

**ALFA TOKOFEROL / SİKLODEKSTRİN  
KOMPLEKSLERİNİN HAZIRLANMASI VE  
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Şeyma ADATEPE**

**Eskişehir 2020**

**ALFA TOKOFEROL / SİKLODEKSTRİN KOMPLEKSLERİNİN  
HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Şeyma ADATEPE**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı**

**Kozmetoloji Bilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL**

**Eskişehir**

**Anadolu Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Ağustos 2020**

*Bu tez çalışması BAP Komisyonunca kabul edilen 1903S018 no'lu proje kapsamında desteklenmiştir.*



## ÖZET

### ALFA TOKOFEROL / SIKLODEKSTRİN KOMPLEKSLERİNİN HAZIRLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Şeyma ADATEPE

Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı

Kozmetoloji Bilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağustos 2020

Danışman: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

E vitamini yağda çözünen bir vitamindir. Kozmetik ürünler içerisinde daha çok alfa tokoferol ( $\alpha$ -TC) formu kullanılmaktadır. Antioksidan, antibakteriyel, cilt yenileyici, yaşlanma karşıtı özellikler taşıyan  $\alpha$ -TC, ışığa ve ısıya karşı dayanıksızdır ve yüksek konsantrasyonlarda cildi tahriş edebilmektedir. İdeal bir kozmetik ürün içerisinde düşük konsantrasyonlarda yüksek etkinlik göstermesi istenmektedir ve bu amaçla tokoferol asetat formu kullanılmaktadır. Tokoferol asetatın dayanıklılığı  $\alpha$ -TC'e göre daha yüksek olmakla birlikte antioksidan özelliği düşüktür. Siklodekstrinler, nişastanın degradasyonu sonucunda oluşan siklik oligosakkaritlerdir ve misafir moleküller ile oluşturdukları inklüzyon kompleksleri ile taşıdıkları moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirebilirler.

Çalışmada  $\alpha$ -TC'un kararlılık ve çözünürlüğünün artırılması ve saf haline göre daha yüksek antioksidan aktivite gösterecek bir kompleksinin hazırlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla dondurarak kurutma yöntemi ve hidrokispropil beta siklodekstrin (HPBCD) ve rastgele metillenmiş beta siklodekstrin (RAMEB) ile kompleksleri hazırlanmıştır. Komplekslerin karakterizasyonu, çözünürlük, SEM, DSC, FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$ , enkapsülasyon etkinliği ve *in vitro* salım analizleri ile değerlendirilmiştir. Antioksidan aktivite çalışmaları DPPH testleri ile yürütülmüştür. Hazırlanan komplekslerde saf  $\alpha$ -TC'e göre çözünürlük, çözünme hızı ve antioksidan aktivitede artış tespit edilmiştir. Komplekslerin kararlılık çalışmalarında farklı saklama koşullarında (2-8 °C buzdolabı, 25 °C karanlık, 25 °C gün ışığı, 40 °C etüv) bir ay bekletme sonucunda  $\alpha$ -TC: RAMEB kompleksinin daha kararlı olduğu görülmüştür.

**Anahtar Sözcükler:** Hidroksipropil beta siklodekstrin, Rastgele metillenmiş beta siklodekstrin,  $\alpha$ -Tokoferol

## ABSTRACT

### PREPARATION AND EVALUATION OF ALPHA TOCOPHEROL / CYCLODEXTRIN COMPLEXES

Şeyma ADATEPE

Department of Pharmaceutical Technology

Cosmetology Program

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, August 2020

Supervisor: Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL

Vitamin E is an oil-soluble vitamin. The alpha tocopherol ( $\alpha$ -TC) form of vitamin E is mostly used in cosmetic products. The  $\alpha$ -TC have antioxidant, antibacterial, skin rejuvenating and antiaging properties. It is sensitive to light and heat and can irritate the skin in high concentrations.  $\alpha$ -TC must be in low concentration with high efficiency in an ideal cosmetic product. For this aim its tocopherol acetate form is used generally. Although stability of tocopherol acetate is higher than  $\alpha$ -TC, it has less antioxidant properties. Cyclodextrins are cyclic oligosaccharides formed as a result of starch degradation. By forming inclusion complexes with guest molecules, they can change the physical and chemical properties of the molecules they carry.

