik özelliklerine etkili fiziksel faktörler aşağıda belirtilmiştir;

- iç fazın içeriği
- damlacık çapı ve şekli
- damlacık büyüklüğü dağılımı
- dispersiyon ortamının reolojik özellikleri
- sıcaklık

Dağılan fazın içeriği (miktarı), dağılan faz hacminin toplam dispersiyonun hacmine oranı olarak belirtilir. Dağılan fazdaki derişim arttıkça viskozite de doğrusal olarak artar (Knowlton ve Pearce, 1993). Katıların derişimi arttıkça, partiküllerin sürtünmesi de artar ve viskozite ile derişim arasında doğrusal olmayan bir ilişki görülür. Bu da dilatant safhasını (*granulo* viskoz aşamasını) oluşturur (Schott, 2000). Ayrıca, partiküller arasındaki yüksek çekim kuvvetlerinin bulunması, viskoplastik ve jellerin meydana gelmesine neden olur (Lemke vd., 1999).

Emülsiyonlarda gerilim altında viskozite artar veya azalır. Bu reolojik davranışlar inceme (*shear thinning*) ve koyulaşma (*shear thickening*) olarak adlandırılır. Bu sistemlere pseudoplastik ve dilatant akış gösteren sistemler de denir. Uygulanan gerilim ile kayma hızı doğru orantılı değildir. İç faz içeriği arttıkça, shear thinning davranış görülür. İç faz içeriği yüksek olduğu zaman partiküller ve damlacıklar birbirine yaklaşır ve flokülasyon meydana gelir (Çelebi, 2009).

Seyreltik dispersiyonlarda, viskozite damlacık büyüklüğüne bağlı değildir, fakat derişimin hidrodinamik ve Brown hareketlerine bağlı olarak damlacık büyüklüğünde önemli bir etkisi vardır (Deem, 1998). Damlacık büyüklüğü dağılımı ve dağılımın şekli, viskozite ve viskoelastik davranışa önemli derecede etki eder. Viskozite, polidispersite arttıkça azalır. Büyük damlacıkların küçük damlacıklara oranı arttıkça viskozite de azalmaktadır (Knowlton ve Pearce, 1993). Dispersiyon ortamının viskozitesi süspansiyon ve emülsiyonların viskozitesi ve reolojik özelliklerine doğrudan etkilidir. Sıcaklık da süspansiyon ve emülsiyonların viskozite ve reolojik davranışlarına etkili olan bir başka

parametredir. Özellikle, yüksek sıcaklıkta bekletilen bir emülsiyonun viskozitesinde anlamlı olarak azalma gözlenir (Özkan, 2011). Partiküllerarası etkileşmeler, genelde partiküllerarası kuvvetler (London-van der Waals) olup, dağılan faz içeriğini değiştirir ve buna bağlı olarak da viskozite ve reolojik özellikler de değişir. Partiküller arasındaki yüksek çekim kuvvetlerinin bulunması viskoplastik sistemin ve jellerin meydana gelmesine sebeptir (Lemke vd., 1999).

Emülsiyonlar Newton akıştan viskoelastiğe kadar değişen reolojik özellikler gösterir. Emülsiyonlar, çok seyreltik olanları hariç, düşük kayma geriliminde damlacıkların flokülasyonuna bağlı olarak viskoelastik özellik de gösterirler. Deformasyonun başlangıç aşamalarında katı gibi, daha sonra sıvı gibi davranış gösterirler (Çelebi, 2009).

Emülsiyonların kremalaşma hızı, damlacık derişimi arttıkça azalır. Görünür viskozitenin damlacık derişiminin artması ile arttığı tespit edilmiştir (Özkan, 2011). Pektin içeren emülsiyonların yağ hacim fraksiyonu artınca, viskozitesinde artış olduğu görülmüştür (Lemke vd., 1999).

Emülsiyonların hazırlama yöntemleri reolojik davranışlarını etkileyebilir. Doğrudan emülsifikasyon ile hazırlanan emülsiyonun reolojik davranışının zamanla değiştiği gözlenmiş, faz dönüşümü ile hazırlanan emülsiyonların reolojik davranışının değişmediği tesbit edilmiştir (Watson ve Mackley, 2002). Emülgatör olarak kullanılan zamklar emülsiyonların viskozitesini artırabilirler. Uzun zincirli yapıdaki zamklar koalesansı inhibe eder ve emülsiyonu stabilize ederler (Özkan, 2011). Makromolekül içeren emülsiyonlar pseudoplastik akış gösterirler. Koyulaştırıcı ve viskozlaştırıcı ajan kullanılıncaya tiksotropi gerçekleşebilir. Tiksotropik sistemler viskoelastisitenin derecesini gösterir. Jel-sol transformasyonundan sorumludur (Çelebi, 2009). Klasik emülsiyonlardan farklı olarak mikroemülsiyonlar düşük viskozitededirler ve Newton akış gösterirler. Newton akış göstermeleri iç faz hacim oranının düşük ve damlacık büyüklüğünün çok küçük olduğunun işaretidir (Ktistis, 1990).

2.10. Formülasyon ve Bileşenleri

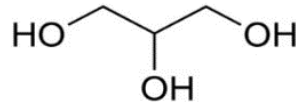
Bu tez çalışması kapsamında ucuz fiyatlı ve kolay hazırlanabilir olması sebebiyle stearat kremi taşıyıcı sistem olarak tercih edilmiştir. Stearat sabununun yüzey etkin madde olarak kullanıldığı kremler stearat kremi veya *vanishing* krem olarak anılırlar (MEB, 2011). Cilt üzerinde mat bir film tabaka oluşturması, %20'yi geçmeyen düşük yağ

oranına sahip olması ve üzerine makyaj yapılabilmesi sebebiyle tercih edilen bir krem çeşididir (Yazan, 2010).

Vanishing kremlerde yağ fazını oluşturan stearik asit; palmitik asit, distearik asit, oleik asit ve miristik asitten oluşur. Stearat kremin yapısındaki bazik özellikteki trietanol amin, ayrıca bazik özellikte formülasyon hedefi için stearat kreminin seçimine katkı sağlamıştır. Formülasyon bileşenleri olarak kararlaştırılan maddelere ait özellikler ilerleyen alt başlıklarda sunulmuştur (Yazan, 2010).

2.10.1. Gliserin

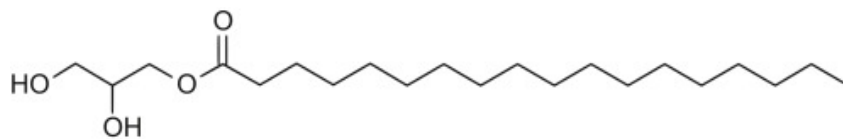
Polar organik bir trihidroksi alkoldür (http-8). Kimyasal adı E422, 1,2,3-propanetriol, gliserol olarak isimlendirilir. Molekül formülü $C_3H_8O_3$ 'dür (**Şekil 2.6**). Su ve alkol ile karışır; asetonda çözünür. Nemlendirme özelliği çok yüksektir, hacminin 4 katı kadar su tutabilir. Doğal ve petrokimyasal yollardan elde edilebilen gliserin, hayvansal ve bitkisel yağlarda bulunur. Kozmetik ürünlerinde çözücü ve yağlayıcı olarak kullanılır (Güven, 2001).



Şekil 2.6. Gliserin kimyasal yapısı (Gürel, 2009)

2.10.2. Gliserol monostearat

Gliserol monostearat (GMS), kozmetolojide emülgatör olarak kullanılan bir monogliserittir (**Şekil 2.7**). Kimyasal olarak stearik asidin gliserol esteridir. Higroskopik olan beyaz, kokusuz lapa şeklini alır. GMS, kıvam arttırıcı, emülsifiye edici olarak kozmetik ve saç bakım ürünlerinde sıklıkla tercih edilen bir maddedir (Hivare, Deosarkar ve Kamble, 2017).



Şekil 2.7. Gliserol monostearat kimyasal yapısı (Rosentrater ve Evers, 2018)

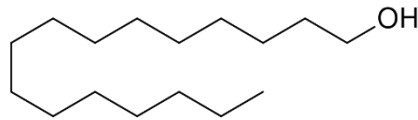
2.10.3. Propilen glikol

1,2-propanediol yapısında glikoldür. Kimyasal formülü $C_3H_8O_2$ olan propilen glikol düşük uçuculuklu, suyla, alkolle ve eterle karışabilen, yüksek saflıkta berrak renksiz, petrol yağı türevi bir solventtir. Nötral ve higroskopiktir. Etanolle aşağı yukarı eşit güçte bir antibakteriyel özelliktedir ([http-9](#)).

Propilen glikol kozmetikte oklüzif ve hümektan etkili bir nemlendirici olarak tercih edilir (Draelos, 2000). Yüksek seviyede su çekici özelliği ile hümektan sınıfta yer alır. Kozmetik ve farmasötik formülasyonlarda çözücü ve penetrasyon artırıcı olarak da kullanımı çok yaygındır. Hazırlanan formülasyonumuzda nemlendirici etkisi ile cildi rahatlatmasının yanı sıra penetrasyon artırıcı etkisinden de yararlanabilmek için kullanılmıştır (Yin vd., 2009).

2.10.4. Setil alkol

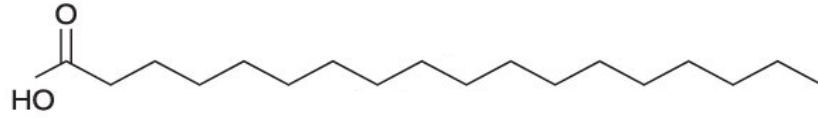
Setil alkol, 1817 yılında Fransız Michel Chevreul tarafından balina yağı ile işlem yapılarak keşfedilmiştir (**Şekil 2.8**). Günümüzde palmiye yağından elde edilen palmitik asidin azaltılması ile elde edilir (Rx MediaPharma, 2020). Cilt kremleri ve losyonlarda genellikle emülgatör, yumuşatıcı ve yoğunlaştırıcı olarak; şampuanlarda matlaştırıcı olarak kullanılır. Soğuk suda çözünmez, sıcak suda ve alkolde nispeten çözünür. Yağda çözünür özelliktedir (Gönül, 2000).



Şekil 2.8. Setil alkol kimyasal yapısı ([http-10](#))

2.10.5. Stearik asit

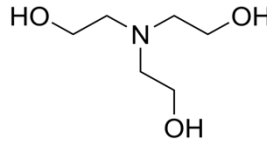
Stearik asit, $CH_3(CH_2)_{16}COOH$ formülüyle gösterilen doymuş bir yağ asididir (**Şekil 2.9**). Hayvan ve bitkiden elde edilen katı-sıvı yağlarda, genellikle gliserit stearin şeklinde bulunur. Sanayide yağların su buharıyla hidrolize uğratılmasıyla elde edilir. İçinde bir miktar palmitik ve oleik asit yabancı madde olarak kalır. Saf madde olarak fraksiyonlu distilasyonla ayrılabilir (Uçurum ve Malgır, 2017). Krem formülasyonlarında yumuşatıcı ve yardımcı emülgatör olarak kullanılmaktadır (Güven, 2001).



Şekil 2.9. Stearik asit kimyasal yapısı (Mensah, Awudza1 ve O'Brien, 2018)

2.10.6. Trietanolamin

Asitlerin nötralizasyonlarında kullanılan bir pH ayarlayıcı ve yüzey aktif maddedir (Fiume vd., 2013). Stearik asit veya oleik asit gibi yağ asitleriyle karıştırılınca non iyonik sabunlar oluşur. Su, kloroform ve alkolde çözünür, eterde güç çözünür özelliktedir (IARC, 2002).



Şekil 2.10. Trietanolamin kimyasal yapısı (IARC, 2002)

2.10.7. Gül hidrolatı

Gül hidrolatı, *Rosa damascena* (Görsel 2.4) cinsi gül çiçeğinin buhar distilasyonu sonrasında yağın altında kalan suyudur. %3 civarında gül yağı içerir. Gül yağı ise cildi tahriş ve alerjiye karşı antienflamatuar etkisi ile yatıştırma özelliği ile tanınmaktadır (Baydar ve Göktürk Baydar, 2017).

Farmakolojik olarak gül yağı ve gül suyu ile ilgili yapılan klinik çalışmalarda; anti-bakteriyel, anti-HIV, antikanserojenik, laksatif, antidiyabetik, analjezik, hipnotik, antikolülsan, antidepresan, bronkodilatatör, anksiyolitik, antioksidan, antienflamatuar, antispazmodik, yara iyileştirici ve anti-aging özellikler taşıdığı gösterilmiş; konjuktivit, kuru göz, katarakt gibi göz hastalıklarının tedavisinde kullanım alanı bulmuştur. Antienflamatuar etkisi ile gül hidrolatının, arbutinin oluşturacağı olası cilt tahrişini azaltması hedeflenmiş ve formülasyonumuzda deiyonize su yerine tercih edilmiştir (Şentürk ve Doğan, 2017).



Görsel 2.4. *Rosa damascena* (Boskabady vd., 2011)

2.10.8. Tatlı badem yağı

Tatlı badem yağı, *Prunus amygdalus dulcis* meyvelerinden soğuk sıkım yöntemi ile elde edilmektedir (Aydın, 2019). Soğuk sıkım yağlar ısı uygulamaksızın, sadece mekanik işlemlerle, yağın doğasını bozmadan üretilen bitkisel yağlardır (İmer ve Taşan, 2018). Tohumları %43-58 oranında sabit yağ içermektedir. Oleik asit (omega-9 yağ asiti), linoleik asit (omega-6 yağ asiti) ve bir miktar da doymuş yağ asidi içerir (Yıldırım vd., 2008).

Çin ve diğer geleneksel tıplarda cildi yumuşatmak, kurummasını gidermek, egzamayı gidermek için kullanımı vardır (Roncero vd., 2016). Hipertrofik skarlaşmayı azalttığı bildirilmektedir (yaralarda tamir sürecinin beklenenin ötesinde aşırı iz oluşumu ile sonuçlanması) (Balta, 2013). Yapılan kozmetik bir çalışmada topikal kullanılan badem yağının UV ışınlarının yaptığı yapısal hasarı önleyebileceği ve foto-yaşlanmayı yavaşlattığı bildirilmiştir (Sultana vd., 2007). Gebelikte görülen deri çatlaklarına (*Stria gravidarum*) sahip 16-18 haftalık hamile kadınlarda yapılan bir çalışma, *aloe vera* ve tatlı badem yağı kullanan hastalarda çatlak bölgesindeki kaşıntı ve çatlakların azaldığı görülmüştür (Hajhashemi vd., 2018).

2.10.9. Zeytin yağı

Zeytin yağı, *Olea europaea L.* ağacının yapraklarından elde edilir. Akdeniz iklimine sahip ülkelerde doğal olarak bulunur veya kültürü yapılmaktadır. Yaprakları tanen, uçucu yağ, organik asitler ve reçine taşır (Baytop, 1999). Skatrizan bir ajan olarak deride UV hasarı ve yaraları iyileştirmede kullanılır. Zeytinyağı içerdiği fenolik bileşikler sayesinde oksidatif ve foto-oksidatif strese karşı antioksidan özellik gösterir ve bu nedenle cildi koruyan dermakozmetik preparatların terkbine girmiş durumdadır (Demirezer vd., 2017).

2.11. Derinin Özellikleri ve Yapısı

Yaklaşık 1.8-2.0 m² yüzey alanı ve 9 kg ağırlığı ile vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturan deri, vücudumuzun en büyük organıdır. Yaklaşık 0.5-3.0 mm kalınlığındadır (Azizoğlu, 2014). Vücudumuzu fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal dış etkenlere karşı korur. Kan basıncının denetlenmesinde ve vücut sıcaklığının korunmasında rol oynar. Ayrıca UV ışınlarına karşı iyi bir koruma sağlar, antijenik uyarılardan korur. Derinin immün sistemin bir parçası olarak da çalışan bu bölümüne derideki lenfoit doku (SALT, *skin associated lymphoid tissue*) denir (Değim, 2007).

Deri pH'sı anatomik bölge, cinsiyet, ter, sebum içeriği ve hidrasyon gibi faktörlerin etkisi ile ortalama 4.2-5.6 değerine sahiptir. *Stratum corneum* asit pH'sının son bölgesi iken, bu ölü tabakanın hemen altındaki canlı epidermisin üst katmanlarında pH değeri nötrale yaklaşmıştır (Öhman ve Vahlquist, 1994; Ryan, Grice ve Roberts, 2016).

Yüksek miktarda kalsiyum iyonu içerir (yaklaşık 1 mg/g doku) (Azizoğlu, 2014). Deride kimyasal ve biyokimyasal bariyeri ise antioksidanlar, enflamatuvar mediyatörler, UV absorbe eden moleküller ve ksenobiotik metabolize edici enzimler sağlar (Aksoy, 2013). Deri yüzeyindeki desenlere dermatoglifler adı verilir; ayrıca, ter bezleri ve kıl folikülleri açıklıklarının meydana getirdiği gözeneklerde vardır (Gökçe, 2018).

2.12. Deri Rengi

Deri rengi, ırklara ve her ırk içindeki bireylere göre farklılık gösteren bir olgudur. Farklılığın temel sebepleri epidermisin kalınlığı, deri tabakasında bulunan pigment hücrelerinin yoğunluğu, tipi ve içeriği olarak sayılabilir (Tarımcı ve Badıllı, 2017). Doğumla gelen doğal deri rengi yaşam sürecinde istemsiz olarak değişiklik gösterebilir. Özellikle güneşe maruziyet sonucu UV ışınlarına bağlı olarak gelişen bronzlaşma sonucu kişide istemsiz bir deri rengi ortaya çıkar. Bu tip renk değişikliği geçici olup zaman içinde eski durumuna geri döner (Tarımcı ve Badıllı, 2017).

Genetik faktörler, deri pigmentleri, UV ışınlarına maruz kalma ve çevresel faktörler dünyadaki renk çeşitliliğinde etkindir. Epidermis tabakasında yer alan melanin pigmenti cilt rengini etkileyen temel maddedir. Melanin sentezini sağlayan melanositlerin sayısı, melanojenik aktivite, melanin tipi, melanozomların büyüklüğü, sayısı ve dağılımı da cilt renginin oluşumunda rol alan diğer faktörler arasındadır (Rawlings, 2006). Melanogeneziste, genetik faktörler rol alırken; proopiomelanokortin türevi peptidler olan hormonlar güneşe maruz kalınan bölgelerde pigmentasyonu uyarmaktadır (Gillbro ve

Olsson, 2011). Cilt rengini belirleyen diğer parakrin faktörler arasında endotelin-1, kök hücre faktörü, prostaglandinler ve katekolaminler yer almaktadır (Parvez vd., 2006).

Derideki pigmentasyon bozukluğu iki şekilde gerçekleşir.

- Hipopigmentasyon
- Hiperpigmentasyon

Hipopigmentasyon, melanin üretiminin yeterince olmaması veya yok olması durumunda deride oluşan renksiz alan ve beyaz leke ile karakterizedir (albinizm ve vitiligo hastalıkları). Hiperpigmentasyon ise melanin sentezinin farklı nedenlere bağlı olarak artması sonucu epidermis tabakasında kahverengiden siyaha kadar değişen renkte nokta ve lekelerle karakterizedir (Algın Yapar, 2017). Hiperpigmentasyon nedeni olarak melanosit hücrelerinin artması sonucu oluşan melanositoz ve melanin miktarının artmasına bağlı olarak görülen melanoz gösterilebilir. Hiperpigmente lezyon çocuk ve yetişkinlerde farklı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (Tarımcı ve Badıllı, 2017).

2.12.1. Melanin

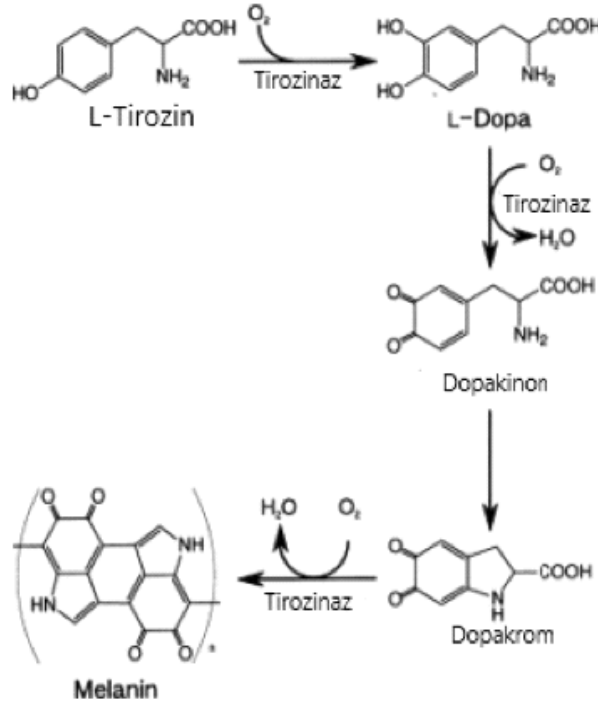
Melanin, oksihemoglobin, indirgenmiş hemoglobin ve karoten olmak üzere deride temel olarak dört pigment bulunur (Harry ve Wilkinson, 1982; Hekioğlu, 2004):

- *Melanin*: kahverengi renklidir ve epidermiste bulunur.
- *oksihemoglobin*: kırmızı renk verir ve dermisteki kılcıl kan damarlarında bulunur.
- *İndirgenmiş hemoglobin*: mavimsi kırmızı renk verir ve dermis tabakasındaki venler içinde bulunur.
- *Karoten*: sarı renk verir, derinin subkutan tabakasında bulunur.