The aim of study is to increase the stability and solubility of  $\alpha$ -TC and prepare a complex that will show higher antioxidant activity than its pure form. For this purpose,  $\alpha$ -TC:CD complexes were prepared with hydroxypropyl beta cyclodextrin (HPBCD) and randomly methylated beta cyclodextrin (RAMEB) by freeze drying method. The characteristics of the complexes were evaluated by solubility, SEM, DSC, FT-IR,  $^1\text{H-NMR}$ , encapsulation efficacy and *in-vitro* dissolution rate analyses. Antioxidant activity studies on complexes carried out with DPPH tests. Compared to pure  $\alpha$ -TC, solubility, dissolution rate and antioxidant activity were increased in the prepared complexes.  $\alpha$ -TC:RAMEB was found to be more stable than other complex at different storage conditions (2-8 °C refrigerator, 25 °C dark, 25 °C sunlight, 40 °C etuv) during the one month of storage.

**Keywords:** Hydroxypropyl beta cyclodextrin, Randomly methylated beta cyclodextrin,  $\alpha$ -Tocopherol

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans sürecinde bana daima sabırla yol gösteren, tez çalışmam sırasında değerli bilgilerini ve yardımlarını benden esirgemeyen, ilgi ve desteğiyle her zaman yanımda olan çok kıymetli danışman hocam Prof. Dr. Müzeyyen DEMİREL'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Yüksek lisans eğitimim boyunca öğrendiğim her şeyi borçlu olduğum Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı hocalarıma, eksik kaldığım yerlerde bilgileri ile beni destekleyen ve çalışmalarımdayardımlarını esirgemeyen Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu süreçte gerek anlayışları gerekse çalışmalarımdayardımları sebebiyle bünyesinde bulunduğum Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Eczacılık Fakültesi'nin Dekanı Prof. Dr. Yalçın ÖZKAN'a, Dekan yardımcısı ve Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayhan SAVAŞER'e, Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı hocalarımdan Doç. Dr. Cansel KÖSE ÖZKAN'a ve Dr. Öğretim Üyesi Özgür EŞİM'e teşekkürlerimi sunuyorum.

<sup>1</sup>H-NMR ve FT-IR analizleri için Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Doping ve Narkotik Maddeler Analiz Laboratuvarı'na ve bu çalışmalara katkıları için Öğr. Gör. Serkan LEVENT'e çok teşekkür ederim. SEM analizleri için Anadolu Üniversitesi, Bitki İlaç ve Bilimsel Araştırma Merkezi (AÜBİBAM)'ne ve bu çalışmalara katkıları için Dr. Öğr. Gör. Şennur GÖRGÜLÜ'ye çok teşekkür ederim.

Son olarak çalışmalarımdayardımları bana daima destek olan eşim Hüseyin ADATEPE'ye, beni sevgi ve saygı ile yetiştirerek bana maddi manevi her türlü desteği sağlayan ve daima güvenen canım aileme sonsuz teşekkürler.

Şeyma ADATEPE

## 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 İntihal Tespit Programı”yla 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.

## İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	iii
ÖZET.....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. KAYNAK BİLGİSİ .....	4
2.1. Siklodekstrinler .....	4
2.1.1. Siklodekstrinlerin tarihçesi.....	4
2.1.2. Siklodekstrinlerin üretimi.....	6
2.1.3. Siklodekstrinlerin yapı ve özellikleri.....	6
2.1.4. Siklodekstrin türevleri.....	10
2.1.4.1. Sülfobutileter türevleri.....	11
2.1.4.2. Amfifilik siklodekstrinler .....	12
2.1.4.3. Metil türevleri .....	12
2.1.4.4. Hidroksialkali türevleri.....	12
2.2. İnküzyon Bileşikleri.....	13
2.2.1. İnküzyon kompleksinin oluşumunu etkileyen faktörler .....	16
2.2.1.1. Çözelti dinamiği .....	16
2.2.1.2. Sıcaklık.....	16
2.2.1.3. Çözücü kullanımı .....	16
2.2.1.4. Suyun etkisi .....	16
2.2.2. İnküzyon kompleksi oluşturma yöntemleri.....	16