Melasma açısından bu pigmentlerden en önemlisi, epiderminin bazal tabakasında yer alan melanosit hücreleri tarafından üretilen melanindir (Tarımcı ve Badıllı, 2017). Memeli hücrelerinin başlıca pigmenti olan melanin, deri, göz, saç ve iris te bulunan; indoller ve tirozin oksidasyonundan türetilen diğer ara ürünleri içeren ve düzensiz ışığı emen bir polimerdir. UV radyasyonuna karşı cildin korunmasının temel bir bölümüne katkıda bulunur (Turhan, 2018).

Melaninin sentezlendiği yer melanosit isimli özel hücrelerdir (Irmak ve Temel, 2000). Embriyoda nöral kristadan köken alarak çeşitli dokulara geçen melanosit tirozinaz enzimini aktive ederek tirozinin melanosit stoplazmasına kan akımı yoluyla ulaşmasını sağlar ve böylece tirozin, melanine dönüşerek melanozomlarda depolanır (Murray vd., 1998; Valipour, 2015). Daha sonra melanozomlar olgunlaşarak melanositlerden keratinositlere geçiş yaparlar. Keratinositlerdeki melaninin görevi, keratinositleri UV

ışınların zararlı etkilerinden korumaktır (Şahin, 2018). Ayrıca fenotiyazin, klorpromozin, klorokin, lokal anestezikler, aminoglikozid antibiyotikleri, herbisitler, boyalar, alkaloidler ve metaller gibi çeşitli kimyasal maddeler melaninde depolanır ve zararlı etkileri önlenir (Irmak ve Temel, 2000).



Şekil 2.11. Melanin sentezi şeması (Valipour, 2015)

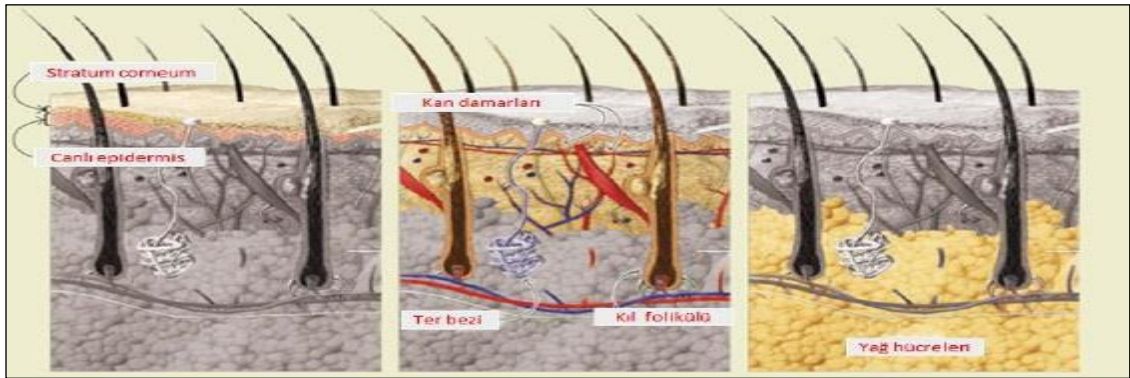
Melanin sentezinde (Şekil 2.11), L-tirozin bakır içeren tirozinaz enzimi ile oksitlenerek önce DOPA daha sonra da dopakinon bileşiğine dönüşür. Devam eden süreçte non-enzimatik oksidasyon zinciri ile dopakinondan bir seri indol türevi oluşur ve melanin kompleksi ortaya çıkmaktadır (Tarımcı ve Badıllı, 2017). Ortaya çıkan bu kompleks melanin pigment karışımında eu-melanin ve feomelanin birlikte bulunur. Omelanin polimerik yapılı olup molekül ağırlığı yüksektir ve siyahtan kahverengiye değişen melanin rengini ifade eder. Feomelanin ise, sarı kırmızı renkli olup alkali ortamda çözünür. Deride bu iki tip melanin karışım halinde bulunur. Feomelanin (sarı/kırmızı) ve omelanin (kahverengi/ siyah) olup dünyadaki etnik deri rengi farklılıklarının temel nedeni olarak kabul edilmektedir (Algın Yapar, 2017).

Melanin sentezinde yer alan tirozinaz enzimi oksidoredüktaz enzim grubuna aittir (Valipour, 2015). Bakteriler, mantarlar, bitkiler, böcekler, kabuklular ve memeliler gibi geniş bir yelpazede bulunan tip III bakır proteinidir (Valipour ve Arıkan, 2018). Enzim

oksijensiz olarak inaktif durumunda iken bir oksijen molekülü bağlanarak oksiduruma gelir ve aktifleşir. Kristal tirozinaz enzimlerinin yapısında, enzimin aktivitesi için gerekli iki bakır iyonu katalitik çekirdek içinde yer alır. Bakır iyonlarıyla etkileşerek cilt rengini açan askorbik asit gibi etkin maddelerin hedefi bu nedenle tirozinaz enzimindeki bakır iyonlarıdır (Valipour, 2015).

2.13. Derinin Tabakaları

En üstte dış çevre ile temas halindeki epidermis, altında bağ dokusu elemanlarından oluşan, elastikiyet ve direnci sağlayan dermis, dermisin altında ise yağ içeriği yüksek olan ve alttaki dokularla bağlantıyı sağlayan subkutan doku olarak da bilinen hipodermis vardır (Şekil 2.12) (Öhman ve Vahlquist, 1994).



Şekil 2.12. Derinin tabakaları (Gökçe, 2018)

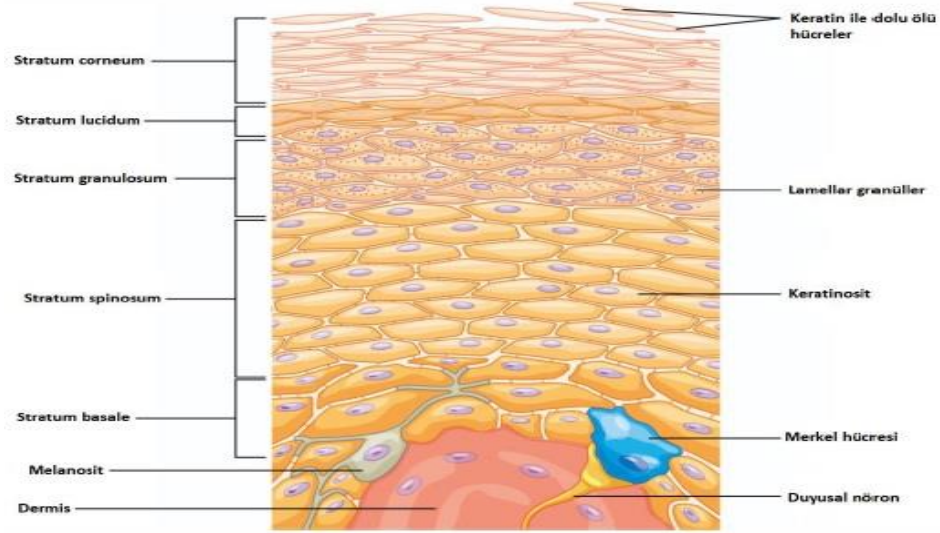
Ayrıca epidermis ve dermis arasında da dermo-epidermal bileşen (*junction*) adı verilen özelleşmiş bir yapı yer alır. Dermo-epidermal bileşen, üstteki epidermise mekanik destek sağlarken dermis ve epidermis arasında hücreler ve büyük moleküllere karşı engel görevi yapar (Azizoğlu, 2014).

2.13.1. Epidermis

Kan damarı ve lenfatik sistem içermeyen derinin en dış tabakasıdır. Çoğunlukla keratinosit hücrelerinden oluşmaktadır. Dermis ile komşu katmanda keratinositler bölünerek üst katmanlara atılır. Alt katmanlarda canlı olan keratinositler en üst katmanda ölür ve deriden dökülerek atılır. Bu sürece keratinizasyon döngüsü-turnover denilmektedir. Normal bir insanda bu süreç 28 gündür. Kalınlığı bulunduğu bölgeye göre 150-180 µm arasında değişir. Epidermis beş ayrı tabakadan oluşur (Ryan Grice ve Roberts, 2016).

Bu tabakalar en dıştan en içe doğru aşağıdaki şekilde sıralınır (Şekil 2.13):

- *Stratum corneum*
- *Stratum lucidum*
- *Stratum granulosum*
- *Stratum spinosum*
- *Stratum basale*



Şekil 2.13. Epidermin yapısı (Gökçe, 2018)

2.13.1.1. *Stratum corneum* (boynuzsu tabaka)

Protein ve lipitlerden oluşmaktadır. Protein kısmı α ve β keratinden, lipit kısmı ise, seramitler, serbest steroller, serbest yağ asitleri ve trigliseritler gibi nötral lipitlerden meydana gelmiştir. Hidrofobik bir membran gibi davranır (Willia ve Barry, 1991).

İki haftada bir kendini yenileyen epidermin en dış tabakasıdır ve 6-15 μm kalınlığındadır (Özkan, 2011). 15-20 kat ölü, yassılaştırmış, uzamış ve tamamen keratinize olmuş korneositleri içerir (Özkan, 2011). Hücrelerin ve korneositler içindeki proteinlerin etrafını saran lipit tabaka, ilaçların deriden geçişi için bariyer görevi yapar. İçerdiği lipit miktarı ve cinsi, bulunduğu vücut bölgesine göre değişir ve bu da permeabilitenin farklılığında önemli bir faktördür (Azizoğlu, 2014). *Stratum corneum* bariyeri, korneosit hücreleri ve hücreler arası lipitlerin organizasyonu sonucu oluşan fiziksel bariyer özelliğini sağlayan en dış kısımdır. Ayrıca epidermis hücreleri arasındaki sıkı bağlantı noktaları da bariyere destek verir (Wang vd., 2005).

2.13.1.2. *Stratum lucidum*

Sadece avuç içi ve ayak tabanı gibi derinin çok kalın olduğu bölgelerde görülen aşırı düzleşmiş eozinofilik hücrelerden oluşan ince bir tabakadır (Azizoğlu, 2014).

2.13.1.3. *Stratum granulosum (granüler tabaka)*

Düzleşmiş hücrelerden oluşan canlı epidermin en dış sınırındır. Keratinizasyonun ilk bulgularını gösterir. Çekirdek ayrılması bu tabakada başlar fakat hücrelerde çekirdek hala vardır (Özkan, 2011).

2.13.1.4. *Stratum spinosum (diken, sivri uç tabakası)*

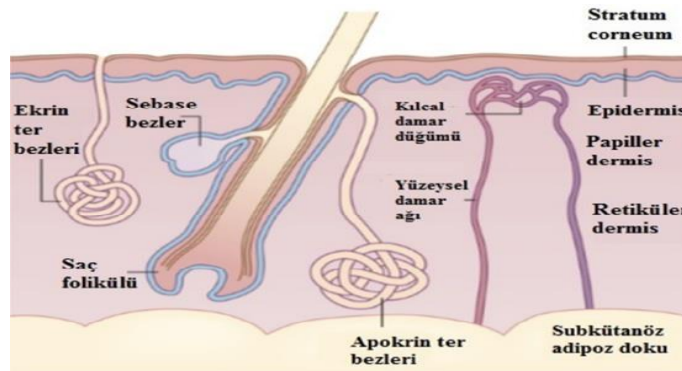
Lipit yönünden zengin tabakalı bölümler içerir ve desmozom adı verilen bağlantı birimleri fazladır (Acartürk vd., 2007).

2.13.1.5. *Stratum germinativum (bazal tabaka)*

Dermis-epidermis sınır noktasıdır ve ayrıca deri pigmentini oluşturan melanositler de bu tabakada bulunmaktadır. Daha hızlı bölünebilen, çoğalabilen hücreleri içerir ve böylece deri yüzeyine doğru ilerleyip farklılaşarak diğer tabakaları oluşturacak şekilde yer değiştirir. Hemidesmozom adı verilen bağlantı birimleri ile dermise bağlanmışlardır (Azizoğlu, 2014).

2.13.2. Dermis

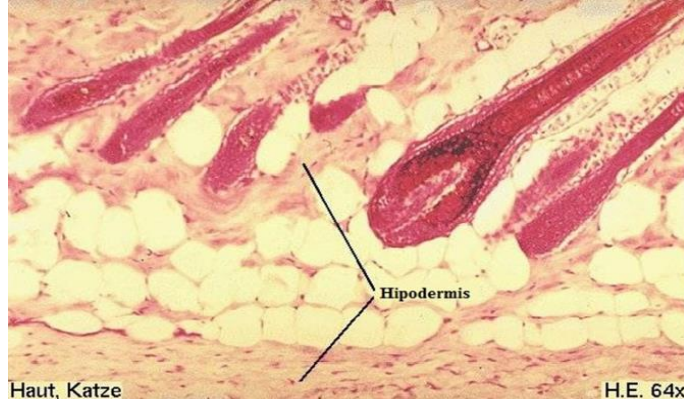
Kolajen, retikülin ve esneklik veren bir protein olan elastin olarak 3 önemli protein içeriği karakterizedir. Ayrıca polisakkarit içeriği de yoğundur (Azizoğlu, 2014). Dermisin hücresel kısmını da fibroblastlar, mast hücreleri ve histiyositler oluşturur. Saç folikülleri, ektrin ve apokrin ter bezleri, dokunma ve basınç duyularını ileten özelleşmiş sinir hücreleri de bu tabakadadır. Dermisin ayrıca çok zengin bir damar içeriği vardır (Wang vd., 2005).



Şekil 2.14. Dermisin yapısı (Gökçe, 2018)

2.13.3. Hipodermis (deri altı tabaka)

Yağ üreten ve depolayan hücrelerden oluşur. Fiziksel destek vermek, sıcaklık yalıtımını temin etmek ve kolajenler yoluyla deriye esneklik sağlamak görevleridir. Ayrıca ana kan damarları bu tabakadadır (Azizoğlu, 2014).



Şekil 2.15. Hipodermisin mikroskopik görüntüsü (Gökçe, 2018)

2.14. Deri Uzantıları

Deri uzantıları, ekrin ve apokrin ter bezleri, yağ (sebase) bezleri, kıl folikülleri ve tırnaklardan oluşmaktadır (Özkan, 2011). Ekrin ter bezleri, apokrin ter bezlerinden daha küçüktür. Salgılarını doğrudan deri yüzeyine boşaltan tübüler yapıdaki ekrin bezler dudaklar ve parmaklar hariç tüm vücutta bölgeye göre değişen yoğunlukta bulunurlar. Ayrıca, deri yüzeyini patojenlere karşı koruyan asit ortamın pH'ını etkiler ve vücut sıcaklığının düzenlenmesinde görev alırlar (Gökçe, 2018). Apokrin ter bezleri ise, deri yüzeyine açılmadan kanallar ile kıl foliküllerine açılırlar. Aksilla ve perianal bölgelerde lokalizedirler (Acartürk vd., 2007). Yağ bezleri, trigliseritler, serbest yağ asitleri ve skualen karışımından oluşan sebum salgısını üretirler ve genellikle kıllı bölgelerde bulunurlar. Kısa bir kanal ile bağlı bulunduğu kıl folikülüne açılır ve arektör pili kasının kasılması ile içindeki sebumu kıl folikülü aracılığı ile deri yüzeyine boşaltırlar (Zouboulis, 2004). Sebum salgısı derinin kurumasını önler, deri bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunur (Acartürk vd., 2007). Bir kıl folikülü ve birlikteki yağ bezinden oluşan yapı pilosebace ünite olarak adlandırılır (Rhein, Zatz ve Motwani, 2007).

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

Alpha Arbutin	Hangzhou Lingebe Technology	Çin Halk Cum.
Asetonitril	Sigma-Aldrich	Almanya
Badem Yağı	Tito / Smart Kimya	Türkiye
Etanol	Sigma-Aldrich	Almanya
Gliserin	Tekkim Kimya	Türkiye
Gliserol Monostearat	Tito / Smart Kimya	Türkiye
Gül Hidrolatı	Suvar Kimya	Türkiye
Metanol	Sigma-Aldrich	Almanya
o-fosforik asit	Sigma-Aldrich	Almanya
Propilen Glikol 400	Merck	Almanya
Setil Alkol	Zag Kimya	Türkiye
Stearik Asit	Mum / Smart Kimya	Türkiye
Trietanol Amin	Tekkim Kimya	Türkiye
Zeytin Yağı	Tariş	Türkiye

3.2. Kullanılan Cihazlar

Analitik Terazı	Mettler Toledo Xse105	ABD
Büyük Kapasiteli Santrifüj	Eppendorf 5810	Almanya
Buzdolabı	Arçelik No Frost	Türkiye
Çoklu Manyetik Karıştırıcı	IKA RT 15	Almanya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetri	Shimadzu DSC-60	Japonya
Dondurucu (-20°C)	Arçelik	Türkiye
Distile Su Cihazı	MilliQ Millipore	Fransa
Etüv	Nüve FN 500	Türkiye
Hassas Terazı	Mettler Toledo D96R	Türkiye
Kararlılık Kabini	Aymes	Türkiye
Mekanik Karıştırıcı	Heidolph RZR 2102	Almanya
Mekanik Karıştırıcı	Daihan WiseStir HS-50A	Güney Kore
Mikropipet Seti	Eppendorf	Almanya
pH Metre	Mettler Toledo Sevencompact	ABD
pH Metre	WTW Profi Lab, pH 597	Almanya
Reometre	Brookfield DV-III	ABD
Saklama Dolabı (-20°C)	Liebherr Medline	Avusturya
Saklama Dolabı (4°C)	Liebherr Medline	Avusturya
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5417r	Almanya
Su banyosu	Büchi B-490	İsviçre
Ultra Performanslı		
Sıvı Kromatografisi	Agilent 1290 Infinity	ABD
Vorteks karıştırıcı	Jeiotech VM96B	Güney Kore

4. YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında etkin maddenin suda çözünmesi ve hedef leke yapıcı melanin pigmentinin epidermiste yer alması sebebi ile su fazı içeren ve yüzeysel olarak epidermise uygulanabilen klasik emülsiyon tercih edilmiştir. Yöntemler kısmında öncelikle etkin madde miktar tayini için geliştirilen analitik yöntemin validasyon parametreleri açıklanmış; sonrasında ise formülasyon ve stabilite çalışmaları ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

4.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

Analitik yöntem validasyonu yapılmasındaki amaç kullanılan test yönteminin güvenliği, doğruluğu ve planlanan hedefe uygunluğunu verilerle kanıtlamaktır. Yapılan çalışmada doğrusalılık, kesinlik, doğruluk, duyarlılık ve seçicilik gibi analitik parametreler etkin maddenin miktar tayini yöntem validasyonunda esas alınarak analitik olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada Q2(R1) Analitik İşlem Validasyonu başlıklı Uluslararası Harmonizasyon Kılavuzu kullanılmıştır (ICH, 1996).

Etkin madde olan arbutin miktar tayini için ultra performanslı sıvı kromatografisi (UPLC) kullanılmıştır. UPLC etkin madde olan Arbutin in miktar tayini için kullanılmıştır. Hareketli faz olarak metanol, su ve o-fosforik asit çözeltisi farklı oranlarda karıştırılarak ve izokritik ayırım yapılarak kullanılmış sabit faz olarak ise sistemde C18 kolonu kullanılmıştır. Farklı faz ve oranlar denenerek arbutin sinyali belirlenmiş ve diğer sinyallerden ayrılma durumuna bakılarak en uygun hareketli faz seçilmiştir. Kolona verilme sıcaklığı etkin madde ve hazırlanan hareketli faz için 20-40 °C arası değiştirilerek belirlenmiştir. En görülür olan arbutin dalga boyunun belirlenmesi için dedektör kullanılmış ve farklı dalga boylarındaki piki incelenmiştir. Hazırlanan bütün örnekler 0.22 µm selüloz asetat membrandan süzülerek UPLC ile analiz edilmiştir. Literatür araştırması ve yapılan denemeler sonucunda karar verilen ve analizlerde kullanılan çalışma koşulları **Çizelge 4.1**'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1. *Ultra performanslı sıvı kromatografisi çalışma koşulları*

Cihaz	Agilent 1290 Infinity
Kolon	Agilent Poroshell 120 EC-C18 3.0x100 mm, 2.7 µm
Fırın Sıcaklığı	30°C
Hareketli Faz	metanol:su (10:90, h/h) + %2 o-fosforik asit
Dedektör	Fotodiyot dizi dedektörü
Dalga Boyu	226 nm
Akış Hızı	0.3 mL.dk ⁻¹
Enjeksiyon Hacmi	1.0 µL

4.1.1. Doğrusallık (Linearity)

Analitik yöntemin doğrusallığı bilinen konsantrasyondaki stok çözeltilerden farklı oranlarda hazırlanan örnekler ile doğru orantılı test sonuçları elde edilebilme yeteneğidir. Analitik yöntemin çalışma aralığı içinde bir bölge seçilmesi doğrusal ilişki için gerekliliktir. Doğrusallığın sinyal alanı vermesi analitik konsantrasyonunun fonksiyonu olmasının sebebidir. İstatistiksel yöntem ve regresyon analizi bu teste ait değerlendirmede kullanılmaktadır. Deney minimum 5 konsantrasyon ve 3 tekrardan oluşacak şekilde planlanmıştır. Kabul limiti regresyon sonucunda elde edilen korelasyon katsayısının minimum üç dokuzlu olmasıdır. Doğrusallık çalışması sonucunda gerekli veriler korelasyon katsayısı, y-kesişim, eğim, artık kareler toplamı (RSS, residual sum of squares) ve grafiklerdir.

4.1.2. Kesinlik (Precision)

Kesinlik, repeatability (tekrar edilebilirlik), intermediate precision (ara ürün kesinliği) ve reproducibility (tekrar üretilebilirlik) olarak ölçülebilmektedir. Kısa bir zaman aralığı ve aynı işlem koşullarındaki kesinlik tekrar edilebilirlik olarak adlandırılır. Aynı stok çözelti kullanılarak hazırlanan örneklerin birkaç kez tekrarlanması ile yöntemin tekrar edilebilirliği kanıtlanır. Bu işlem, çoklu örnek hazırlanması (n=6) ya da 3 farklı konsantrasyonda 3 tekrar ile yapılabilir. Yöntemin tekrar edilebildiğini göstermek için sonuçların standart sapma (SS), bağlı standart sapma (BSS) ve güven aralıkları (CI) (confidence intervals) verilmelidir.

Ara ürün kesinliğinde birbirinden bağımsız olayların analitik yöntemin kesinliğine olan etkisi bulunmalıdır. Bu değişkenler günler, analistler, kullanılan malzeme ve araçlar olabilir. Farklı labratuarlarda deneyin tekrarlanarak aralarındaki kesinliğin gösterilmesine ise tekrar üretilebilirlik denir. Bu zorunlu olmayan ve farklı birimler arası ortak çalışma gerektiren bir parametredir.

4.1.3. Doğruluk (Accuracy)

Kullanılan analitik yöntem ile elde edilen deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığı Doğruluk olarak adlandırılır. En az 9 tayinle (3 konsantrasyon / 3 tekrar) yapılmalı ve % verim olarak ifade edilmedir. Doğruluğun belirlenebilmesi için konsantrasyonu bilinen örneklerin ölçümü yapılır ve hesaplanan miktarlar gerçek miktarlarla karşılaştırılır. Sonuçlar % verim ve her seri için BSS ve %95 CI olarak verilir.

4.1.4. Duyarlılık (Sensitivity)

Çok düşük konsantrasyonları tespit edebilme yeteneğine analitik yöntemin duyarlılığı denir. Örnek içindeki analitin konsantrasyonunun tam değer olarak en düşük miktarına Saptama Sınırı (LOD) denir ve bu bazın kantitatif olarak kesin bir değer olmayabilir. Örnek içindeki analitin kantitatif olarak saptanabilen uygun doğruluk ve kesinlik içindeki en düşük miktarına Miktar Tayini Sınırı (LOQ) denir. Hem saptama sınırı hem de miktar tayini sınırını belirlemek için yöntemin enstrümental olup olmamasına bağlı olarak farklı yaklaşımlar vardır:

- Görsel değerlendirmeye bağlı yöntem
- Sinyal-gürültü yöntemi
- Eğim ve standart sapmaya bağlı yöntem

Boş örneklerin standart sapması veya kalibrasyon eğrisinin kullanımı

LOD ve LOQ hesapları için kullanılan formüller aşağıdaki gibidir:

$$\text{LOD} = 3.3 \times (\text{regresyon doğrusunun y-kesişim değerinin standart sapması} / \text{eğim})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (\text{regresyon doğrusunun y-kesişim değerinin standart sapması} / \text{eğim})$$

4.1.5. Seçicilik (Specificity)

Spesifik olarak sadece amaçlanan bileşen veya bileşenleri analitik yöntemin tayin edebilmesi özelliğine Seçicilik denir. Yardımcı maddeler, etkin maddenin bilinen metabolitleri, safsızlıklar gibi ortamda bulunabilecek diğer bileşenler tek bir bileşen için yapılan ölçümü etkilememelidir. Seçicilik, karmaşık numune karışımının analizinde girişim derecesinin de ölçüsüdür.

4.2. Optimum Formülasyonun Belirlenmesi

Optimum formülasyonun belirlenmesi için çalışmalara öncelikle etkin madde içermeyen formülasyonlarla başlanmıştır. Bu amaçla farklı oranlarda yardımcı madde ve emülgatör içeren emülsiyon formülasyonları hazırlanmıştır. Toplam yedi farklı formülasyon planlanmış ve tüm formülasyonlar 20 gram üzerinden hesaplanmıştır. Su

fazını oluşturan gliserol monostearat, trietanolamin, gliserin, propilen glikol ve gül hidrolatı ayrı bir beherin içine yüzde ağırlıklarına göre hassas terazide tartılarak eklenmiştir. Diğer bir behere yağ fazını oluşturan zeytin yağı, badem yağı, setil alkol, stearik asit yüzde ağırlık oranlarına göre hassas terazide tartılarak eklenmiştir. Sıcak su banyosu 74°C sıcaklığa ayarlanmış ve bu sıcaklığa ulaşıldıktan sonra yağ ve su fazını içeren beherler ayrı ayrı su banyosu üzerine konulmuştur. Karıştırıcı 500 rpm'e ayarlanarak iki faz ayrı ayrı karıştırıcılarda 5 dakika homojen olana kadar karıştırılmıştır. Daha sonra su fazı yağ fazının üstüne eklenerek 5 dakika karıştırılmıştır.

Çizelge 4.2. Farklı oranlarda hazırlanan klasik emülsiyonlar

Bileşen	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
Zeytinyağı	%6.0	%12.0	%20.0	%6.0	%3.0	%3.0	%6.0
Badem yağı	%6.0	%12.0	%20.0	%6.0	%3.0	%3.0	%6.0
Setil Alkol	%4.0	%4.0	%4.0	%6.0	%6.0	%4.0	%4.0
Stearik asit	%1.0	%1.0	%1.0	%0.5	%0.5	%1.0	%0.5
Gliserol monostearat	%3.0	%3.0	%3.0	%6.0	%6.0	%3.0	%3.0
Trietanolamin	%1.0	%1.0	%1.0	%0.5	%0.5	%1.0	%0.5
Gliserin	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0
Propilen glikol	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0	%3.0
Gül hidrolatı	%73.0	%73.0	%45.0	%69.0	%75.0	%79.0	%80.0

Homojen karışım sağlandıktan sonra su banyosu 40°C sıcaklığa düşürülmüş ve karıştırma işlemine 5 dakika daha devam edilmiştir. Pomat kutusuna karışım aktararak soğumaya bırakılmıştır. Tüm pomat kutularındaki formülasyonlar 1'den 7'ye kadar numaralandırılmış ve oda sıcaklığında 1 hafta beklemeye alınmıştır. Hazırlanan formülasyonların yüzde ağırlıkları **Çizelge 4.2'**de verilmiştir. Bir haftanın sonunda formülasyonlar renk, koku, faz ayrımı, sürülebilirlik ve bakteri üremesi olarak belirlenen organoleptik kontrollerle değerlendirilmiş ve 1-10 arası puanlandırılmıştır.

Renk parametresinde sarı renk 1 puan ve beyaz renk 10 puan olarak; koku parametresinde rahatsız edici koku 1 puan ve güzel koku 10 puan olarak; sürülebilirlik parametresinde yapışkan ve partikül bırakan formülasyon 1 puan ve kolay sürülen, yapışkan olmayıp partikül bırakmayan formülasyon 10 puan olarak; faz ayrışması parametresi için ayrışma yaşanmış formülasyon 1 puan ve stabil kalmış krem formülasyonu 10 puan olarak; ve son parametre bakteri üremesi sonucu gözle görülen siyah adacıkların miktarı çok ise 1 puan ve hiç adacık yoksa 10 puan olarak değerlendirilmiştir.

Her formülasyon toplam 3 kere hazırlanmış ve elde edilen tüm organoleptik kontroller puanlanarak **Çizelge 4.3**'de sıralanmış ve gösterilmiştir. Sonuç olarak en yüksek puanı alan F1 formülasyonu kullanılarak çalışmalara devam edilmesi uygun bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Hazırlanan emülsiyonlarda yapılan organoleptik kontroller (n=3)

Formülasyon	Renk	Koku	Faz Ayrımı	Sürülebilirlik	Bakteri Üremesi
F1	10	10	10	9	10
F2	10	8	9	9	7
F3	10	8	6	7	7
F4	9	10	8	9	7
F5	8	9	10	8	9
F6	10	7	9	8	6
F7	7	6	8	9	10

4.3. Arbutin İçeren Formülasyon Hazırlanması

Etkin madde içermeyen 20 g F1 formülasyonun yağ fazını hazırlamak için 1.2 g zeytin yağı, 1.2 g badem yağı, 0.8 g setil alkol ve 0.2 g stearik asit hassas terazide tartılarak bir behere konulmuştur. Su fazı için 0.6 g gliserol monostearat, 0.2 g trietanolamin, 0.6 g gliserin, 0.6 g propilen glikol ve 14.6 g gül hidrolatı tartılmış ve farklı bir behere konulmuştur. Beherler su banyosu üzerine yerleştirilmiş ve üstleri saat camıyla kapatılarak her iki faz 74°C sıcaklığa getirilmiştir. Karıştırıcı 500 rpm hıza ayarlanarak iki faz homojen olana kadar ayrı ayrı 5 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra su fazı yağ fazının üstüne eklenerek 5 dakika karıştırılmıştır. Homojen karışım sağlandıktan sonra su banyosu 40°C sıcaklığa düşürülmüş ve karıştırma işlemine 5 dakika daha devam edilmiştir. Pomat kutusuna karışım aktararak kapağı kapatılmış ve soğumaya bırakılmıştır.

Etkin madde içeren 20 g formülasyon hazırlamak için %1 oranında eklenen etkin madde gül hidrolatı miktarından düşürülmüştür. Yağ fazını oluşturan 1.2 g zeytin yağı, 1.2 g badem yağı, 0.8 g setil alkol ve 0.2 g stearik asit hassas terazide tartılarak bir behere konulmuştur. Su fazını oluşturan 0.6 g gliserol monostearat, 0.2 g trietanolamin, 0.6 g gliserin, 0.6 g propilen glikol, 14.4 g gül hidrolatı ve 0.2 g arbutin hassas terazide tartılmış ve ayrı bir behere konulmuştur. Hazırlanan beherlere etkin madde içermeyen formülasyonlarla aynı hazırlama prosedürü uygulanmıştır. Yağ ve su fazlarını içeren beherler su banyosu üzerine yerleştirilmiştir. Üstleri saat camıyla kapatılarak her iki faza

ait maddeler 74°C sıcaklığa getirilmiştir. Karıştırıcı 500 rpm hıza ayarlanarak iki faz homojen olana kadar ayrı ayrı 5 dakika karıştırılmıştır. Su fazı yağ fazının üstüne eklenerek 5 dakika karıştırmaya devam edilmiştir. Homojen karışım sağlandıktan sonra su banyosu 40°C sıcaklığa ayarlanarak karıştırmaya 5 dakika daha devam edilmiş ve sonra pomat kutusuna karışım aktarılarak soğumaya bırakılmıştır.

Hazırlanan 3 adet 20 g etkin maddeli formülasyon üzerinde hemen sıfıncı zaman (formülasyonların hazırlandığı gün) analizleri yapılmış ve stabilite incelemesi için $4 \pm 1^\circ\text{C}$ buzdolabında, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında ve $40 \pm 1^\circ\text{C}$ olacak şekilde üç farklı ortamda formülasyonlar muhafaza edilmeye başlanmıştır.

4.4. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Karakterizasyon çalışmalarının önemi istenilen özelliklerde ve kararlı bir yeni taşıyıcı sistem oluşturmanın zorluklarından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle yapılacak karakterizasyon çalışmaları büyük önem taşımaktadır. Formülasyonlar üzerinde organoleptik kontroller, faz ayrımı ve santrifüj uygulanması, pH analizi, termal analiz, reolojik analiz, etkin madde miktar tayini testleri gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Organoleptik kontroller

Taze olarak hazırlanan formülasyonların $25 \pm 1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığındaki genel görünüşü, kıvam, faz ayrışması, renk ve koku gibi özellikleri incelenmiştir.

4.4.2. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması

Faz ayrımının oluşmasını değerlendirmek için taze hazırlanan formülasyonlar 500 ve 1000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek incelenmiştir. Ayrıca formülasyon iki gün boyunca -20°C de bekletilmiş ve sonrasında oda sıcaklığında çözündürülerek fiziksel durumu görsel olarak incelenmiştir.

4.4.3. pH analizi

pH metre kullanılarak taze olarak hazırlanmış formülasyonların pH değeri ölçümü yapılmıştır.

4.4.4. Termal analiz

Diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak Arbutin ve taze hazırlanmış formülasyonların termal analizi yapılmış ve termogramlar elde edilmiştir. Alüminyum örnek kabına konulan yaklaşık 3-5 mg madde basınç yardımı ile kapağı kapatılarak analiz edilmiştir. Analiz boş alüminyum örnek kabı referans alınarak, 50 mL/dk akış hızında azot gazı ve 10°C/dk sıcaklık artışı ile gerçekleştirilmiştir.

4.4.5. Reolojik analiz

Akış tipi belirlenmesinde taze olarak hazırlanan formülasyonların reolojik davranışı analiz edilmiştir. Brookfield koni-plak reometresi analizlerde kullanılmıştır. Ölçümler, çapı 1.2 cm ve eğimi 1.565° olan koni ile 25±1°C oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

4.4.6. Etkin madde miktar tayini

Valide edilmiş UPLC yöntemi etkin madde miktar tayini çalışmasında kullanılmıştır. Taze olarak hazırlanan 20 g formülasyondan 200 mg tam olarak tartılmış 10 mL metanol:su (10:90, h/h) karışımı kullanılarak etkin maddenin çözünmesi sağlanmış ve yine aynı karışım kullanılarak 40 mL'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm selüloz asetat membrandan süzülerek UPLC ile analiz edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır.

Formülasyonlar %1 oranında arbutin içerdiği için 20 g formülde 200 mg etkin madde ve miktar tayini için alınan her bir 200 mg örnekte 2 mg etkin madde bulunmaktadır.

$$20 \text{ g} \times \frac{1}{100} = 0.2 \text{ g} = 200 \text{ mg arbutin} \quad (1)$$

4.5. Stabilité Testleri

Hazırlanan formülasyonlar kararlılık çalışması için ağzı sıkı kapalı kavanozlar içerisinde 4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C olmak üzere üç farklı ortam koşulunda üç ay süresince saklanmıştır. 0., 30., 60., ve 90. günlerde kararlılık ortamlarında bekletilen formülasyonlar üzerinde fiziksel özelliklerin belirlenmesi ve olası değişimlerin incelenmesi için testler yapılmıştır.

4.5.1. Organoleptik kontroller

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların genel görünüşü, kıvamı, renk, koku, faz ayrışması gibi özellikleri belirli aralıklarda incelenmiştir.

4.5.2. pH analizi

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların pH değerlerindeki değişimler pH metre ile belirli aralıklarda ölçülmüştür.

4.5.3. Termal analiz

Diferansiyel taramalı kalorimetre kullanılarak $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonlarda termal analiz yapılmış ve termogramlar elde edilmiştir. Alüminyum örnek kabına konulan yaklaşık 3-5 mg madde basınç yardımı ile kapağı kapatılarak analiz edilmiş, işlem 50 mL/dk akış hızında azot gazı ve 10°C/dk sıcaklık artışı ile gerçekleştirilmiştir.

4.5.4. Reolojik analiz

Akış tipindeki değişimlerin incelenebilmesi için reolojik davranış analizleri $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonlarda yapılmıştır. Brook field koni-plak reometresi reolojik analizlerde kullanılmıştır. Ölçümler, çapı 1.2 cm ve eğimi 1.565° olan koni ile $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir.

4.5.5. Etkin madde miktar tayini

Valide edilmiş UPLC yöntemi stabilite testlerinin içinde yer alan etkin madde miktar tayini çalışmasında kullanılmıştır. $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan 20 g formülasyonlardan 200 mg tam olarak tartılmış 10 mL metanol:su (10:90, h/h) karışımı kullanılarak etkin maddenin çözünmesi sağlanmış ve yine aynı karışım kullanılarak 40 mL'ye tamamlanmıştır. 0.22 μm selüloz asetat membrandan süzülerek UPLC ile analiz edilmiştir. Bu işlem 0., 30. ve 90. günlerde üç kere tekrarlanmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

5. BULGULAR ve TARTIŞMA

5.1. Analitik Yöntem Geliştirme ve Validasyon Çalışmaları

Miktar tayini validasyonunda doğrusallık, kesinlik (tekrar edilebilirlik ve tekrar üretilebilirlik), doğruluk, duyarlılık ve seçicilik parametreleri esas alınmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

5.1.1. Doğrusallık (Linearity)

UPLC yönteminde kullanılacak arbutine ait standart eğrinin belirlenmesi amacıyla metanol:su (10:90, h/h) karışımı kullanılarak stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltilerden hareketle 10-100 µg/mL aralığında 6 adet seyreltme yapılarak 3 farklı seri hazırlanmış ve arbutin konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri bulunmuştur. Konsantrasyona karşı alan/tutulma zamanı (R_t) değerleri **Çizelge 5.1-5.3**'te sunulmuştur.

Çizelge 5.1. Seri 1 UPLC sonuçları ve değerlendirilmesi

Seri 1	Konst (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/ R_t
1	10.0000	40.3970	2.9380	13.7498
2	20.0000	87.1165	2.9220	29.8140
3	40.0000	164.8482	2.9210	56.4355
4	60.0000	248.1971	2.9200	84.9990
5	80.0000	330.7694	2.9190	113.3160
6	100.0000	417.6929	2.9180	143.1436

Çizelge 5.2. Seri 2 UPLC sonuçları ve değerlendirilmesi

Seri 2	Konst (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/ R_t
1	10.0000	40.7423	2.9260	13.9242
2	20.0000	81.9877	2.9220	28.0588
3	40.0000	163.7931	2.9220	56.0551
4	60.0000	247.4547	2.9190	84.7738
5	80.0000	328.8933	2.9210	112.5961
6	100.0000	416.3008	2.9200	142.5688

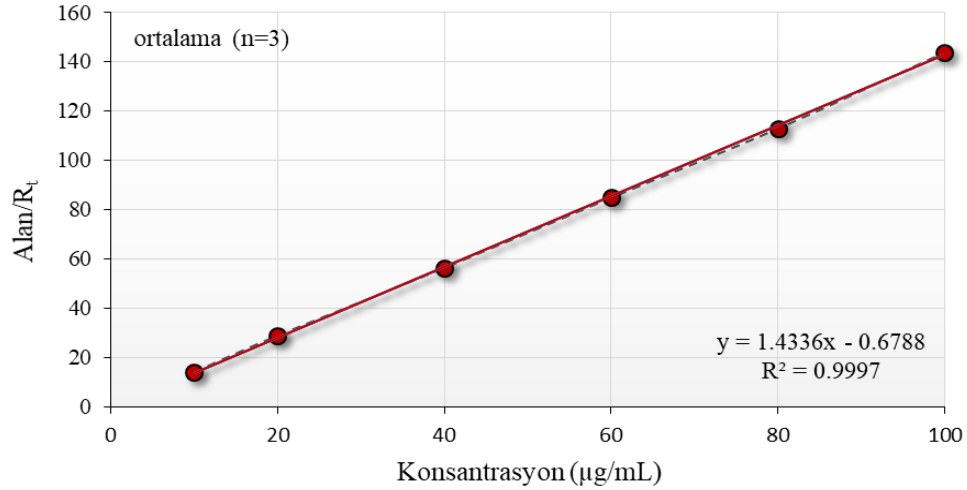
Çizelge 5.3. Seri 3 UPLC sonuçları ve değerlendirilmesi

Seri 3	Konst (µg/mL)	Alan	R_t	Alan/ R_t
1	10.0000	40.5992	2.9230	13.8896
2	20.0000	82.1095	2.9180	28.1390
3	40.0000	163.9398	2.9210	56.1245
4	60.0000	247.0624	2.9210	84.5814
5	80.0000	329.2879	2.9210	112.7312
6	100.0000	426.3095	2.9180	146.0965

Üç serinin birlikte değerlendirilmesi için yapılan hesaplamalar **Çizelge 5.4**'te verilmiştir. Yapılan doğrusallık çalışması sonucunda, arbutin etkin maddesinin konsantrasyon hesabı için kullanılacak doğru denklemi $y=1.4336x - 0.6788$ [y: alan/R_t; x: konsantrasyon (µg/mL)] olarak bulunmuştur (**Şekil 5.1**). ICH Q2(R1) Analitik Yöntemlerin Validasyonu dokümanında doğrusallık çalışması için korelasyon katsayısı, y-kesim, eğim, artık kareler toplamı (residual sum of squares) ve grafiğin çıktı olarak sunulması gerektiği belirtilmiştir. Artık kareler toplamı ortalama değerler için 3.8624 olarak hesaplanmış ve pool edilen değerler için de 21.1956 olarak bulunmuştur. Bu durum pool edilen verilerin az da olsa ortalamaya göre doğrusallıktan saptığını göstermektedir (ICH, 1996).