2.2.2.1. Birlikte çöktürme ile kompleks hazırlama .....	16
2.2.2.2. Sulu hamur kompleksleşmesi ile kompleks hazırlama.....	16
2.2.2.3. Pasta kompleksleşmesi ile kompleks hazırlama.....	17
2.2.2.4. Nemli karıştırma ve ısıtma ile kompleks hazırlama .....	17
2.2.2.5. Ekstrüsiyon yöntemi ile kompleks hazırlama .....	17
2.2.2.6. Kuru karıştırma ile kompleks hazırlama .....	17
2.2.2.7. Liyofilizatör yardımıyla kompleks hazırlama.....	17
2.2.3. Komplekslerin kurutulması.....	18
2.2.4. Kompleksleşmenin veriminin arttırılması.....	18
2.2.5. İnküzyon kompleksi oluşumunun kararlılık sabitleri.....	18
2.2.6. İnküzyon komplekslerinin analiz yöntemleri.....	19
2.2.6.1. X ışını kırınımı .....	19
2.2.6.2. Termal yöntemler .....	20
2.2.6.3. NMR (Nükleer manyetik rezonans) .....	20
2.2.6.4. Diğer spektroskopik yöntemler .....	20
2.2.6.5. Kromatografik yöntemler .....	21
2.2.6.6. Diğer yöntemler.....	21
2.3. Siklodekstrinlerin Kullanım Alanları .....	21
2.3.1. Siklodekstrinlerin kozmetik uygulamaları.....	21
2.4. E Vitamini.....	25
3. GEREÇLER.....	31
3.1. Kullanılan Maddeler.....	31
3.2. Kullanılan Cihazlar .....	31
4. YÖNTEMLER .....	33
4.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları.....	33
4.1.1. HPLC yöntem validasyonu çalışmaları .....	33

4.1.1.1. Doğrusallık .....	34
4.1.1.2. Doğruluk.....	34
4.1.1.3. Kesinlik .....	34
4.1.1.4. Çalışma aralığı .....	34
4.1.1.5. Hassasiyet .....	35
4.1.1.6. Seçicilik .....	35
4.1.1.7. Kararlılık .....	35
4.1.2. UV Spektrofotometri yöntem validasyonu çalışmaları .....	35
4.1.2.1. Doğrusallık .....	36
4.1.2.2. Doğruluk.....	36
4.1.2.3. Kesinlik .....	36
4.1.2.4. Çalışma aralığı .....	37
4.1.2.5. Hassasiyet .....	37
4.1.2.6. Seçicilik .....	37
4.2. $\alpha$ -Tokoferol ile Yapılan Çalışmalar.....	37
4.2.1. Çözünürlük tayini.....	37
4.2.2. Termal analiz.....	37
4.2.3. FT-IR Analizi .....	38
4.2.4. $^1\text{H-NMR}$ Analizi.....	38
4.3. $\alpha$ -Tokoferol/Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu.....	38
4.3.1. Çözünürlük faz diyagramlarının ve kompleksleşme oranlarının belirlenmesi.....	38
4.3.2. İnküzyon komplekslerinin hazırlanması.....	39
4.3.3. İnküzyon kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar.....	39
4.3.3.1. Sudaki çözünürlük çalışmaları.....	39
4.3.3.2. Morfolojik analiz.....	40