Çizelge 5.4. Doğrusallık hesabı için 3 seriden elde edilen ortalama Alan/R_t değerleri

Konst (µg/mL)	Seri 1	Seri 2	Seri 3	Ort (n=3)
10.000	13.7498	13.9242	13.8896	13.8545
20.000	29.8140	28.0588	28.1390	28.6706
40.000	56.4355	56.0551	56.1245	56.2051
60.000	84.9990	84.7738	84.5814	84.7847
80.000	113.3160	112.5961	112.7312	112.8811
100.000	143.1436	142.5688	146.0965	143.9363



Şekil 5.1. Arbutin etkin maddesi için oluşturulan doğru denklemi
($n=3 \pm SH$)

Yapılan çalışmalardan da görüldüğü gibi doğrusallık için 10-100 µg/mL konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Doğrusallık çalışmasını özetleyen regresyon

istatistiği sonuçları **Çizelge 5.5**'da sunulmuştur. Elde edilen doğru denklemi arbutin etkin maddesinin miktar tayini çalışmalarında kullanılmıştır.

Çizelge 5.5. Doğrusallık çalışması regresyon istatistiği sonuçları

Parametre	Ortalama	Pool
Korelasyon katsayısı (R)	0.9998	0.9997
Determinasyon katsayısı (R ²)	0.9997	0.9994
Ölçüm sayısı	6	18
Artık kareler toplamı	3.8624	21.1956
Kesişim		-0.6788
Eğim		1.4336

5.1.2. Kesinlik (Precision)

Yöntemin tekrar edilebilirliğini göstermek için 3 farklı konsantrasyonda (40, 60 ve 80 µg/mL) arbutin içeren örnek hazırlanmış ve her bir konsantrasyon için 3 ölçüm tekrarı yapılmıştır. Yöntemin tekrar üretilebilirliği için de, aynı seriler farklı günlerde tekrar hazırlanmış; sonuçlar, SS ve BSS olarak verilmiştir.

5.1.2.1. Tekrar edilebilirlik (Repeatability)

Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen veriler aşağıdaki **Çizelge 5.6**'da özetlenmiştir. Bağlı standart sapma (BSS) ve %95 Güven Aralığı (CI, *confidence interval*) hesaplamaları için kullanılan formüller aşağıdaki gibidir:

$$BSS = \text{Varyasyon Katsayısı} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100 \quad (2)$$

$$CI (\%95) = t \text{ skoru} \times \left(\frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Deney Sayısının Karekökü}} \right) \quad (3)$$

Elde edilen sonuçlar ICH'e göre değerlendirildiğinde BSS %2'nin altında olduğu için kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır (ICH, 1996).

Çizelge 5.6. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 1. gün (n=3)

Gün 1	Alan	R _t	Alan/R _t	Konst (µg/mL)
40 µg/mL	163.2991	2.9170	55.9819	39.5243
	163.2719	2.9160	55.9917	39.5312
	163.3895	2.9160	56.0321	39.5593
60 µg/mL	246.7210	2.9180	84.5514	59.4533
	246.3564	2.9150	84.5133	59.4268
	246.2555	2.9140	84.5077	59.4229
80 µg/mL	329.3441	2.9060	113.3325	79.5299
	329.6957	2.9070	113.4144	79.5870
	329.0660	2.9110	113.0423	79.3275

5.1.2.2. Ara ürün kesinliği (Intermediate precision)

Ara ürün kesinliği için aynı üç konsantrasyon ile tekrar çalışılmıştır. Çalışma tekrar edilebilirlik (repeatability) ile aynı konsantrasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Bunun sebebi daha sonra gün-içi ve günler-arası olmak üzere sonuçların ayrı ayrı değerlendirilmesi gerekliliğindendir. Elde edilen sonuçlar MS Excel kullanılarak hesaplanmış ve özet sonuçları içeren **Çizelge 5.7** ve **Çizelge 5.8** hazırlanmıştır.

Çizelge 5.7. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 2. gün (n=3)

Gün 2	Alan	R _t	Alan/R _t	Konst (µg/mL)
40 µg/mL	165.8332	2.9200	56.7922	40.0896
	163.6026	2.9180	56.0667	39.5835
	162.8448	2.9150	55.8644	39.4424
60 µg/mL	246.0202	2.9160	84.3691	59.3261
	246.6024	2.9170	84.5397	59.4452
	245.4456	2.9180	84.1143	59.1484
80 µg/mL	328.9033	2.9110	112.9864	79.2885
	328.1463	2.9050	112.9591	79.2695
	328.6977	2.9060	113.1100	79.3747

Çizelge 5.8. Üç farklı konsantrasyonda tekrar edilebilirlik çalışması 3. gün (n=3)

Gün 3	Alan	R _t	Alan/R _t	Konst (µg/mL)
40 µg/mL	163.1700	2.9160	55.9568	39.5068
	163.0780	2.9170	55.9061	39.4714
	163.8259	2.9160	56.1817	39.6637
60 µg/mL	246.1090	2.9140	84.4574	59.3878
	246.6314	2.9110	84.7240	59.5737
	246.9293	2.9070	84.9430	59.7265
80 µg/mL	328.6875	2.9100	112.9510	79.2638
	328.4848	2.9080	112.9590	79.2694
	328.8423	2.9080	113.0819	79.3551

Elde edilen sonuçlar ICH'e göre değerlendirildiğinde BSS %2'nin altında olduğu için kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır. MS Excel programının yetersiz kaldığı bazı istatistiksel işlemler için ayrıca GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplamalar yapılmıştır. Bu yapılan hesaplamalar **Çizelge 5.9**'da görüldüğü gibi *pool* edilmiş (harmanlanmış) sonuçların değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Analitik yöntemin kesinliği ile ilgili tekrar edilebilirlik (gün-içi) ve tekrar üretilebilirlik (günler-arası) kesinlik sonuçlarının değerlendirildiği üç farklı konsantrasyonda yapılan ölçümlerde BSS %2'nin altında bulunmuş ve yöntemin kesinliği kanıtlanmıştır.

Çizelge 5.9. Kesinlik sonuçlarının raporlanması

Gün-içi				Günler-arası*
40 µg/mL	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
Ort	39.5383	39.7052	39.5473	39.5969
SS	0.0185	0.3403	0.1023	0.1956
BSS	0.0469	0.8571	0.2588	0.4940
CI (%95)	0.0461	0.8454	0.2542	0.1504
Gün-içi				Günler-arası*
60 µg/mL	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
Ort	59.4343	59.3066	59.5626	59.4345
SS	0.0166	0.1493	0.1696	0.1585
BSS	0.0279	0.2518	0.2848	0.2667
CI (%95)	0.0412	0.3710	0.4214	0.1219
Gün-içi				Günler-arası*
80 µg/mL	1. Gün	2. Gün	3. Gün	
Ort	79.4815	79.3109	79.2961	79.3628
SS	0.1364	0.0561	0.0512	0.1185
BSS	0.1716	0.0707	0.0646	0.1494
CI (%95)	0.3388	0.1393	0.1272	0.0911

*GraphPad programı kullanılmıştır.

5.1.3. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk çalışması için çalışma aralığı (10-100 µg/mL) içinde 40, 60 ve 80 µg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda arbutin içeren örnekler hazırlanmıştır. Analiz sonucunda bulunan yüzde geri kazanım değerlerinin %98-102 aralığında olması gerekmektedir. Elde edilen değerler ile yöntem geri kazanım yüzde değerleri değerlendirilmiştir (**Çizelge 5.10-5.12**).

Çizelge 5.10. 40 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

40 µg/mL	1	2	3
Alan	170.2620	164.0663	168.5458
R _t	2.9190	2.9180	2.9180
Alan/Rt	58.3289	56.2256	57.7607
Konst (µg/mL)	41.1615	39.6943	40.7652
% geri kazanım	102.9037	99.2358	101.9130
% geri kazanım ort.		101.3508	
% fark		1.3508	
SS		0.7590	
BSS		1.8722	
SH		0.4382	
CI (%95)		1.8854	

Çizelge 5.11. 60 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

60 µg/mL	1	2	3
Alan	254.1762	248.0609	246.7764
R _t	2.9180	2.9180	2.9160
Alan/Rt	87.1063	85.0106	84.6284
Konst (µg/mL)	61.2355	59.7736	59.5070
% geri kazanım	102.0592	99.6227	99.1784
% geri kazanım ort.		100.2868	
% fark		0.2868	
SS		0.9306	
BSS		1.5465	
SH		0.5373	
CI (%95)		2.3117	

Çizelge 5.12. 80 µg/mL konsantrasyon için doğruluk çalışması (n=3)

80 µg/mL	1	2	3
Alan	329.0087	329.3044	329.1252
R _t	2.9170	2.9180	2.9170
Alan/Rt	112.7901	112.8528	112.8300
Konst (µg/mL)	79.1515	79.1953	79.1794
% geri kazanım	98.9394	98.9941	98.9742
% geri kazanım ort.		98.9693	
% fark		1.0307	
SS		0.0221	
BSS		0.0280	
SH		0.0128	
CI (%95)		0.0550	

Gerekli hesaplamalar için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

$$BSS = \text{Varyasyon Katsayısı} = \frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Ortalama}} \times 100 \quad (1)$$

$$CI (\%95) = t \text{ skoru} \times \left(\frac{\text{Standart Sapma}}{\text{Deney Sayısının Karekökü}} \right) \quad (2)$$

Elde edilen çizelgelerin özeti **Çizelge 5.13**'de verilmiştir. Kabul limiti geri kazanım değerinin $\pm\%2$ çıkmasıdır ve sonuçlara göre yöntem iyi geri kazanım göstermiştir.

Çizelge 5.13. Doğruluk çalışması özet sonuçları

	40 µg/mL	60 µg/mL	80 µg/mL
% geri kazanım ort.	101.3508	100.2868	98.9693
% fark	1.3508	0.2868	1.0307
CI (%95)	1.8854	2.3117	0.0550

5.1.4. Duyarlılık (Sensitivity)

Yöntemin duyarlılığı için doğrusallık çalışmalarında bulunan regresyon doğrusunun y-kesişim değerinin standart sapması kullanılmıştır. Elde edilen LOD ve LOQ değerleri **Çizelge 5.14**'te sunulan verilere göre hesaplanmıştır.

Çizelge 5.14. 10-100 µg/mL konsantrasyon aralığındaki doğrusallık çalışması sonucu

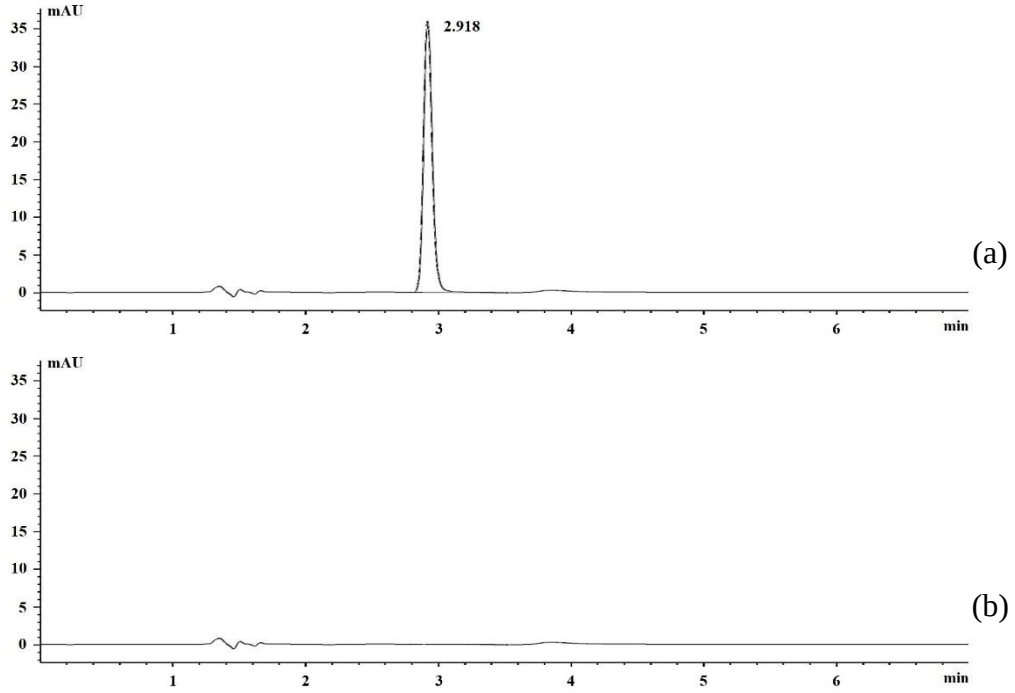
	Katsayı	SS
y-kesişim	-0.6788	0.7646
y-kesişim pool*	-0.6788	0.5171
x değeri	1.4336	0.0126

*GraphPad programı kullanılmıştır.

Sırası ile LOD, LOQ, LOD pool ve LOQ pool değerleri 1.7601 µg/mL, 5.3337 µg/mL, 1.1903 µg/mL ve 3.6069 µg/mL olarak bulunmuştur.

5.1.5. Seçicilik (Specificity)

Yöntemin seçiciliği plasebo analizleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışma için, arbutin dışında formülasyondaki diğer bütün bileşenleri içeren plasebo formülasyonlar hazırlanmıştır.



Şekil 5.2. Arbutin içeren formülasyon (a) ve plasebo formülasyon (b)

Örnekler miktar tayini çalışmasında kullanılan işlem basamaklarından geçirilmiş, elde edilen kromatogramlardan formülasyondaki diğer bileşenlerin girişiminin arbutinin seçiciliğine etkisi değerlendirilmiştir. Yapılan çalışma sonucunda yöntemin seçici olduğu bulunmuştur (Şekil 5.2).

5.2. Formülasyonlar Üzerinde Yapılan Karakterizasyon Çalışmaları

Etkin maddeli ve etkin maddesiz krem olarak taze hazırlanmış formülasyonlarda yapılan karakterizasyon çalışmalarının sonuçları bu bölümde tartışılmıştır. Formülasyonlar üzerinde yapılan incelemeler; organoleptik kontroller, faz ayrımı ve santrifüj uygulanması, pH analizi, termal analiz, reolojik analiz, etkin madde miktar tayini olarak sıralanabilir. Tüm karakterizasyon çalışmaları **Yöntemler** kısmında ifade edildiği gibi yapılmıştır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çizelgeler halinde gösterilmiştir.

5.2.1. Organoleptik Kontroller

Taze olarak hazırlanan krem formülasyonlarının $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığındaki organoleptik değerlendirmeler sonucunda elde edilen sonuçlar aşağıda görülmektedir. **Çizelge 5.15'**de belirtilen faz ayrışması krem formülasyonlarının hazırlanmasından 1 saat sonra incelenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarının içerisinde geçen **faz ayrımı ve santrifüj uygulanması** ile karıştırılmamalıdır.

Çizelge 5.15. Karakterizasyon çalışmaları- organoleptik kontroller

Organoleptik Kontroller	25°C 0. Zaman	
	Etkin Maddesiz	Etkin Maddeli
Genel Görünüm	homojen görünüm	homojen görünüm
Kıvam	iyi ve uygun kıvam	iyi ve uygun kıvam
Faz Ayrışması	faz ayrışması yok	faz ayrışması yok
Koku	rahatsız edici koku yok	rahatsız edici koku yok
Renk	beyaz renk	beyaz renk

5.2.2. Faz ayrımı ve santrifüj uygulanması

Organoleptik kontrollerdeki faz ayrımına ek olarak ortam şartları zorlandığı zaman krem formülasyonunda meydana gelebilecek olası değişimler incelenmiştir. Faz ayrımının oluşmasını değerlendirmek için taze hazırlanan formülasyonlar 500 ve 1000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek görsel olarak incelenmiştir ve hiçbir formülasyonda faz ayrımı tespit edilememiştir. Ayrıca formülasyon iki gün boyunca -20 °C de bekletilmiş ve sonrasında oda sıcaklığında çözündürülerek fiziksel durumu görsel olarak incelenmiştir ve herhangi bir bozunma tespit edilmemiş ve ilk hazırlandığı hale geri dönmüştür.

5.2.3. pH analizi

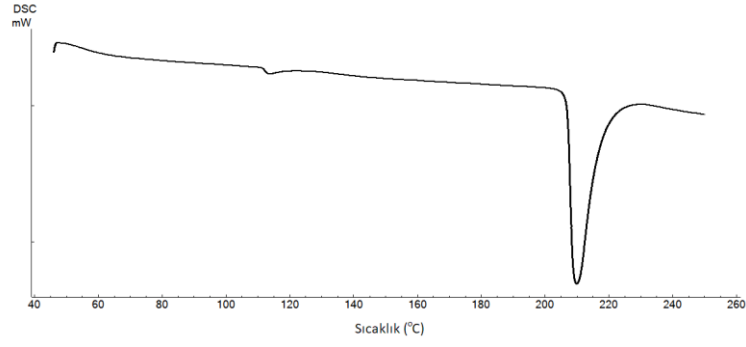
Taze olarak hazırlanan etkin maddeli krem formülasyonlarının pH ölçümleri pH metre ile yapılmış ve ortalama pH, standart sapma (SS), standart hata (SH) değerleri ile birlikte **Çizelge 5.16'**da sunulmuştur.

Çizelge 5.16. Etkin maddeli formülasyonun sıfırıncı zaman pH değerleri

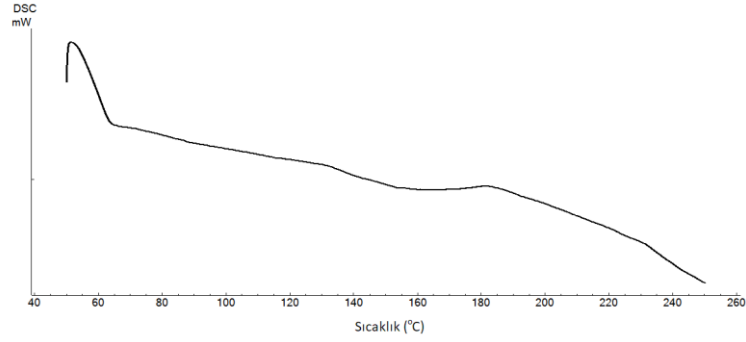
Ölçüm	pH	Ort	SS	SH
1	8.900			
2	8.750	8.833	0.076	0.044
3	8.850			

5.2.4. Termal analiz

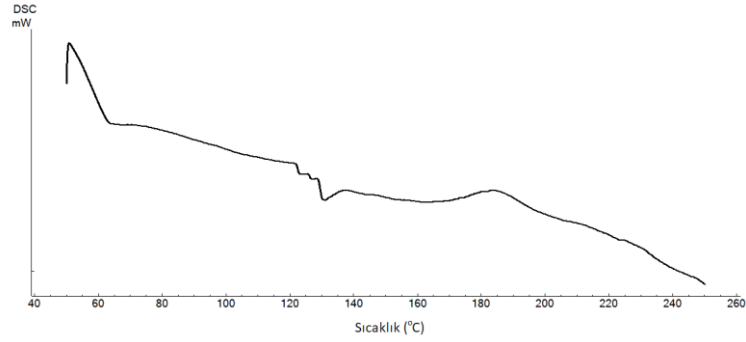
Arbutin ve taze olarak hazırlanan formülasyonların diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) termogramları **Şekil 5.3-5.5'**de sunulmuştur.



Şekil 5.3. Arbutin etkin maddesinin termogramı



Şekil 5.4. Plasebo krem formülasyonunun termogramı



Şekil 5.5. Arbutin içeren krem formülasyonunun termogramı

Hem arbutinin hem de arbutin içeren krem formülasyonu stabilitesinin incelenmesi için termal analiz faydalı bilgiler sunmaktadır. DSC analizi sonucu etkin maddeli krem formülasyonlarında arbutinin yaklaşık 210°C’de gözlenen keskin endotermik pikinin kaybolduğu gözlenmiştir (Şekil 5.5). Etkin madde pikinin tamamen kaybolması arbutinin krem formülasyonun içerisinde çözünerek homojen dağılmış olduğunu ve amorf yapı elde edildiğini göstermektedir (Pagar ve Vavia, 2013).

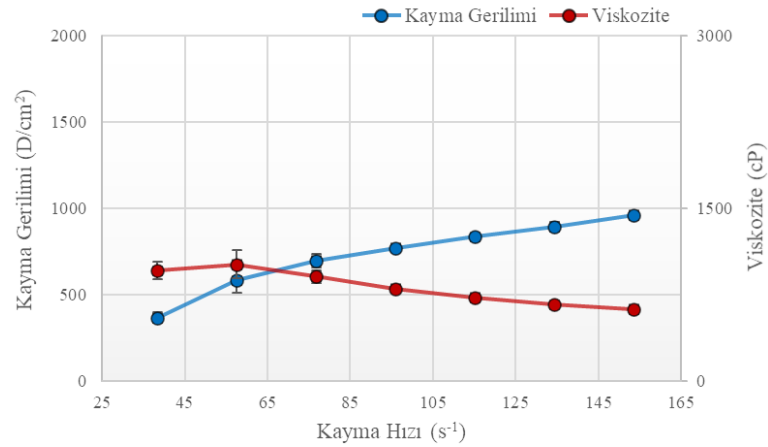
5.2.5. Reolojik analiz

Newton akışı ve Newton olmayan akış farmasötik alanda geçerli olan akış tiplerindendir. Kayma hızındaki değişimle birlikte viskozite değişmez ise veya kayma

hızı ile kayma gerilimi arasında doğrusal korelasyon varsa bu Newton akış olarak adlandırılırken, kayma hızındaki artış ile viskozitesi değişen sistemler Newtonian olmayan akış olarak anılırlar. Mikro emülsiyonlar, su, çok seyreltik emülsiyonlar Newtonian akışa örnektirler (Yazan, 2002). Akış tipi belirlenmesinde taze olarak hazırlanan ve Arbutin içeren formülasyonların reolojik davranışı analiz edilirken Brookfield koni-plak reometresi kullanılmıştır ve ölçümler $25\pm1^\circ\text{C}$ oda sıcaklığında yapılmıştır. Arbutin içeren krem formülasyonlarında reolojik analiz sonucunda elde edilen reogramlar **Çizelge 5.17** ve **Şekil 5.6**'da verilmiştir.