4.3.3.3. Termal analiz.....	40
4.3.3.4. FT-IR analizi .....	40
4.3.3.5. <sup>1</sup> H-NMR analizi .....	40
4.3.3.6. Enkapsülasyon etkinliği .....	40
4.3.3.7. Çözünme hızı çalışmaları ve çözünme profillerinin benzerliği .....	41
4.3.3.8. Antioksidan aktivite.....	41
4.3.3.9. Kararlılık çalışmaları .....	43
<b>5. BULGULAR.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1.1. HPLC yöntem validasyonu çalışmaları .....</b>	<b>44</b>
5.1.1.1. Doğrusallık .....	44
5.1.1.2. Doğruluk.....	44
5.1.1.3. Kesinlik .....	45
5.1.1.4. Hassasiyet .....	45
5.1.1.5. Seçicilik .....	46
5.1.1.6. Kararlılık.....	46
<b>5.1.2. UV Spektrofotometri yöntem validasyonu çalışmaları.....</b>	<b>48</b>
5.1.2.1. Doğrusallık .....	48
5.1.2.2. Doğruluk.....	48
5.1.2.3. Kesinlik .....	48
5.1.2.4. Hassasiyet .....	49
5.1.2.5. Seçicilik .....	49
<b>5.2. <math>\alpha</math>-Tokoferol ile Yapılan Çalışmalar.....</b>	<b>51</b>
5.2.1. Çözünürlük tayini.....	51
5.2.2. Termal analiz.....	51
5.2.3. FT-IR Analizi .....	51

5.2.4. <sup>1</sup> H-NMR Analizi.....	51
5.3. α-Tokoferol/Siklodekstrin Komplekslerinin Değerlendirilmesi.....	53
5.3.1. Çözünürlük faz çalışmaları.....	53
5.3.2. İnküzyon kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar.....	54
5.3.2.1. Çözünürlük çalışmaları.....	54
5.3.2.2. Morfolojik analiz.....	55
5.3.2.3. Termal analiz.....	55
5.3.2.4. FT-IR analizi .....	55
5.3.2.5. <sup>1</sup> H-NMR analizi .....	55
5.3.2.6. Enkapsülasyon etkinliği .....	71
5.3.2.7. Çözünme hızı çalışmaları ve çözünme profillerinin benzerliği .....	71
5.3.2.8. Antioksidan aktivite.....	74
5.3.2.9. Kararlılık çalışmaları .....	75
6. TARTIŞMA .....	78
6.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları.....	78
6.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi.....	81
6.2.1. Çözünürlük faz çalışmaları.....	81
6.3. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar .....	82
6.3.1. Çözünürlük çalışmaları.....	82
6.3.2. Morfolojik analiz.....	82
6.3.3. Termal analiz.....	83
6.3.4. FT-IR analizi .....	84
6.3.5. <sup>1</sup> H-NMR analizi .....	85
6.3.6. Enkapsülasyon etkinliği .....	86
6.3.7. Çözünme hızı çalışmaları .....	86
6.3.8. Antioksidan aktivite.....	87

6.3.9. Kararlılık çalışmaları .....	87
7.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	89
KAYNAKÇA.....	91
ÖZGEÇMİŞ .....	100