Çizelge 5.17. Arbutin içeren krem formülasyonunun reolojik analizi ($n=3$)

Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)
959.66	10.00	368.51	38.40	24.45
1013.74	15.00	583.91	57.60	24.45
908.74	20.00	697.91	76.80	24.45
805.01	25.00	772.81	96.00	24.45
725.49	30.00	835.77	115.20	24.45
665.25	35.00	894.09	134.40	24.45
625.67	40.00	961.04	153.60	24.45



Şekil 5.6. Arbutin içeren krem formülasyonunun reogramı ($n=3\pm SH$)

Yapılan reolojik analizler sonucunda kayma hızındaki artış ile viskozitede az miktarda da olsa bir düşüş görülmektedir. **Şekil 5.6**'da verilen reogramda akışın başlaması için bir eşik değerine ihtiyaç olup olmadığı bilinmediği için, taze hazırlanmış olan krem formülasyonunun emülsiyon sistemlerinin çoğunda görülen psödoplastik akışa uyduğu sonucuna varılabilir (Yazan, 2002).

5.2.6. Etkin madde miktar tayini

Taze olarak hazırlanan 20 g formülasyondan 200 mg tam olarak tartılmış 10 mL metanol:su (10:90, h/h) karışımı kullanılarak 40 mL'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm selüloz asetat membrandan süzülerek UPLC ile analiz edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmış; geri kazanım çalışmasına benzer olan sonuçlarla birlikte SS ve SH değerleri verilmiştir. Yapılan bu çalışma ile sıfırıncı zamanda krem formülasyonların içerisinde %1 oranında arbutin olduğu gösterilmiştir. Formülasyon hazırlanırken 20 g krem formülasyonunun içerisine 200 mg etkin madde konulmuştur.

Çizelge 5.18. Taze hazırlanan krem formülasyonlarında arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	177.3251	176.8249	175.6582
R _t	2.4630	2.4630	2.4630
Alan/R _t	71.9956	71.7925	71.3188
Konst (µg/mL)	50.6936	50.5520	50.2215
Toplam miktar (mg)	202.7745	202.2078	200.8862
Ort miktar (mg)		201.9562	
SS		0.9690	
SH		0.5594	

5.3. Stabilité Testleri

Tüm organoleptik değerlendirmeler **Yöntemler** kısmında ifade edildiği gibi yapılmıştır. Hazırlanan krem formülasyonları kapalı kavanozlar içerisinde 4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C kararlılık ortamlarında üç ay boyunca saklanılarak fiziksel özellikleri ve olası değişimler incelenerek değerlendirilmiştir. Formülasyonlar üzerinde sıfırıncı zaman, 1. ay, 2. ay ve 3. ay zaman aralıklarında organoleptik değerlendirmeler, termal analiz, pH ölçüm çalışmaları, viskozite ölçümü, etkin madde miktar tayini testleri gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar çizelgeler halinde gösterilmiştir.

5.3.1. Organoleptik kontroller

4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C'lik ortam koşullarında saklanan krem formülasyonlarının genel görünüşü, kıvamı, renk, koku, faz ayrışması gibi özelliklerindeki değişimler belirli zaman aralıklarında (sıfırıncı zaman, 30., 60 ve 90. günler) organoleptik olarak incelenmiştir. Takip edilen her bir parametrenin sonucu ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

Çizelge 5.19. *Stabilite testleri- organoleptik kontroller / genel görünüş*

Sıcaklık	Gün	Genel Görünüş
4±1°C	0. zaman	Homojen
25±1°C	0. zaman	Homojen
40±1°C	0. zaman	Homojen
4±1°C	30. gün	Homojen
25±1°C	30. gün	Homojen
40±1°C	30. gün	Homojen
4±1°C	60. gün	Homojen
25±1°C	60. gün	Homojen
40±1°C	60. gün	Heterojen
4±1°C	90. gün	Homojen
25±1°C	90. gün	Homojen
40±1°C	90. gün	Heterojen

4±1°C ve 25±1°C'de saklanan numunelerde kremlerin genel görünüşleri incelenmiş ve sıfıncı zaman, 30., 60 ve 90. günlerde homojen görünüş açısından herhangi bir sorun gerçekleşmemiştir. 40±1°C'de saklanan formülasyonlarda ise 60. gün itibarı ile homojen yapı bozulmuş ve heterojen yapı ortaya çıkmıştır. Elde edilen sonuçların hepsi **Çizelge 5.19'**da sunulmuştur.

Çizelge 5.20. *Stabilite testleri- organoleptik kontroller / kıvam*

Sıcaklık	Gün	Kıvam
4±1°C	0. zaman	İyi
25±1°C	0. zaman	İyi
40±1°C	0. zaman	İyi
4±1°C	30. gün	İyi
25±1°C	30. gün	İyi
40±1°C	30. gün	İyi
4±1°C	60. gün	İyi
25±1°C	60. gün	İyi
40±1°C	60. gün	Tamamen bozulmuş
4±1°C	90. gün	İyi
25±1°C	90. gün	İyi
40±1°C	90. gün	Tamamen bozulmuş

Çizelge 5.20'de elde edilen bulgulara göre, 4±1°C ve 25±1°C'de saklanan krem formülasyonlarında kıvam açısından sıfıncı zaman, 30., 60 ve 90. günlerde herhangi bir sorun gerçekleşmemiştir. 40±1°C'de saklanan krem formülasyonlarında ise 60. gün itibarı ile kıvamın tamamen bozulduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 5.21. *Stabilite testleri- organoleptik kontroller / faz ayrışması*

Sıcaklık	Gün	Faz Ayrışması
4±1°C	0. zaman	Faz ayrışması yok
25±1°C	0. zaman	Faz ayrışması yok
40±1°C	0. zaman	Faz ayrışması yok
4±1°C	30. gün	Faz ayrışması yok
25±1°C	30. gün	Faz ayrışması yok
40±1°C	30. gün	Faz ayrışması yok
4±1°C	60. gün	Faz ayrışması yok
25±1°C	60. gün	Faz ayrışması yok
40±1°C	60. gün	Hafif faz ayrışması var
4±1°C	90. gün	Faz ayrışması yok
25±1°C	90. gün	Faz ayrışması yok
40±1°C	90. gün	Yoğun faz ayrışması var

Çizelge 5.21'de elde edilen bulgulara göre, 4±1°C, 25±1°C'de saklanan krem formülasyonlarında faz ayrışması açısından sıfırinci zaman, 30., 60 ve 90. günlerde herhangi bir sorun gerçekleşmemiştir. 40±1°C'de saklanan formülasyonlarda ise 60. gün itibarı ile faz ayrışması başlamıştır. **Çizelge 5.21**'de belirtilen faz ayrışması karakterizasyon çalışmalarının içerisinde geçen **faz ayrımı ve santrifüj uygulanması** ile karıştırılmamalıdır. Kremlerin stabilite testlerinde ortam koşulları zorlanmamıştır.

Çizelge 5.22. *Stabilite testleri- organoleptik kontroller / koku*

Sıcaklık	Gün	Koku
4±1°C	0. zaman	Rahatsız edici koku yok
25±1°C	0. zaman	Rahatsız edici koku yok
40±1°C	0. zaman	Rahatsız edici koku yok
4±1°C	30. gün	Rahatsız edici koku yok
25±1°C	30. gün	Rahatsız edici koku yok
40±1°C	30. gün	Rahatsız edici koku yok
4±1°C	60. gün	Rahatsız edici koku yok
25±1°C	60. gün	Rahatsız edici koku yok
40±1°C	60. gün	Hafif rahatsız edici koku var
4±1°C	90. gün	Rahatsız edici koku yok
25±1°C	90. gün	Rahatsız edici koku yok
40±1°C	90. gün	Yoğun rahatsız edici koku var

Çizelge 5.22'de elde edilen bulgulara göre, 4±1°C, 25±1°C'de saklanan krem formülasyonlarında yer alan gül hidrolatının kokusu sıfırinci zaman, 30., 60 ve 90. günlerde net olarak fark edilmiştir. 40±1°C'de saklanan krem formülasyonlarında ise 60. gün itibarı ile hem koku azalması hem de hafif rahatsız edici başka bir koku hissedilmiştir.

Bu durum $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan krem formülasyonlarında 90. gün itibarı ile çok daha yoğun ve rahatsız edici bir duruma gelmiştir.

Çizelge 5.23. *Stabilite testleri- organoleptik kontroller / renk*

Sıcaklık	Gün	Renk
$4\pm1^{\circ}\text{C}$	0. zaman	Beyaz
$25\pm1^{\circ}\text{C}$	0. zaman	Beyaz
$40\pm1^{\circ}\text{C}$	0. zaman	Beyaz
$4\pm1^{\circ}\text{C}$	30. gün	Beyaz
$25\pm1^{\circ}\text{C}$	30. gün	Beyaz
$40\pm1^{\circ}\text{C}$	30. gün	Beyaz
$4\pm1^{\circ}\text{C}$	60. gün	Beyaz
$25\pm1^{\circ}\text{C}$	60. gün	Beyaz
$40\pm1^{\circ}\text{C}$	60. gün	Sarı
$4\pm1^{\circ}\text{C}$	90. gün	Beyaz
$25\pm1^{\circ}\text{C}$	90. gün	Beyaz
$40\pm1^{\circ}\text{C}$	90. gün	Sarı

Çizelge 5.23'te elde edilen bulgulara göre, $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan krem formülasyonlarında beyaz renk 1., 30., 60 ve 90. günlerde net olarak sabit kalmıştır. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan numunede ise 60. gün itibarı ile renk değişimi gözlemlenmiş ve sararma gerçekleşmiştir.

Elde edilen bulgulara göre, $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan numunelerde genel görünüş, renk koku ve faz ayrışması olarak herhangi bir olumsuzluk yaşanmazken, $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan numunede 60. günden itibaren genel görünüş sorunları, kıvam bozulması, faz ayrılması, koku değişimi/azalması ve renk değişimi tespit edilmiştir.

5.3.2. pH analizi

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen formülasyonların sıfıncı zaman, 30., 60. ve 90. günlere ait pH ölçümü, ortalama, SS ve SH değerleri **Çizelge 5.24-5.26**'da verilmiştir.

Çizelge 5.24. *$4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların pH değerleri*

Ölçüm	4°C 0. Zaman	4°C 1. Ay	4°C 2. Ay	4°C 3. Ay
1	8.900	8.810	8.800	8.600
2	8.750	8.960	8.850	8.920
3	8.850	8.850	8.920	8.980
Ort.	8.833	8.873	8.857	8.833
SS	0.076	0.078	0.060	0.204
SH	0.044	0.045	0.035	0.118

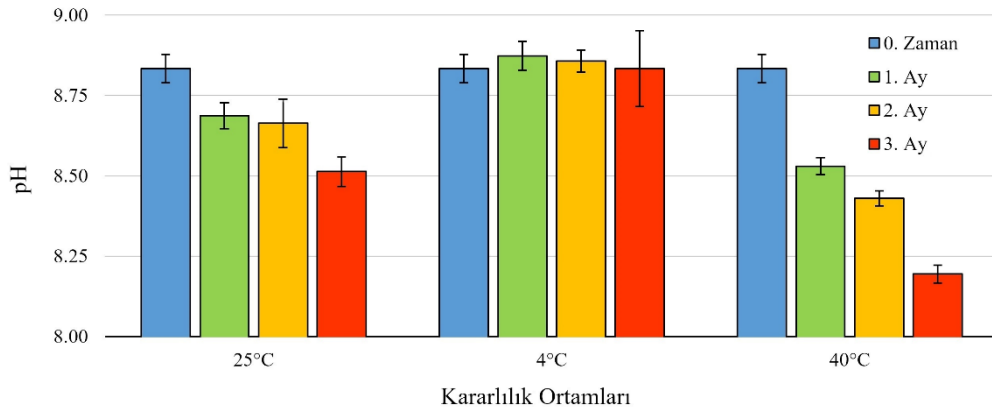
Çizelge 5.25. $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların pH değerleri

Ölçüm	25°C 0. Zaman	25°C 1. Ay	25°C 2. Ay	25°C 3. Ay
1	8.900	8.620	8.810	8.590
2	8.750	8.680	8.560	8.520
3	8.850	8.760	8.620	8.430
Ort.	8.833	8.687	8.663	8.513
SS	0.076	0.070	0.131	0.080
SH	0.044	0.041	0.075	0.046

Çizelge 5.26. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların pH değerleri

Ölçüm	40°C 0. Zaman	40°C 1. Ay	40°C 2. Ay	40°C 3. Ay
1	8.900	8.490	8.390	8.280
2	8.750	8.580	8.430	8.220
3	8.850	8.520	8.470	8.160
Ort.	8.833	8.530	8.430	8.190
SS	0.076	0.046	0.040	0.042
SH	0.044	0.026	0.023	0.024

Elde edilen pH sonuçları grafiğe (Şekil 5.7) aktarılıp SPSS (v.24) programı kullanılarak *Two Way ANOVA* yöntemiyle değerlendirilmiş ve kararlılık çalışmaları sonucu elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır.



Şekil 5.7. Farklı ortamlarda saklanan formülasyonların ortalama pH değerleri

Krem formülasyonlarının 0. zaman ölçümlerinde ortalama pH değeri 8.833 bulunmuştur. 30. gün ölçümlerinde bu değer, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.873, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.687 ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.530 bulunmuştur. Formülasyonların 60. gün ölçümlerinde ortalama pH değeri, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.857, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.663 ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık

ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.430 bulunmuştur. Formülasyonların 90. gün ölçümlerinde ortalama pH değeri, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.833, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.513 ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için 8.190 bulunmuştur.

Çizelge 5.27. Ortalama pH değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları

Formülasyonlar	p Değeri	Karar Olasılığı
F-25-0Z / F-25-1A	0.160	$p>0.05$
F-25-0Z / F-25-2A	0.055	$p>0.05$
F-25-0Z / F-25-3A	0.028	$p\leq 0.05$
F-4-0Z / F-4-1A	0.203	$p>0.05$
F-4-0Z / F-4-2A	0.744	$p>0.05$
F-4-0Z / F-4-3A	1.000	$p>0.05$
F-40-0Z / F-40-1A	0.050	$p\leq 0.05$
F-40-0Z / F-40-2A	0.019	$p\leq 0.05$
F-40-0Z / F-40-3A	0.006	$p\leq 0.01$

Krem formülasyonların 0. zaman ve 90. gün pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için **önemli fark** ($p\leq 0.05$) ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için **çok önemli fark** ($p\leq 0.01$) bulunmasına rağmen, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlarda pH değişimi için **önemli fark yoktur** ($p>0.05$) şeklinde değerlendirilmiştir. Zamana karşı değişimi inceleyebilmek için formülasyonların pH değerlerinin aylar arası karşılaştırmalı istatistik sonuçları **Çizelge 5.27**'de gösterilmiştir.

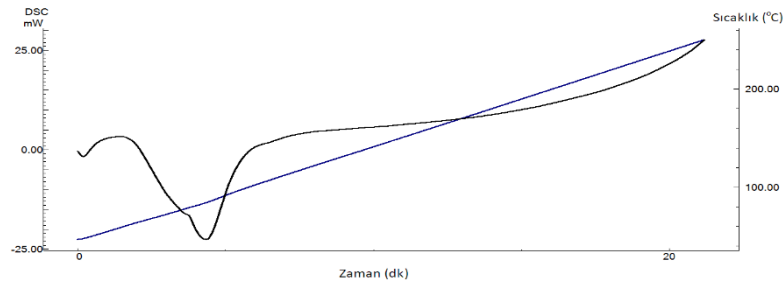
Bir karşılaştırmada istatistiksel olarak “önemli/anlamlı fark vardır” kararı verileceği zaman, yapılacak olası hata miktarını p değeri gösterir. Ünlü istatistikçi Fisher tarafından hatanın maksimum kabul edilebilir düzeyi 0.05 olarak önerilmiş ve kabul görmüştür. Bulunan p değeri 0.05'in altında ise karşılaştırma sonucunda önemli farklılık olduğu anlamına gelir. Genellikle bütün programlar p değeri ifadesini kullanırken, SPSS programında p değeri yerine *Sig.* kısaltması kullanılır. Yapılan istatistiksel çalışmaların karar olasılığı ve değerlendirme sonuçları için **Çizelge 5.28**'deki bilgiler kullanılmıştır (Krikwood ve Sterne, 2003)

Çizelge 5.28. *Two way ANOVA değerlendirme tablosu*

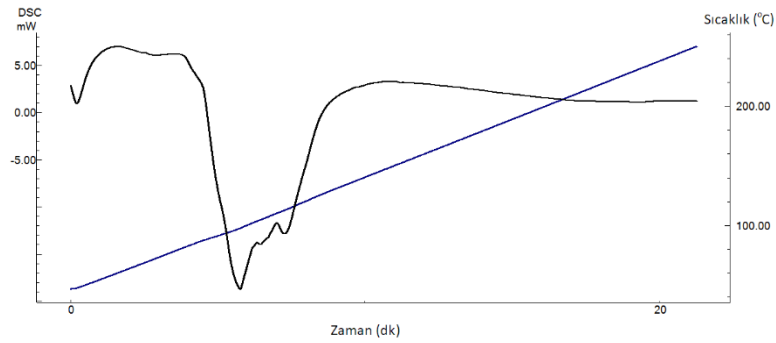
Karar Olasılığı	Karar
$p > 0.05$	Önemli fark yoktur
$p \leq 0.05$	Önemli fark vardır
$p \leq 0.01$	Çok önemli fark vardır
$p \leq 0.001$	İleri düzeyde önemli fark vardır

5.3.3. Termal analiz

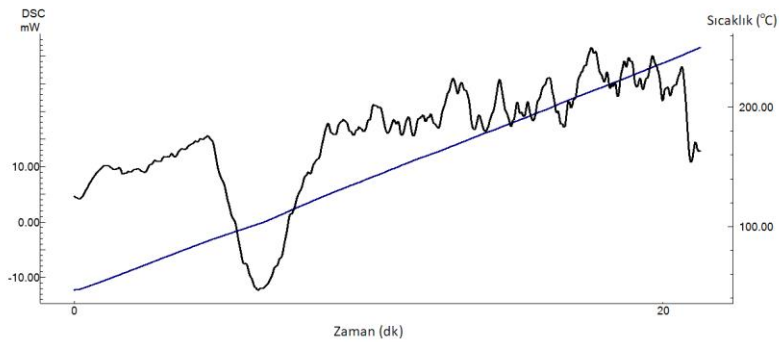
$4 \pm 1^\circ\text{C}$, $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ve $40 \pm 1^\circ\text{C}$ olmak üzere üç farklı kararlılık ortamında bekletilen krem formülasyonlarının 30., 60. ve 90. günlere ait termal analizinde DSC kullanılmış ve Şekil 5.8-5.16’da sunulan termogramlar elde edilmiştir.



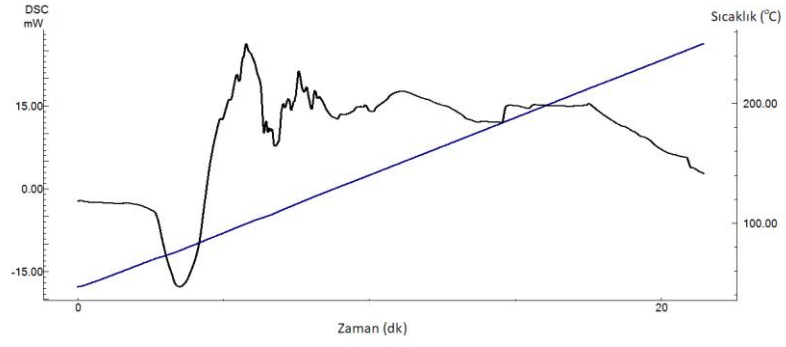
Şekil 5.8. $4 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay termogramı



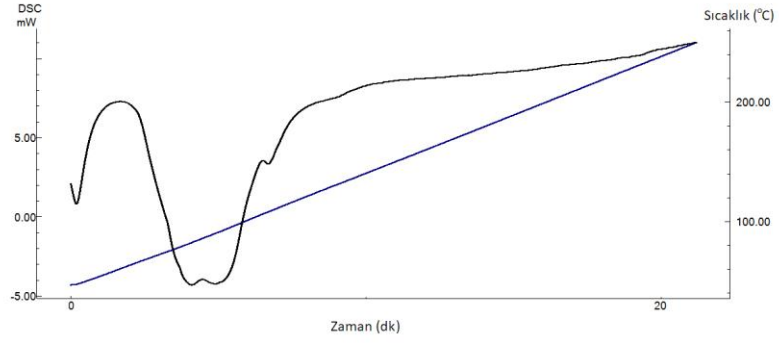
Şekil 5.9. $4 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay termogramı



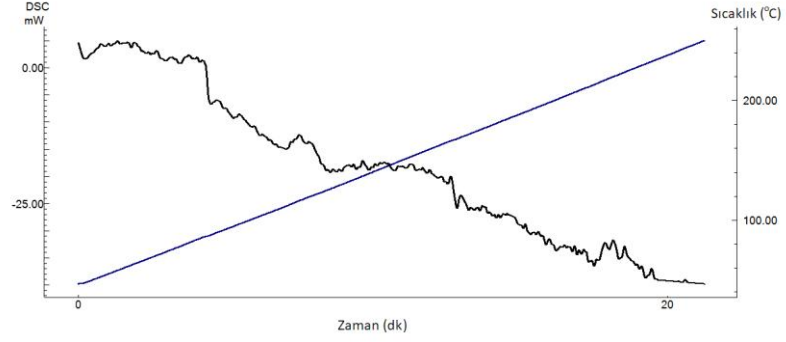
Şekil 5.10. $4 \pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay termogramı



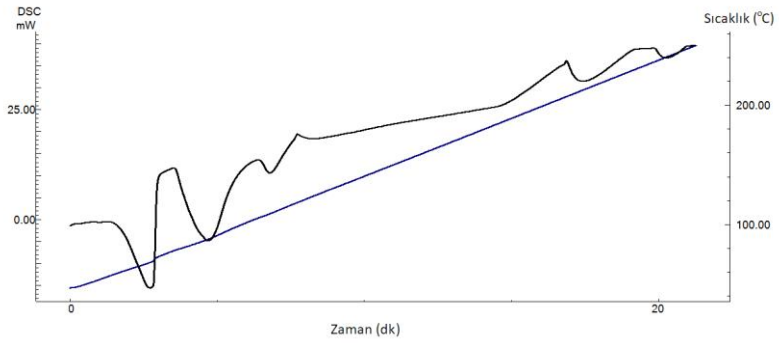
Şekil 5.11. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay termogramı



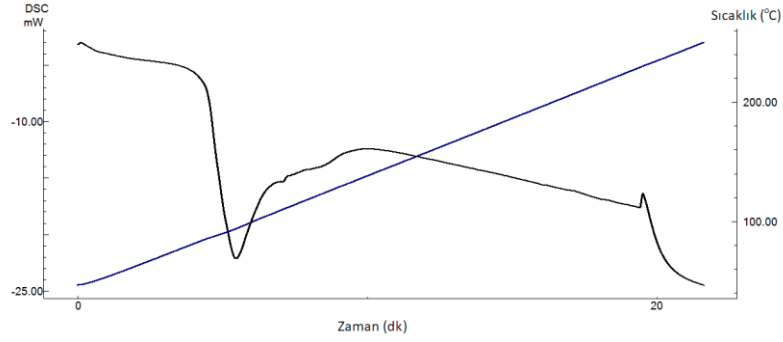
Şekil 5.12. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay termogramı



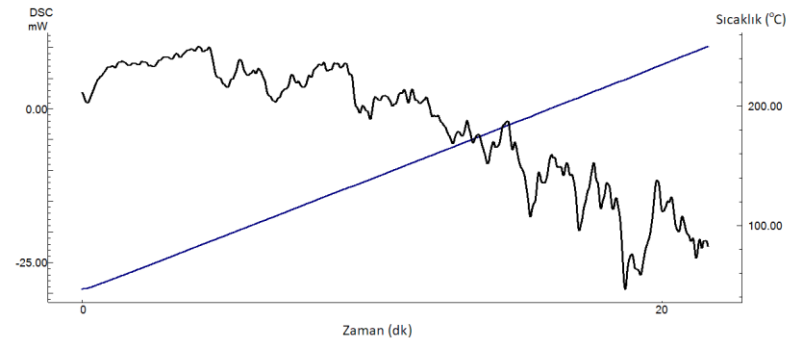
Şekil 5.13. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay termogramı



Şekil 5.14. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay termogramı



Şekil 5.15. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay termogramı



Şekil 5.16. $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay termogramı

Termal analiz, analiz edilecek maddeye kontrollü sıcaklık programı uygulandığında (artma/azalma) maddenin ve/veya reaksiyon ürünlerinin fiziksel özelliklerinin sıcaklığın bir fonksiyonu olarak ölçüldüğü bir grup yöntemi kapsamaktadır (Krikwood ve Sterne, 2003). Bu çalışmada kullanılan DSC yönteminde analiz edilecek madde (formülasyon) ve referansa (boş alüminyum hücre) ait ısı akışı arasındaki fark incelenmiştir. Diferansiyel Termal Analiz (DTA) ve DSC arasındaki en temel fark; DTA'nın sıcaklık farkını ölçerken, DSC'nin ise ısı (enerji) farkını ölçmesidir (Krikwood ve Sterne, 2003). Isınma sırasında sıcaklık artışıyla birlikte bir noktada analiz edilecek madde erimeye başlar. Erime sırasında referansın sıcaklığı artmakta iken numunenin sıcaklığı sabit kalır ve artmaz. Aradaki farkı ölçme yöntemi budur.

Analiz yapılırken alüminyum örnek kabına konulan yaklaşık 3-5 mg madde basınç yardımı ile kapağı kapatılarak, boş alüminyum örnek kabı referans alınıp, 50 mL/dk akış hızında azot gazı ve 10°C/dk sıcaklık artışı ile analiz yapılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında DSC analizi sonucu etkin maddeli formülasyonlarda arbutinin yaklaşık 210°C 'de gözlenen keskin endotermik pikinin tüm stabilite ölçümleri sırasında kaybolduğu gözlenmiştir. Etkin madde pikinin tamamen kaybolması arbutinin krem

formülasyonun içerisinde çözünerek homojen dağılmış olduğunu ve amorf yapı elde edildiğini göstermektedir. Her üç kararlılık ortamında da 90. gün sonunda bu durumun değişmediği gözlemlenmiştir. Sadece $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonunun 90. gün termogramında arbutine ait olduğu düşünülen endotermik bir pik saptanmıştır; ancak bu ortamda bekletilen krem formülasyonları üzerinde yapılan stabilite çalışmalarının hepsinde sorun olduğu için bu durum formülasyonda gerçekleşen su kaybı ve bozunma ile açıklanmıştır.

5.3.4. Reolojik analiz

$4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lik ortam koşullarında saklanan formülasyonların reolojik davranışları sıfırıncı zaman, 30., 60. ve 90. günlere analiz edilerek akış tipindeki değişimler incelenmiştir. Reolojik analiz için Brookfield koni-plak reometresi kullanılmıştır. Ölçümler, çapı 1.2 cm ve eğimi 1.565° olan koni ile $25\pm1^{\circ}\text{C}$ oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Stabilite sonuçlarına referans olması açısından karakterizasyon çalışmaları sırasında taze olarak hazırlanan krem formülasyonlarının reolojik davranışı da 30., 60. ve 90. gün analizleri ile birlikte değerlendirilmiştir. Sıfırıncı zaman reolojik analizleri sonucunda kayma hızındaki artış ile viskozitede az miktarda da olsa bir düşüş görülmüş ve psödoplastik akışa uyduğu sonucuna varılmıştır (**Şekil 5.6**).

Çizelge 5.29. $4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırıncı zaman reoloji sonuçları ($n=3$)

Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
959.66	10.00	368.51	38.40	24.45
1013.74	15.00	583.91	57.60	24.45
908.74	20.00	697.91	76.80	24.45
805.01	25.00	772.81	96.00	24.45
725.49	30.00	835.77	115.20	24.45
665.25	35.00	894.09	134.40	24.45
625.67	40.00	961.04	153.60	24.45

Çizelge 5.30. $4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 1. ay reoloji sonuçları ($n=3$)

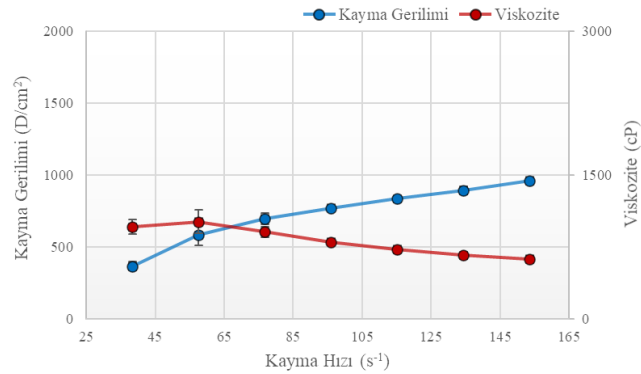
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)
466.02	10.00	178.95	38.40	24.68
415.39	15.00	239.27	57.60	24.68
407.34	20.00	312.83	76.80	24.68
417.00	25.00	400.32	96.00	24.68
406.19	30.00	467.93	115.20	24.68
392.54	35.00	527.58	134.40	24.68
376.70	40.00	578.61	153.60	24.68

Çizelge 5.31. $4\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 2. ay reoloji sonuçları ($n=3$)

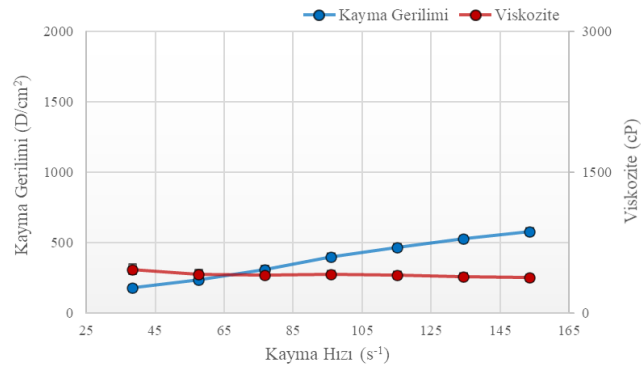
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)
585.11	10.00	224.68	38.40	24.25
571.88	15.00	329.40	57.60	24.25
583.39	20.00	448.04	76.80	24.25
586.15	25.00	562.70	96.00	24.25
545.99	30.00	628.98	115.20	24.25
516.32	35.00	693.93	134.40	24.25
499.24	40.00	766.84	153.60	24.25

Çizelge 5.32. $4\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların 3. ay reoloji sonuçları ($n=3$)

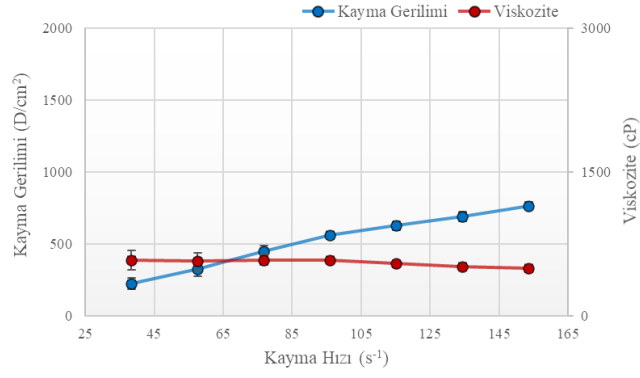
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)
888.89	10.00	341.33	38.40	24.40
848.04	15.00	488.47	57.60	24.40
846.61	20.00	650.19	76.80	24.40
838.15	25.00	804.62	96.00	24.40
807.20	30.00	929.89	115.20	24.40
767.33	35.00	1031.29	134.40	24.40
730.53	40.00	1122.09	153.60	24.40



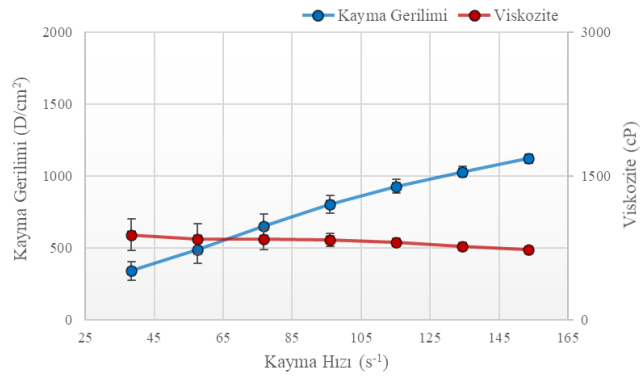
Şekil 5.17. $4\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırıncı zaman reogramı ($n=3$)



Şekil 5.18. $4\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay reogramı ($n=3$)



Şekil 5.19. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay reogramı ($n=3$)



Şekil 5.20. $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay reogramı ($n=3$)

Çizelge 5.33. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırıncı zaman reoloji sonuçları ($n=3$)

Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
959.66	10.00	368.51	38.40	24.45
1013.74	15.00	583.91	57.60	24.45
908.74	20.00	697.91	76.80	24.45
805.01	25.00	772.81	96.00	24.45
725.49	30.00	835.77	115.20	24.45
665.25	35.00	894.09	134.40	24.45
625.67	40.00	961.04	153.60	24.45

Çizelge 5.34. $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay reoloji sonuçları ($n=3$)

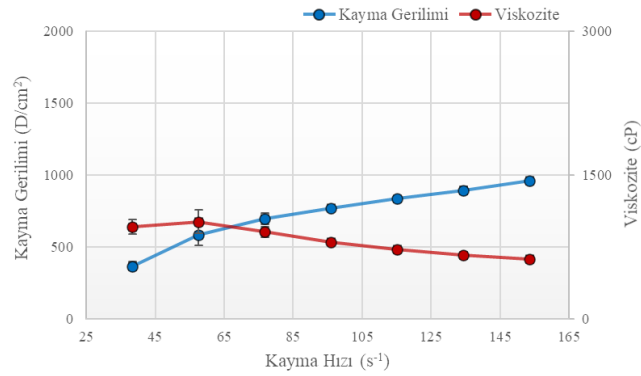
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
1758.87	10.00	675.42	38.40	24.68
1372.45	15.00	790.53	57.60	24.68
1104.90	20.00	848.56	76.80	24.68
932.80	25.00	895.49	96.00	24.68
820.93	30.00	945.71	115.20	24.68
715.29	35.00	961.36	134.40	24.68
609.74	40.00	936.57	153.60	24.68

Çizelge 5.35. $25\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay reoloji sonuçları ($n=3$)

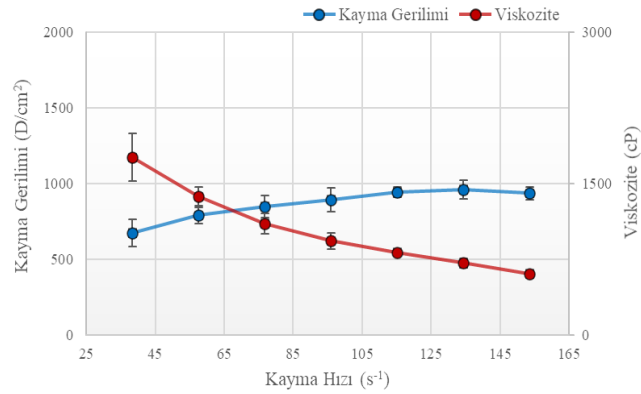
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)
1237.54	10.00	475.22	38.40	24.25
1264.58	15.00	728.40	57.60	24.25
1297.09	20.00	996.17	76.80	24.25
1128.11	25.00	1082.99	96.00	24.25
997.05	30.00	1148.60	115.20	24.25
940.92	35.00	1264.59	134.40	24.25
873.35	40.00	1341.47	153.60	24.25

Çizelge 5.36. $25\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay reoloji sonuçları ($n=3$)

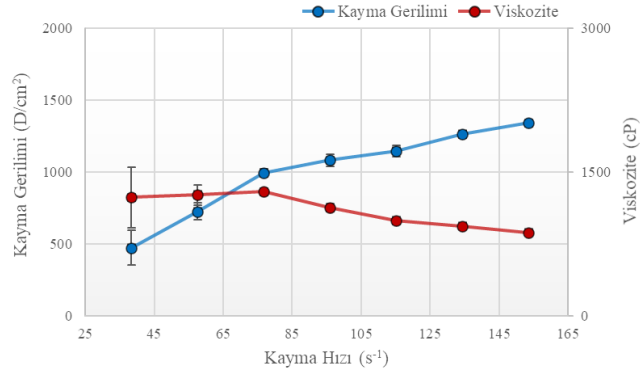
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm^2)	Kayma Hızı (s^{-1})	Sıcaklık ($^\circ\text{C}$)
1838.19	10.00	705.87	38.40	24.40
1813.45	15.00	1044.55	57.60	24.40
1668.18	20.00	1281.16	76.80	24.40
1531.31	25.00	1470.06	96.00	24.40
1421.07	30.00	1637.08	115.20	24.40
1313.24	35.00	1765.00	134.40	24.40
1207.77	40.00	1855.13	153.60	24.40



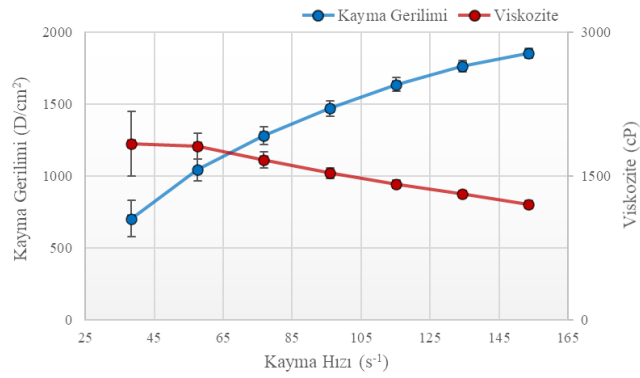
Şekil 5.21. $25\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırıncı zaman reogramı ($n=3$)



Şekil 5.22. $25\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay reogramı ($n=3$)



Şekil 5.23. 25±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay reogramı (n=3)



Şekil 5.24. 25±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay reogramı (n=3)

Çizelge 5.37. 40±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırncı zaman reoloji sonuçları (n=3)

Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
959.66	10.00	368.51	38.40	24.45
1013.74	15.00	583.91	57.60	24.45
908.74	20.00	697.91	76.80	24.45
805.01	25.00	772.81	96.00	24.45
725.49	30.00	835.77	115.20	24.45
665.25	35.00	894.09	134.40	24.45
625.67	40.00	961.04	153.60	24.45

Çizelge 5.38. 40±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay reoloji sonuçları (n=3)

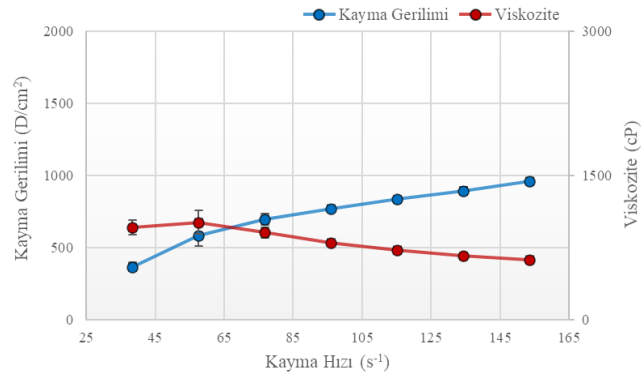
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
1945.20	10.00	746.95	38.40	24.68
1222.01	15.00	703.88	57.60	24.68
961.38	20.00	738.34	76.80	24.68
884.40	25.00	849.03	96.00	24.68
937.22	30.00	1079.68	115.20	24.68
849.19	35.00	1141.32	134.40	24.68
750.38	40.00	1152.58	153.60	24.68

Çizelge 5.39. $40\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay reoloji sonuçları ($n=3$)

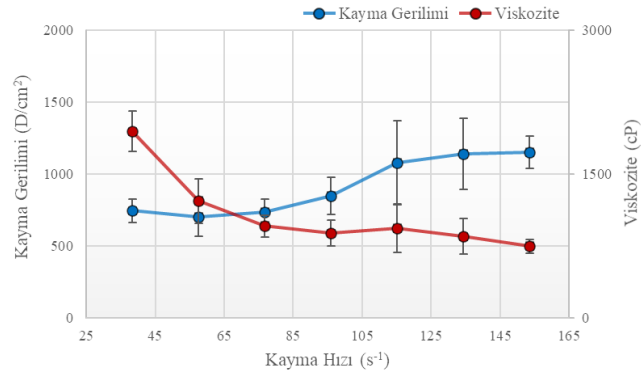
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
2015.97	10.00	774.13	38.40	24.25
1426.83	15.00	821.85	57.60	24.25
984.68	20.00	756.24	76.80	24.25
958.28	25.00	919.95	96.00	24.25
877.96	30.00	1011.41	115.20	24.25
864.48	35.00	1161.86	134.40	24.25
758.58	40.00	1165.18	153.60	24.25

Çizelge 5.40. $40\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay reoloji sonuçları ($n=3$)

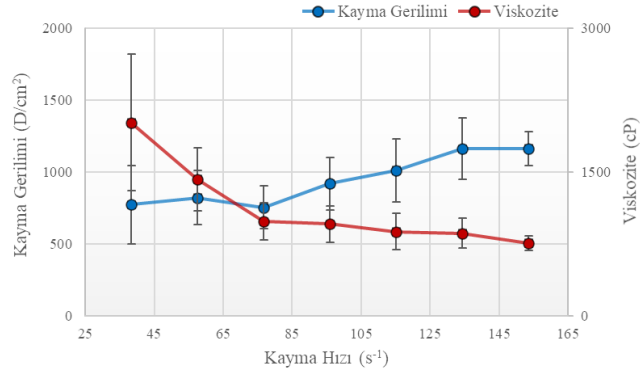
Viskozite (cP)	Hız (rpm)	Kayma Gerilimi (D/cm ²)	Kayma Hızı (s ⁻¹)	Sıcaklık (°C)
2449.19	10.00	940.49	38.40	24.40
1716.79	15.00	988.88	57.60	24.40
1484.36	20.00	1139.99	76.80	24.40
1324.88	25.00	1271.88	96.00	24.40
1232.37	30.00	1419.68	115.20	24.40
1122.39	35.00	1508.50	134.40	24.40
1127.08	40.00	1731.19	153.60	24.40



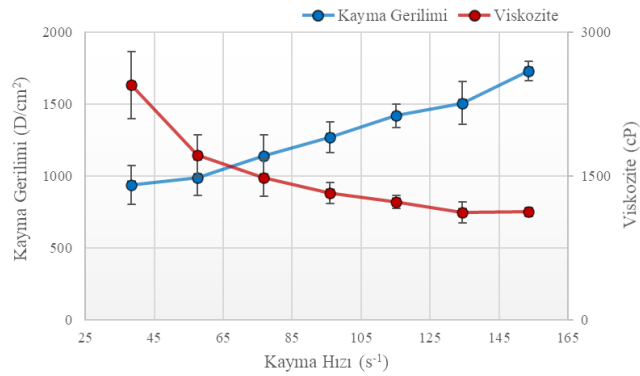
Şekil 5.25. $40\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların sıfırıncı zaman reogramı ($n=3$)



Şekil 5.26. $40\pm1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta saklanan formülasyonların birinci ay reogramı ($n=3$)



Şekil 5.27. 40±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların ikinci ay reogramı (n=3)



Şekil 5.28. 40±1°C sıcaklıkta saklanan formülasyonların üçüncü ay reogramı (n=3)

Yapılan reolojik analiz sonucunda yine diğer stabilite testleri ile paralellik gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Formülasyonların 3 aylık reogramları incelendiğinde viskozitedeki en az değişimin 4±1°C sıcaklıkta saklanan kremlerde ve daha sonra 25±1°C sıcaklıkta saklanan kremlerde olduğu görülmüştür. 40±1°C sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında ise gerçekleşen su kaybı ve bozunma ile açıklanabilecek önemli reolojik değişimler ortaya çıkmıştır. Sıfırıncı zaman reolojik analizleri sonucunda kayma hızındaki artış ile viskozitede az miktarda görülen düşüş ve psödoplastik akışa uygunluk 4±1°C ve 25±1°C sıcaklıkta saklanan kremler için 90 gün sonuna kadar devam etmiştir.