## TABLULAR DİZİNİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1.</b> Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri .....	7
<b>Tablo 2.2.</b> Siklodekstrinlerin sudaki farklı sıcaklıklardaki çözünürlükleri .....	7
<b>Tablo 2.3.</b> Siklodekstrinlerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri .....	8
<b>Tablo 2.4.</b> Metillenmiş siklodekstrin türevlerinden bazılarının fizikokimyasal özellikleri.....	13
<b>Tablo 2.5.</b> Siklodekstrinlerin kozmetik alanda kullanım amaçları .....	23
<b>Tablo 2.6.</b> Siklodekstrin ile hazırlanmış kozmetik preparatlar .....	25
<b>Tablo 2.7.</b> $\alpha$ -tokoferol'ün bazı özellikleri .....	28
<b>Tablo 2.8.</b> A, C ve E vitamin türevleri eklenen ürünlerin raf ömrü .....	30
<b>Tablo 4.1.</b> $\alpha$ - TC'nin yüksek performanslı sıvı kromatografisi çalışma koşulları.....	33
<b>Tablo 4.2.</b> Antioksidan aktivite çalışmasında kullanılan çözeltilere ait karışımlar...	42
<b>Tablo 5.1.</b> HPLC yöntemi ile elde edilen doğruluk değerleri .....	45
<b>Tablo 5.2.</b> HPLC yöntemi ile elde edilen RSD değerleri.....	45
<b>Tablo 5.3.</b> $\alpha$ -TC'nin etanol:fosfat tamponundaki kararlılık çalışmasına ait sonuçlar.....	46
<b>Tablo 5.4.</b> UV spektrofotometri yöntemi ile elde edilen doğruluk değerleri.....	49
<b>Tablo 5.5.</b> UV spektrofotometri yöntemi ile elde edilen RSD değerleri.....	49
<b>Tablo 5.6.</b> $\alpha$ - TC, $\alpha$ - TC: HPBCD ve $\alpha$ - TC- RAMEB Komplekslerinin %1'lik SLS varlığında sudaki çözünürlüğü .....	55
<b>Tablo 5.7.</b> Kompleksleşme sonrası saf $\alpha$ - TC'nin protonlarındaki kayma değerleri.....	67
<b>Tablo 5.8.</b> Fiziksel karışımdan sonra saf $\alpha$ - TC'nin protonlarındaki kayma değerleri.....	68
<b>Tablo 5.9.</b> Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf HPBCD'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerleri.....	69
<b>Tablo 5.10.</b> Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf RAMEB'in protonlarındaki kimyasal kayma değerleri.....	70

<b>Tablo 5.11.</b> $\alpha$ -TC: HPBCD ve $\alpha$ -TC: RAMEB komplekslerine ait enkapsülasyon etkinliği.....	71
<b>Tablo 5.12.</b> $\alpha$ - TC'nin diyaliz membrandan % kümülatif salımı.....	72
<b>Tablo 5.13.</b> $\alpha$ - TC ve $\alpha$ - TC: CD komplekslerinin antioksidan aktivitesi.....	74
<b>Tablo 5.14.</b> Kararlılık çalışma ortamlarında bozulmadan kalan toplam mg $\alpha$ - TC miktarları .....	76
<b>Tablo 5.15.</b> Kararlılık çalışma ortamlarında bozulmadan kalan % $\alpha$ - TC miktarları .....	77

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. CD teknolojisinin gelişimindeki aşamalar.....	5
Şekil 2.2. Siklodekstrinlerin yapısı.....	8
Şekil 2.3. $\beta$ siklodekstrinin kimyasal yapısı .....	9
Şekil 2.4. Siklodekstrinlerin üç boyutlu yapısı .....	10
Şekil 2.5. Siklodekstrinlerin sülfobutileter türevlerinin kimyasal yapısı.....	11
Şekil 2.6. Siklodekstrinlerin metil türevlerinin kimyasal yapısı .....	12
Şekil 2.7. Siklodekstrinlerin hidroksialkali türevlerinin kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.8. $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ -siklodekstrinlerin moleküler boyutları .....	14
Şekil 2.9. İnklüzyon bileşiği .....	14
Şekil 2.10. 1:1, 1:2 ve 2:1 molar oranlarındaki kompleks konfigürasyonları .....	15
Şekil 2.11. Siklodekstrinlerin kullanım alanları .....	21
Şekil 2.12. Tokoferol ve tokotrineol türevlerinin kimyasal yapısı .....	26
Şekil 2.13. $\alpha$ - TC'nin UV absorbands spektrum ve floresans emisyon spektrumu.....	28
Şekil 2.14. $\alpha$ - TC ve $\alpha$ - Tokoferol Asetat'ın kimyasal yapıları.....	29
Şekil 5.1. HPLC yöntemi ile yapılan doğrusallık çalışmasına ait standart eğri.....	44
Şekil 5.2. HPLC yönteminin seçicilik çalışmasına ait kromatogramlar.....	47
Şekil 5.3. UV- spektrofotometri yöntemi ile yapılan doğrusallık çalışmasına ait standart eğri.....	48
Şekil 5.4. UV spektrofotometri yönteminin seçicilik çalışmasına ait spektrumlar....	50