5.3.5. Etkin madde miktar tayini

Stabilite testlerinde etkin madde miktar tayini için çalışma kapsamında valide edilmiş UPLC yöntemi kullanılmıştır. 4±1°C, 25±1°C ve 40±1°C'lik ortam koşullarında saklanan 20 g krem formülasyonlarından 200 mg tam olarak tartılmış 10 mL metanol:su (10:90, h/h) karışımı kullanılarak etkin maddenin çözünmesi sağlanmış ve yine aynı karışım kullanılarak 40 mL'ye tamamlanmıştır. 0.22 µm selüloz asetat membrandan süzülerek UPLC ile analiz edilmiştir. Bu işlem üç kere tekrarlanmıştır; geri kazanım

çalışmasına benzer olan sonuçlarla birlikte SS ve SH değerleri verilmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında sıfıncı zamanda krem formülasyonların içerisinde %1 oranında arbutin olduğu gösterilmiştir. Stabilite çalışmalarında hesaplanan tüm etkin madde miktarları **Çizelge 5.41-5.50**'de ayrıntılı olarak sunulmuştur. Bu hesaplamalara ek olarak da **Çizelge 5.51**'de tüm sonuçlar bir arada karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Bilinmekte olan sıfıncı zaman konsantrasyonundaki aylık değışim önemli olduğu için sadece çizelge üzerinde karşılaştırma yapmak yeterli görülmüş, ayrıca SPSS programında p değeri hesaplanması gerekmemiştir.

Çizelge 5.41. Taze hazırlanan krem formülasyonlarında sıfıncı zaman arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	177.3251	176.8249	175.6582
R _t	2.4630	2.4630	2.4630
Alan/R _t	71.9956	71.7925	71.3188
Konst (µg/mL)	50.6936	50.5520	50.2215
Toplam miktar (mg)	202.7745	202.2078	200.8862
Ort miktar (mg)		201.9562	
SS		0.9690	
SH		0.5594	

Çizelge 5.42. 4±1°C sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 1. ay arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	177.2587	177.3861	178.0253
R _t	2.4750	2.4750	2.4750
Alan/R _t	71.6197	71.6712	71.9294
Konst (µg/mL)	50.4314	50.4673	50.6475
Toplam miktar (mg)	201.7257	201.8693	202.5899
Ort miktar (mg)		202.0616	
SS		0.4631	
SH		0.2674	

Çizelge 5.43. 4±1°C sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 2. ay arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	177.3442	177.6346	176.9425
R _t	2.4740	2.4740	2.4740
Alan/R _t	71.6832	71.8006	71.5208
Konst (µg/mL)	50.4757	50.5576	50.3625
Toplam miktar (mg)	201.9029	202.2304	201.4498
Ort miktar (mg)		201.8610	
SS		0.3920	
SH		0.2263	

Çizelge 5.44. $4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 3. ay arbutin miktar tayini ($n=3$)

Ölçüm	1	2	3
Alan	178.0448	177.7625	178.2269
R_t	2.4750	2.4750	2.4750
Alan/ R_t	71.9373	71.8232	72.0109
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	50.6530	50.5734	50.7043
Toplam miktar (mg)	202.6119	202.2936	202.8172
Ort miktar (mg)		202.5742	
SS		0.2638	
SH		0.1523	

Çizelge 5.45. $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 1. ay arbutin miktar tayini ($n=3$)

Ölçüm	1	2	3
Alan	178.1647	178.4462	177.6128
R_t	2.4730	2.4730	2.4730
Alan/ R_t	72.0440	72.1578	71.8208
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	50.7274	50.8068	50.5717
Toplam miktar (mg)	202.9095	203.2271	202.2868
Ort miktar (mg)		202.8078	
SS		0.4783	
SH		0.2762	

Çizelge 5.46. $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 2. ay arbutin miktar tayini ($n=3$)

Ölçüm	1	2	3
Alan	178.5051	177.9337	178.4861
R_t	2.4740	2.4740	2.4740
Alan/ R_t	72.1524	71.9215	72.1447
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	50.8030	50.6419	50.7977
Toplam miktar (mg)	203.2121	202.5677	203.1907
Ort miktar (mg)		202.9902	
SS		0.3660	
SH		0.2113	

Çizelge 5.47. $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 3. ay arbutin miktar tayini ($n=3$)

Ölçüm	1	2	3
Alan	179.7078	179.3384	178.8362
R_t	2.4740	2.4740	2.4740
Alan/ R_t	72.6386	72.4892	72.2863
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	51.1421	51.0380	50.8964
Toplam miktar (mg)	204.5685	204.1519	203.5855
Ort miktar (mg)		204.1020	
SS		0.4934	
SH		0.2849	

Çizelge 5.48. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 1. ay arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	187.0552	186.7856	186.3829
R_t	2.4760	2.4760	2.4760
Alan/ R_t	75.5473	75.4384	75.2758
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	53.1711	53.0952	52.9817
Toplam miktar (mg)	212.6845	212.3807	211.9269
Ort miktar (mg)		212.3307	
SS		0.3813	
SH		0.2201	

Çizelge 5.49. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 2. ay arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	466.2061	467.8432	467.5943
R_t	2.4740	2.4740	2.4740
Alan/ R_t	188.4422	189.1040	189.0034
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	131.9204	132.3819	132.3118
Toplam miktar (mg)	527.6815	529.5278	529.2471
Ort miktar (mg)		528.8188	
SS		0.9949	
SH		0.5744	

Çizelge 5.50. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında 3. ay arbutin miktar tayini (n=3)

Ölçüm	1	2	3
Alan	486.7953	488.5454	488.2138
R_t	2.4750	2.4750	2.4750
Alan/ R_t	196.6850	197.3921	197.2581
Konst ($\mu\text{g/mL}$)	137.6700	138.1633	138.0698
Toplam miktar (mg)	550.6802	552.6531	552.2793
Ort miktar (mg)		551.8709	
SS		1.0480	
SH		0.6051	

Çizelge 5.51. Stabilite sonrası karşılaştırmalı % arbutin miktarları

Stabilite Ortamı	% Arbutin Miktarı		
	30. Gün	60. Gün	90. Gün
$4\pm1^{\circ}\text{C}$	100	100	100
$25\pm1^{\circ}\text{C}$	100	101	101
$40\pm1^{\circ}\text{C}$	105	262	273

Çizelge 5.51'de özetlendiği gibi arbutin miktarının 90. gün sonunda $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ ortamlarda saklanan krem formülasyonlarında sıfıncı zaman ile aynı olduğu; ancak $40\pm1^{\circ}\text{C}$ ortamda saklanan formülasyonda ilk 1 aylık ölçümden sonra içeriğindeki

su miktarında azalma, organoleptik sorunlar, pH değişimleri ve reolojik farklılıklar oluşmuştur. Bu formülasyonlarda arbutinin miktarının başlangıç konsantrasyonunun çok üzerinde (>%200) çıkmasının ana sebebi, formülasyonun $40\pm1^{\circ}\text{C}$ ortamdan etkilenmesi ve olası bir saklama kutusunun kapağının sıkıca kapatılmaması durumu ile içeriğindeki su miktarında azalma şeklinde görülebilir. Çünkü stabilite çalışmalarında etkin madde miktar tayini için tüm krem formülasyonlarından aynı miktarda (200 mg) tam tartım alınmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasının önemi, kozmetik bilim dalının önemli bir araştırma konusu olan kahverengi cilt lekelerine karşı bitkisel veya sentetik ilaç ve kozmetik geliştirilmesi alanında tek bilimsel yeterlilik sahibi Eczacı tarafından geliştirilen formülasyonlarla gerçek bir çözüm alternatifinin araştırılmasıdır. Genel olarak melasmada kullanılan etkin maddeler bitkisel ve kimyasal olarak sınıflandırılmış ve bu maddeler topikal taşıyıcı sistemlerle deri üzerine uygulanırken aynı zamanda asit özellikteki çeşitli etkin maddelerle de derinin epidermis tabakasına temas edilerek deskuamasyon yani deri yenilenmesi sağlanmaya çalışılmıştır. Bu süreklilik arz eden deriye asit özellikte bir taşıyıcı sistemle müdahale etme prensibine alternatif olarak bitkisel içerikli ve bazik özellikli bir formülasyonla deskuamasyonun sağlanması ve Melanin pigmentinin etkisinin azaltılması bir bilimsel alternatif arayışı olarak gerekliliktir.

Tez kapsamında sırası ile analitik yöntem geliştirme ve validasyon çalışmaları, optimum formülasyonun belirlenmesi, arbutin içeren formülasyon hazırlanması, formülasyonlar üzerinde karakterizasyon çalışmaları, stabilite testleri yapılmıştır.

Çalışmalar sırasında etkin madde olarak kullanılan alfa arbutin maddesinin etkinliğinin sağlanabilmesi için alfa formunun kullanılması ve temininde maddi olarak problemle karşılaşılmıştır. Uzun taramalar sonucunda alfa arbutin uygun fiyatlı olarak temin edilebilmiştir.

Çalışmanın sonunda elde edilen sonuçlar ise bilinen leke açıcı etkin maddeleri bazik pH özelliğinde bir taşıyıcı sistemle leke bölgesine topikal olarak uygulayan bir formülasyonun bilinen asit özellikteki formülasyonlara bir alternatif olabilmesidir. Özellikle cildin kendini yenilemesi olarak adlandırdığımız deskuamasyon oluşumunda bazik özellikte bir formülasyonda teorik olarak etkili olma ümidi taşımaktadır. Ayrıca stabilite açısından $4\pm1^{\circ}\text{C}$, $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarında saklanan numunelerde 0., 30, 60., 90. günlerde genel görünüş sorunları, koku ve renk değişimleri, faz ayrışması ve madde miktarı azalması gerçekleşmemiştir. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan numunede ise 60. günden itibaren genel görünüş sorunları, kıvam bozulması, faz ayrılması, koku değişimi/azalması ve renk değişimi tespit edilmiştir.

Ayrıca reolojik olarak viskozitedeki en az değişimin $4\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan kremlerde ve daha sonra $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan kremlerde olduğu görülmüştür. $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan krem formülasyonlarında ise gerçekleşen su kaybı ve bozunma ile açıklanabilecek önemli reolojik değişimler ortaya çıkmıştır.

Krem formülasyonların 0. zaman ve 90. gün pH bulgularının istatistiksel karşılaştırılması yapıldığında $25\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için önemli fark ($p\leq 0.05$) ve $40\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlar için çok önemli fark ($p\leq 0.01$) bulunmasına rağmen, $4\pm1^{\circ}\text{C}$ 'lık ortamda bekletilen formülasyonlarda pH değişimi için önemli fark yoktur ($p>0.05$) şeklinde değerlendirilmiştir. Bir karşılaştırmada istatistiksel olarak “önemli/anlamlı fark vardır” kararı verileceği zaman, yapılacak olası hata miktarını p değeri gösterir. Ünlü istatistikçi Fisher tarafından hatanın maksimum kabul edilebilir düzeyi 0.05 olarak önerilmiş ve kabul görmüştür. Bulunan p değeri 0.05'in altında ise karşılaştırma sonucunda önemli farklılık olduğu anlamına gelir.

Çalışma sonunda ortaya çıkan sonuçlar bazik özellikte oluşturulan ve bitkisel içerikli bir leke açıcı etkin madde içeren taşıyıcı sistemin stabilite, etkin madde içermesi ve organoleptik kontroller açısından $4\pm1^{\circ}\text{C}$ ve $25\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta olumlu sonuçlar göstermesidir. Yani raf ömrü, görünüş koku gibi özellikleri ile son ürün haline gelebilir yapıdadır. Fakat $40\pm1^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta saklanan numunede ise 60. günden itibaren genel görünüş sorunları, kıvam bozulması, faz ayrılması, koku değişimi/azalması ve renk değişimi, su kaybı ve bozunma olarak belirlenen önemli sorunlar ortaya çıkmıştır. Bu nedenle bazik pH özellikteki klasik emülsiyon taşıyıcı sistemin stabilite açısından yüksek sıcaklıklarda sorun yaşayacağı görülmektedir.

Elde edilen veriler ışığında formülasyonun üretilmesi sürecinde koyu renkli ve ışıgı geçirmeyen ambalajlar özellikle amber renkli cam kutuların tercih edilmesi güneş ışığı ile formülasyonun temasını azaltacağı için satbilibiteyi olumlu etkileyecektir. Ayrıca klasik emülsiyon tarzında hazırlanmış olan formülasyon etkin madde olan alfa Arbutin içermesi sebebi ile pH 5.0 olarak hazırlanırsa bayanlarda görülen sistit ve vajinal enfeksiyonlar içinde bir alternatif formülasyon olarak planlanabilir. (Rychlińska ve Nowak, 2012, Cüre, Kocatürk ve Kızıltaç 2016)

Ayrıca bu çalışmanın devamı ve içeriğin zenginleştirilmesi açısından *in vivo* ve *in vitro* etkinlik testleri mutlaka yapılmalıdır. Eczacılık mesleğinin hastaya zarar vermeden etki sağlamak prensibi yönlendirmesi ile yapılacak etkinlik testleri daha başarılı etkinlik sonuçları için gerekli bilimsel veri ortamını sağlayacaktır.

KAYNAKÇA

- Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T., Değim, Z., Doğanay, T. 2007. "Modern Farmasötik Teknoloji. (F. Acartürk, İ. Ağabeyoğlu, N. Çelebi, T. Değim, Z. Değim, & T. Doğanay, Ed.) (1. Baskı). Ankara: Fersa Matbaacılık.
- Aksoy, B. 2013. Derinin doğal bağışıklık sistemi. *Turkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arsivi*, 47(SUPPL.1), 2–11.
- Algın Yapar, E. 2017. Cilt Beyazlatıcılara Genel Bakış. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 21(1), 48–53.
- Aralp, Ü. 1995. *Multipl Emülsiyonlar Üzerinde Çalışmalar*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Avşar, P., Karadağ, A. 2018. İnkontinansa Bağlı Dermatit : Değerlendirme , Önleme ve Tedavi. *Journal of Hacettepe University Faculty of Nursing*, 5(1), 69–77.
- Aydın, E. 2019. *Sabit Ve Uçucu Yağların Sağlık Ve Kozmetikte Kullanımı*. Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Bitirme Projesi.
- Azizoğlu, G. A. 2014. *Uv Kaynaklı Deri Hasarı İçin Kolloidal Taşıyıcı Sistemlerin Tasarlanması*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kozmetoloji Bilim Dalı.
- Balta, M. F. 2013. Fatty Acid Profiles for Almond (Prunus amygdalus Batsch) Genotypes with Different Kernel Taste and Formation. *Iğdır Univiversity Journal of Institute Science & Technology*, 3(1), 17–24.
- Baser, H. C. 2016. Meyan (Glycyrrhiza glabra L.). *Bağbahçe*, (Ağustos), 20–21.
- Baydar, H., Göktürk Baydar, N. 2017. Yağ gülü (rosa damascena mill.)'nde distilasyon ürünlerinin uçucu yağ ve fenolik madde içerikleri ile antira. *Tarım Bilimleri Dergisi*, 23(1), 1–9.
- Baytop, T. 1999. *Türkiye'de bitkiler ile tedavi - geçmişte ve bugün*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Boskabady, M. H., Shafei, M. N., Saberi, Z., Amini, S. 2011. Pharmacological effects of Rosa damascena. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 14(4), 295–307.

- Briganti, S., Camera, E., Picardo, M. 2003. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Research*, 16(2), 101–110.
- Burger, P., Landreau, A., Azoulay, S., Michel, T., Fernandez, X. 2016. Skin whitening cosmetics: Feedback and challenges in the development of natural skin lighteners. *Cosmetics*, 3(4), 1-24.
- Büyükköroğlu, G. 1998. *Zizyphus jujuba (Hünnap) Bitkisinin S/Y Emülsiyon Sistemi Halinde Formülasyonu ve Değerlendirilmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Çelebi, N. 2009. Emülsiyonlar. S. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Degim, T., Degim, Z., Doganay, T., Takka & F. Tırnaksız (Ed.), *Modern Farmasötik Teknoloji* (2. Baskı) içinde. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını.
- Chavin, W., Jelonek, E. J., Reed, A. H., Binder, L. R. 1980. Survival of mice receiving melanoma transplants is promoted by hydroquinone. *Science*, 208(4442), 408–410.
- Coelho, S. G., Zhou, Y., Bushar, H. F., Miller, S. A., Zmudzka, B. Z., Hearing, V. J., Beer, J. Z. 2009. Long-lasting pigmentation of human skin, a new look at an overlooked response to UV. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 22(2), 238–241.
- Couteau, C., Coiffard, L. 2016. Overview of Skin Whitening Agents: Drugs and Cosmetic Products, *Cosmetics*, 3(3), 27, 1-16
- Cüre, K., Kocatürk, E., Kızıldağ, U. 2016. Facial hyperpigmentations and their management. *The Medical Journal of Okmeydani Training and Research Hospital*, 32(4), 211–218.
- Davis, H. M. 1977. Analysis of Creams and Lotions, Newburger' s Manual of Cosmetic Analysis. A. J. Senzel (Ed.) içinde, *Association of Official Analytical Chemists* (Second Edi). AOAC.
- Deem, D. E. 1998. Rheology of Dispersed Systems. H. A. Lieberman, M. M. Rieger, G. Banker, & M. Dekker (Ed.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems* içinde. New York: CRC Press.
- Degen, G. H. 2015. *Opinion of the Scientific Committee on Consumer safety (SCCS) – Opinion on the safety of the use of α -arbutin in cosmetic products*. Regulatory Toxicology and Pharmacology. Elsevier.

- Değim, T. 2007. Deriden emilim ve deriye uygulanan yarı katı preparatlar. S. Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Degim, T., Degim, Z., Doganay, T., Takka & F. Tırnaksız (Ed.), *Modern Farmasötik Teknoloji* içinde. Ankara: Türk Eczacılar Birliği Eczacılık Akademisi Yayını.
- Demirezer, Ö., Ersöz, T., Saraçoğlu, İ., Şener, B., Köroğlu, A., Yalçın, F. 2017. *FFD Monografıları Bitkiler ve Etkileri*. (Ö. Demirezer, T. Ersöz, İ. Saraçoğlu, B. Şener, A. Köroğlu, & F. Yalçın, Ed.) (3. Baskı). Ankara: Akademisyen Kitapevi, syf. 609.
- Draelos, Z. D. 2000. α -Hydroxy acids, β -hydroxy acid, and other topical agents. *Dermatologic Therapy*, Vol. 13, 154–158
- Draelos, Z. D. 2007. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatologic Therapy*, 20(5), 308–313.
- Eccleston, G. M. . 2002. Emulsions and microemulsions. J. Swarbrick (Ed.), *Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology* (Vol-2) içinde. Pinehurst, North Carolina: Informa Healthcare.
- Ertam, I., Özkapu, T., Ünal, I. 2013. Üniversal vitiligoda monobenzileter hidrokinon: Bir olgu sunumu. *Turkderm Deri Hastalıkları ve Frengi Arsivi*, 47(4), 243–245.
- Espinal-Perez, L. E., Moncada, B., Castaneda-Cazares, J. P. 2004. A double-blind randomized trial of 5% ascorbic acid vs. 4% hydroquinone in melasma. *International Journal of Dermatology*, 43(8), 604–607.
- Faghihi, G., Shahingohar, A., Siadat, A. H. 2011. Comparison between 1% tretinoin peeling versus 70% glycolic acid peeling in the treatment of females with melasma. *Journal of Isfahan Medical School*, 29(173), 2996–3002.
- Fiume, M. M., Heldreth, B., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Andersen, F. A. 2013. Safety Assessment of Triethanolamine and Triethanolamine-Containing Ingredients as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, Vol. 32 Issue 3, 59S-83S.

- Fleischer, A. B., Schwartzel, E. H., Colby, S. I., Altman, D. J. 2000. The combination of 2% 4-hydroxyanisole (Mequinol) and 0.01% tretinoin is effective in improving the appearance of solar lentigines and related hyperpigmented lesions in two double-blind multicenter clinical studies. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 42(3), 459–467.
- Garcia-Jimenez, A., Teruel-Puche, J. A., Berna, J., Rodriguez-Lopez, J. N., Tudela, J., Garcia-Canovas, F. 2017. Action of tyrosinase on alpha and betaarbutin: A kinetic study. *Plos one*, 12(5), 1–19.
- Geçgil, Ş., Geçgil, H. T. 1972. *Emülsiyonlar, Galenik Farmasiye Başlangıç*. (Ş. Geçgil & H. T. Geçgil, Ed.). İstanbul: Yörük Matbaası.
- Gillbro, J. M., Olsson, M. J. 2011. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents-existing new approaches. *International Journal of Cosmetic Science*, 33, 210–221.
- Gökçe, B. B. 2018. *Dendritik Nanotaşıyıcı Sistemlerin Dermal Hedeflendirme Açısından Değerlendirilmesi*. İstanbul Üniversitesi.
- Gönül, N. 2000. *Çok Fazlı Sistemler II*. (N. Gönül, Ed.). Ankara: Ankara Üniversitesi Yayınları No:82.
- Greatens, A., Hakozaki, T., Koshoffer, A., Epstein, H., Schwemberger, S., Babcock, G., Boissy, R. E. 2005. Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible. *Experimental Dermatology*, 14(7), 498–508.
- Griffin, W. C. 1957. *Emulsification, Cosmetic Science and Technology*. (W. C. Griffin, Ed.). New York: Inter Science Publishers.
- Grimes, P. E. 1995. Melasma: Etiologic and Therapeutic Considerations. *Archives of Dermatology*, 131(12), 1453–1457.
- Grimes, P. E. 1999. The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial-ethnic groups. *Dermatologic Surgery*, 25(1), 18–22.
- Gürel, G. 2009. *Gliserinin kıymetli ürünlere dönüştürülmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Güven, K. 1987. *Emülsiyonlar, Ezacılık Teknolojisi*. (K. Güven, Ed.). İstanbul: Fatih Yayınevi Matbaası.

- Güven, K. C. 2001. *Tıbbi ve Kozmetik Formüller*. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.
- Hajhashemi, M., Rafieian, M., Rouhi Boroujeni, H. A., Miraj, S., Memarian, S., Keivani, A., Haghollahi, F. 2018. The effect of Aloe vera gel and sweet almond oil on striae gravidarum in nulliparous women. *Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine*, 31(13), 1703–1708.
- Handel, A. C., Miot, L. D. B., Miot, H. A. 2014. Melasma: A clinical and epidemiological review. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 89(5), 771–782.
- Hanson, K. M., Gratton, E., Bardeen, C. J. 2006. Sunscreen enhancement of UV-induced reactive oxygen species in the skin. *Free Radical Biology and Medicine*, 41(8), 1205–1212.
- Harry, R. G., Wilkinson, J. B. 1982. Skin Lighteners or Bleaches. J. B. Wilkinson (Ed.), *Harry's Cosmeticsology 7th* (7th Editio) içinde. London: Chemical Publishing.
- Hekioğlu, S. 2004, Aralık. Yaşlanmaya Karşı (Antiaging) Etkili Kozmetiklerin Etkinliklerinin Değerlendirilmesi. *Türk Farmasötik Teknoloji Araştırmacıları Derneği*, 20–23.
- Hivare, S. G., Deosarkar, M. P., Kamble, S. 2017. Synthesis of Glycerol Monostearate. *International Journal of Advances in Science Engineering and Technology*, 5(3), 25–27.
- IARC, 2002. *IARC Monographs Risks To Humans Of Carcinogenic On The Evaluation Volume 77. World Health Organization International agency For Research On Cancer*. Lyon.
- ICH, 1996. Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, European Medicines Agency
- Ichihashi, M., Ueda, M., Budiyanto, A., Bito, T., Oka, M., Fukunaga, M., Horikawa, T. 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology*, 189(1–2), 21–39.
- Im-Emsap, W., Siepmann, J. 2002. Disperse systems. G. Banker & C. Rohodes (Ed.), *Modern Pharmaceutics* içinde. New York: Marcel Dekker Inc.
- İmer, Y., Taşan, M. 2018. Çeşitli Soğuk Pres Yağların Bazı Mikro Ve Makro Element İçeriklerinin Belirlenmesi. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 15(1), 14–25.

- Irmak, M. K., Temel, İ. 2000. Melanin ve Kimyasallar. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 7(1), 87–91.
- Isacoff, H. 1979. Cosmetics. K. Othmer (Ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology* içinde. USA: Wiley.
- İzgü, E. 1984. *Emülsiyonlar, Genel ve Endüstriyel Farmasötik Teknoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi.
- Jimbow, K., Obata, H., Pathak, M. A., Fitzpatrick, T. B. 1974. Mechanism of depigmentation by hydroquinone. *Journal of Investigative Dermatology*, 62(4), 436–449.
- Jungueira, L.C., Carneiro, J., 1993. *Temel Histoloji* (Çev. Solakoğlu, S., Aytekin Y.). Barış Kitap Evi, İstanbul.
- Kamakshi, R. 2012. Fairness via formulations: a review of cosmetic skin-lightening ingredients. *Journal of Cosmetic Science*, 63(1), 43–54.
- Kaş, H. 1997. *Kozmetik Ürünlerde Stabilité Çalışmaları, Deri Yaşlanması ve Kozmetiklere Bir Bakış*. Ankara: Şafak Matbaacılık.
- Kim, Y. J., Uyama, H. 2005. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(15), 1707–1723.
- Knowlton, J., Pearce, S. 1993. *Handbook of Cosmetic Science and Technology*. (J. Knowlton & S. Pearce, Ed.) (1st Ed.). UK: Elsevier.
- Krikwood B.R., Sterne J.A.C., 2003. *Medical statistics* 2nd edition, Oxford Blackwell Science Ltd
- Ktistis, G. 1990. A viscosity study on oil-in-water microemulsions. *International Journal of Pharmaceutics*, 61(3), 213–218.
- Küçük, Ö. S. 2018. Current Treatment Approaches for Melasma. *Bezmialem Science*, 6, 54–62.
- Kwon, S. H., Hwang, Y. J., Lee, S. K., Park, K. C. 2016. Heterogeneous pathology of Melasma and its clinical implications. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6).
- Landau, M. 2008. Chemical peels. *Clinics in Dermatology*, 26(2), 200–208.

- Lee, C. W., Choi, H. J., Kim, H. S., Kim, D. H., Chang, I. S., Moon, H. T., Lee, S. Y., Oh, W. K., Woo, E. R. 2008. Biflavonoids isolated from *Selaginella tamariscina* regulate the expression of matrix metalloproteinase in human skin fibroblasts. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 16(2), 732–738.
- Lemke, T., Bagusat, F., Köhnke, K., Husemann, K., Mögel, H. J. 1999. Time dependent viscosity of concentrated alumina suspensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 150(1–3), 283–287.
- Lim, Y. J., Lee, E. H., Kang, T. H., Ha, S. K., Oh, M. S., Kim, S. M., Yoon, T. J., Kang, C., Park, J. H., Kim, S. Y. 2009. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of α -melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Archives of Pharmacal Research*.
- MacKie, R. M. 2006. Long-term health risk to the skin of ultraviolet radiation. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 92(1), 92–96.
- Maeda, K., Fukuda, M. 1996. Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 276(2), 765–769.
- Makino, E. T., Mehta, E. C., Banga, A., Jain, P., Sigler, M. L., Sonti, S. 2013. Evaluation of a hydroquinone-free skin brightening product using in vitro inhibition of melanogenesis and clinical reduction of ultraviolet-induced hyperpigmentation. *J Drugs Dermatol*, 12(3), 16–20.
- Martin, A., Busmante, P., Chun, A. H. C. 1993. Coarse dispersions. A. Martin, P. Busmante, & A. H. C. Chun (Ed.), *Physical pharmacy : physical chemical principles in the pharmaceutical sciences* (4th Editio) içinde. Philadelphia.
- Masse, M. O., Duvallet, V., Borremans, M., Goeyens, L. 2002. Deri Beyazlatıcı Kozmetiklerdeki Kojik Asit ve Arbutin ' in Tanımlanması ve Kantitatif Analizi. *T Klin J Cosmetol*, 3, 48–58.
- Mathew, S., Adlercreutz, P. 2013. Regioselective glycosylation of hydroquinone to α -arbutin by cyclodextrin glucanotransferase from *Thermoanaerobacter* sp. *Biochemical Engineering Journal*, 79(15), 187-193
- MEB. 2011. Yarı Katı Ve Katı İlaçlar, Ankara.

- Mensah, M. B., Awudza, J. A. M., O'Brien, P. 2018. Castor oil: A suitable green source of capping agent for nanoparticle syntheses and facile surface functionalization. *Royal Society Open Science*, 5(8).
- Migas, P., Krauze-Baranowska, M. 2015. The significance of arbutin and its derivatives in therapy and cosmetics. *Phytochemistry Letters*, 13, 35–40.
- Morita, A. 2007. Tobacco smoke causes premature skin aging. *Journal of Dermatological Science*, 48(3), 169–175.
- Murray, R. K., Granner, Daryl, K., Mayes, Peter, A., Rodwell, Victor, W. 1998. *Harper's Biochemistry*. (R. K. Murray, K. Granner, Daryl, A. Mayes, Peter, & W. Rodwell, Victor, Ed.) (24Th baskı). Appleton & Lange.
- Mutlu, B., Özer, Ö. 2006. Cilt Yaşlanmasında Kozmetik Ürünlerin Önemi. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci*, 2(17), 35–39.
- Nantz, M. P., Rowe, C. A., Bukowski, J. F., Percival, S. S. 2009. Standardized capsule of *Camellia sinensis* lowers cardiovascular risk factors in a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Nutrition*, 25(2), 147–154.
- Nordlund, J. J., Grimes, P. E., Ortonne, J. P. 2006. The safety of hydroquinone. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 20(7), 781–787.
- Öhman, H., Vahlquist, A. 1994. In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Dermato Venereologica*, 74, 375–379.
- Öner, F. 1993. *Methods for Testing the Physical Stability of Emulsion Type Cosmetic Formulation*. (K. H. C. Başer & Y. Yazan, Ed.). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi.
- Özeker, E. 2005. Salisilik Asit ve Bitkiler Üzerindeki Etkileri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 42(1), 213–223.
- Özkan, E. 2011. *Çeşitli Bitkisel Yağlar ve Balın Farklı Topikal Formülasyonlarının Hazırlanması ve Yaşlanma - Karşıtı Etkiliğinin Değerlendirilmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Pagar, K., Vavia, P., 2013. Rivastigmine-loaded L-lactide-depsipeptide polymeric nanoparticles: decisive formulation variable optimization. *Scientia Pharmaceutica*, 81(3): 865–885
- Parvez, S., Kang, M., Chung, H., Cho, C., Hong, M., Shin, M., Bae, H. 2006. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents. *Phytotherapy Research*, 20, 921–934.
- Pillaiyar, T., Manickam, M., Namasivayam, V. 2017. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 403–425.
- Ramos-E-Silva, M., Carneiro, S. C. D. S. 2001. Cosmetics for the elderly. *Clinics in Dermatology*, 19, 413–423.
- Rawlings, A. V. 2006. Ethnic skin types: Are there differences in skin structure and function?. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(2), 79–93.
- Rendon, M., Berneburg, M., Arellano, I., Picardo, M. 2006. Treatment of melasma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 54(5 SUPPL. 2), 272–281.
- Rhein, L. D., Zatz, J. L., Motwani, M. R. 2007. Targeted delivery of actives from topical treatment products to the pilosebaceous unit. G. F. Webster & A. V. Wawlings (Ed.), *Acne and Its Therapy* içinde. CRC Pres Taylor & Francis Group.
- Rieger, M. 1986. Emulsions. L. Lachman, H. Lieberman, & L. Kanig (Ed.), *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy* içinde. Philadelphia.
- Rodrigues, M., Pandya, A. G. 2015. Melasma: Clinical diagnosis and management options. *Australasian Journal of Dermatology*, 56(3), 151–163.
- Roncero, J. M., Álvarez-Ortí, M., Pardo-Giménez, A., Gómez, R., Rabadán, A., Pardo, J. E. 2016. Virgin almond oil: Extraction methods and composition. *Grasas y Aceites*, 67(3).
- Rosentrater, K. A., Evers, A. D. 2018. *Flour treatments, applications, quality, storage and transport*. Rosentrater, K. A. (Ed.), *Kent's Technology of Cereals* içinde. Woodhead Publishing.
- Ruiz M. E., Montoto, S. C., 2018. *Routes of Drug Administration*, Talevi, A., Quiroga P. A. M. (Ed.), *ADME Processes in Pharmaceutical Sciences* içinde. Springer.

- Rx MediaPharma. 2020. Prof. Dr. Levent Üstünes. İzmir: GEMAŞ Genel Mühendislik Mekanik San. ve Tic. A.Ş.
- Ryan, E., Grice, J., Roberts, M. 2016. Nanotechnology for Topical and Transdermal Drug Delivery and Targeting. J. L. Arias (Ed.) içinde, *Nanotechnology and Drug Delivery, Volume Two: Nano-Engineering Strategies and Nanomedicines against Severe Diseases* (1st Ed.). Florida: CRC Pres Taylor & Francis Group.
- Rychlińska, I., Nowak, S. 2012. Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40(2), 109–113.
- Şahin, M. 2018. Renk Açıcı Ajanlar. *Türkiye Klinikleri*, 57, 56–61.
- Sánchez-Ferrer, Á., Neptuno Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F., García-Carmona, F. 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular*, 1247(1), 1–11.
- Schott, H. 2000. Rheology. D. B. Troy (Ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20th Ed.) içinde. Baltimore, Maryland: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS). 2015. *Opinion on alpha-arbutin, (Report, European Union)*.
- Seiller, M., Tokgöz, N. S., Grossiord, J. L. 1993. *Multiple Emulsions asa Promising Preparations in Cosmetic Science*. (K. H. C. Başer & Y. Yazan, Ed.). Eskişehir: Anadolu Üniversitesi Basımevi.
- Şentürk, S., Doğan, N. 2017. Geçmişten Günümüze Tibbi Bir Bitki Olarak Gül. *Göller Bölgesi Aylık Hakemli Ekonomi ve Kültür Dergisi*, 54, 11–15.
- Sharquie, K., Al-Tikreety, M., Al-Mashhadani, S. 2005. Lactic acid as a new therapeutic peeling agent in melasma: Commentary. *Dermatologic Surgery*, 31(2), 154.
- Sheliya, K., Shah, K., Kapupara, P. 2014. Development and validation of analytical method for simultaneous estimation of mometasone furoate, hydroquinone and tretinoin in topical formulation by RP-HPLC. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(4), 934–940.
- Sheth, V. M., Pandya, A. G. 2011. Melasma: A comprehensive update: Part II. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(4), 699–714.

- Smaoui, S. 2014. Stability studies of L-ascorbic acid and ascorbyl palmitate in topical cosmetic formulations. *Household and Personal Care Today*, 9(1), 17–22.
- Sugimoto, K., Nomura, K., Nishimura, T., Kiso, T., Sugimoto, K., Kuriki, T. 2005. Syntheses of α -arbutin- α -glycosides and their inhibitory effects on human tyrosinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(3), 272-276
- Sultana, Y., Kohli, K., Athar, M., Khar, R. K., Aqil, M. 2007. Effect of pre-treatment of almond oil on ultraviolet B-induced cutaneous photoaging in mice. *Journal of Cosmetic Dermatology*, 6(1), 14–19.
- Swarbrick, J., Rubino, J., Rubi, O. P. 2000. Coarse dispersions. A. Gennaro (Ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* (20th Ed.) içinde. Philadelphia: University of the Sciences.
- Tarımcı, N., Badıllı, U. 2017. Deri Yaşlanmasında Derinin Rengi ve Renk Açıcı Ürünler. *Türkiye Klinikleri J Cosm Dermatol*, 10(1), 45–51.
- Turhan, M. Ş. 2018. Renk Açıcı Ajanlar. *Ankara: Türkiye Klinikleri*, 56–62.
- Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihaz Kurumu. 2015. *Türkiye İlaç Ve Tıbbi Cihaz Kurumu Kozmetik Ürünler İle Sınır Teşkil Eden Ürünlere İlişkin Kılavuz Sürüm 2.0*.
- Uçurum, M., Malgır, E. 2017. Stearik Asit Çeşidinin Kalsit Kaplama Verimi Üzerine Etkisi. *Çukurova Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Dergisi*, 32(2), 137–144.
- Uskan, S. Z. 1985. *Haricen Kullanılan Emülsiyon Sistemlerinin Formülasyonu Üzerinde Araştırmalar*. Yayınlanmamış Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Utku Türk, E. 2013. *Alfa Glukosil Hesperidinin Topikal Formülasyonlarının Hazırlanması Ve Etkinliğinin Değerlendirilmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Valipour, E. 2015. *Isolation And Characterization Of A Tyrosinase Enzyme From Native Bacterial Strain, Cloning Of The Related Gene, Characterization Of The Recombinant Enzyme And Analysis Of Its Biotechnological Applications Such As L-Dopa And Melanin Production*. Yayınlanmamış Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.

- Valipour, E., Arıkan, B. 2018. Doğal bakteri suşundan tirozinaz enzim izolasyonu ve karakterizasyonu. *Ç.Ü. Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 35(5), 1–5.
- Vashi, N. A., Kundu, R. V. 2013. Facial hyperpigmentation: Causes and treatment. *British Journal of Dermatology*, 169, 41–56.
- Wang, Y., Thakur, R., Fan, Q., Michniak, B. 2005. Transdermal iontophoresis: Combination strategies to improve transdermal iontophoretic drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 60(2), 179–191.
- Watson, D. J., Mackley, M. R. 2002. The rheology of aqueous emulsions prepared by direct emulsification and phase inversion from a high viscosity alkyd resin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 196(2–3), 121–134.
- Willia, A. C., Barry, B. W. 1991. Terpenes and the Lipid–Protein–Partitioning Theory of Skin Penetration Enhancement. *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, 8(1), 17–24.
- Yamaguchi, Y., Brenner, M., Hearing, V. J. 2007. The regulation of skin pigmentation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(38), 27557–27561.
- Yavaşca, T. 2009. *Bakır(II)-Katalizli C Vitamini Oksidatif Bozunumunun Koruyucu Meyve Asitleri Varlığında Kinetik İncelenmesi*. Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- Yazan, Y. 1998. Kozmetolojide α -Hidroksi Asitler. *Journal of Pharmaceutical Science*, 23, 29–37.
- Yazan, Y. 1996. *Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Kozmetoloji Bilim Dalı Ders Notları*, Eskişehir.
- Yazan, Y. 2002. Reoloji ve kozmetikteki yeri. *Türkiye Klinikleri Kozmetoloji Dergisi*, 3(2), 115–28
- Yazan, Y. 2010. *Kozmetik Bilimi*. (Y. Yazan, Ed.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
- Yin, A. Y., Guo, X. Y., Dai, W. L., Fan, K. N. 2009. The synthesis of propylene glycol and ethylene glycol from glycerol using Raney Ni as a versatile catalyst. *Green Chemistry*, 11(10), 1514–1516.

Yıldırım, A., Koyuncu, F., Tekintaş, E., Yıldırım, F. 2008. Isparta Bölgesinde Selekte Edilen Badem (*Prunus amygdalus* Batsch.) Genotiplerinin Bazı Kimyasal Özellikleri ve Yağ Asitleri Kompozisyonları. *ADÜ Ziraat Fakültesi Dergisi* 2008, 5(1), 19–25.

Yılmaz, F. 2014. *Bitkisel Üretimde Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Ürünleri ile Biyogüvenlik*. T.C. Kalkınma Bakanlığı.

Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., Mizoguchi, M. 1998. The Inhibitory Effect of Glabridin from Licorice Extracts on Melanogenesis and Inflammation. *Pigment Cell Research*, 11(6), 355–361.

Zouboulis, C. C. 2004. Acne and sebaceous gland function. *Clinics in Dermatology*, 22(5), 360–366.

http-1 <https://www.exotic-seeds.store/ru/glavnaya/bearberry-kinnikinnick-bear-grape-seeds-arctostaphylos-uva-ursi.html>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-2 https://tr.123rf.com/photo_73078964_t%C4%B1bbi-%C3%B6zellikli-bitki.-ayva-b%C3%B6%C4%9F%C3%BCrtlen-b%C4%B1rak%C4%B1r.-arctostaphylos-uva-ursi.html

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-3 <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Arbutin#section=Solubility>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-4

http://linge.ba.en.drugdu.com/product_1017230962213171200.html?dtag=1000110033

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-5 <https://www.wikiwand.com/tr/Hidrokinon>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-6 <http://www.kimyaevi.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF8DF7C92FCA5B4D05C663EB3BA2011BDE>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-7 <http://cdn.istanbul.edu.tr/FileHandler2.ashx?f=tb--ilaclarin-uygulanma-yollari.pdf>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-8 <https://inovatifkimyadergisi.com/gliserin>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-9 <https://www.turkbuhar.net/blog/propilen-glikol-nedir>

(Erişim tarihi: 27/12/2020)

http-10 http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_m14700.html

(Erişim tarihi: 27/12/2020)