<b>Şekil 5.5.</b> Saf $\alpha$ -TC'nin DSC analizine ait termogram.....	51
<b>Şekil 5.6.</b> Saf $\alpha$ - TC'nin FT-IR analizine ait spektrum.....	52
<b>Şekil 5.7.</b> Saf $\alpha$ - TC'nin <sup>1</sup> H- NMR analizine ait spektrum.....	52
<b>Şekil 5.8.</b> $\alpha$ - TC: HPBCD çözünürlük faz diyagramı .....	53
<b>Şekil 5.9.</b> $\alpha$ - TC: RAMEB çözünürlük faz diyagramı .....	53
<b>Şekil 5.10.</b> Higuchi'nin faz- çözünürlük diyagramı.....	54
<b>Şekil 5.11.</b> HPBCD, RAMEB ve komplekslerinin SEM görüntüleri.....	56
<b>Şekil 5.12.</b> Saf $\alpha$ -TC, Saf HPBCD, $\alpha$ -TC: HPBCD kompleksi ve $\alpha$ -TC: HPBCD fiziksel karışımının DSC termogramları .....	57
<b>Şekil 5.13.</b> Saf $\alpha$ -TC, Saf RAMEB, $\alpha$ -TC: RAMEB kompleksi ve $\alpha$ -TC: RAMEB fiziksel karışımının DSC termogramları.....	58
<b>Şekil 5.14.</b> Saf $\alpha$ - TC ve saf HPBCD'nin FT-IR analiz spektrumları.....	59
<b>Şekil 5.15.</b> $\alpha$ - TC:HPBCD fiziksel karışımının ve $\alpha$ - TC:HPBCD kompleksinin FT-IR analiz spektrumları.....	60
<b>Şekil 5.16.</b> Saf $\alpha$ - TC ve saf RAMEB'in FT-IR analiz spektrumları.....	61
<b>Şekil 5.17.</b> $\alpha$ - TC:RAMEB fiziksel karışımının ve $\alpha$ - TC:RAMEB kompleksinin FT-IR analiz spektrumları.....	62
<b>Şekil 5.18.</b> Saf $\alpha$ - TC ve saf HPBCD'nin <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumları .....	63
<b>Şekil 5.19.</b> $\alpha$ - TC:HPBCD fiziksel karışımının ve $\alpha$ - TC:HPBCD kompleksinin <sup>1</sup> H-NMR analiz spektrumları.....	64

<b>Şekil 5.20.</b> Saf $\alpha$ - TC ve saf RAMEB'in 1H-NMR analiz spektrumları.....	65
<b>Şekil 5.21.</b> $\alpha$ - TC:RAMEB fiziksel karışımının ve $\alpha$ - TC:RAMEB kompleksinin 1H-NMR analiz spektrumları.....	66
<b>Şekil 5.22.</b> Kompleksleşme sonrası saf $\alpha$ - TC'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafik.....	67
<b>Şekil 5.23.</b> Fiziksel karışımdan sonra saf $\alpha$ - TC'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafik.....	68
<b>Şekil 5.24.</b> Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf HPBCD'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafik .....	69
<b>Şekil 5.25.</b> Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf RAMEB'in protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafik.....	70
<b>Şekil 5.26.</b> $\alpha$ - TC'nin zamana karşı % kümülatif salım grafiği.....	72
<b>Şekil 5.27.</b> $\alpha$ -TC: HPBCD kompleksinden $\alpha$ - TC'nin zamana karşı % kümülatif salım grafiği.....	73
<b>Şekil 5.28.</b> $\alpha$ -TC: RAMEB kompleksinden $\alpha$ - TC'nin zamana karşı % kümülatif salım grafiği .....	73
<b>Şekil 5.29.</b> $\alpha$ - TC ve $\alpha$ - TC: CD komplekslerine ait antioksidan aktivite sonuçlarının karşılaştırılmalı grafiği.....	75

## KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

CD	Siklodekstrin
$\alpha$ -CD	Alfa Siklodekstrin
$\alpha$ -TC	Alfa Tokoferol
$\beta$ -CD	Beta Siklodekstrin
CDCI <sub>3</sub>	Dötorokloroform
DİMEB	2,6-dimetil Beta Siklodekstrin
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSC	Diferansiyel Taramalı Kalorimetre
DTA	Diferansiyel Termogravimetrik Analiz
EE	Enkapsülasyon Etkinliği
FT-IR	Fourier Dönüşümlü İnfrared Spektroskopisi
$\gamma$ -CD	Gama Siklodekstrin
HEBCD	Hidroksietil Beta Siklodekstrin
HPBCD	Hidroksipropil Beta Siklodekstrin
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
IC	İnklüzyon Kompleks
ICH	Uluslararası Harmonizasyon Konseyi
IR	İnfrared Spektroskopisi
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
K <sub>c</sub>	Kararlılık Sabiti
$\Delta\delta$	Kimyasal Kayma
KBr	Potasyum Bromür
LOD	Saptama Sınırı

LOQ	Tayin Sınırı
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
Ort	Ortalama
RAMEB	Rastgele Metillenmiş Beta Siklodekstrin
R <sup>2</sup>	Regresyon Karesi
RSD	Rölatif Standart Sapma
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SGTaz	Siklodekstrin Glikozil Transferaz
SH	Standart Hata
SLS	Sodyum Lauril Sülfat
TRİMEB	2,3,6-trimetil Beta Siklodekstrin
TsCD	Mono-6-deoksi-6-tosil-β- Siklodekstrin
UV	Ultraviyole

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vücudumuzu çevreleyen bir organ olarak derimiz ultraviyole radyasyon, ilaçlar ve hava kirletici ajanları içeren birçok prooksidatif çevresel etkene maruz kalmaktadır. Oksijen kullanımını sonucunda oluşan bazı reaktif ürünler de iyonize radyasyon benzeri toksisiteye neden olabilmektedir. Bu moleküller serbest radikal olarak adlandırılmaktadır. Serbest radikaller kendilerini nötralize etmek için diğer moleküllerden elektron alırlar, küçük molekülleri ve yüksek enerjileriyle hücresel makromolekülleri okside edebilirler. Çok sayıda hücresel komponentin kontrolsüz oksidasyonu söz konusu olursa, bu durum oksidatif stres olarak adlandırılır. Oksidatif stres lipid peroksidasyonuna, protein oksidasyonuna, DNA mutasyon ve kırıklarına, sitotoksik etkilere ve sinyal iletilerinde bozulmalara neden olabilir. Oksidatif stresörlerden korunmak ve serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki dengeyi sağlamak için derimiz birçok katmana özel antioksidan sistemler ile donatılmıştır. Antioksidanlar hücrelere saldırmadan serbest radikalleri stabilize ve deaktive etme yeteneğine sahip olan moleküllerdir. Düşük molekül ağırlıklı antioksidanlar okside olarak başka bir substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktirir veya önlerler. Antioksidanların bir kısmı endojen (lipoik asit, glutatyon, koenzim Q10 gibi) iken vitamin E (alfa tokoferol) ise diyetle ve topikal uygulamalarla alınan lipofilik bir antioksidandır.

E vitamini antioksidan ve serbest radikal yakalayıcısıdır. Antioksidan özelliklerinden dolayı 50 yıldan daha uzun zamandır kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır ve giderek artan kullanıma sahiptir. Doğada vitamin E aktivitesi gösteren 8 madde bulunmaktadır (alfa, beta, gama ve delta tokoferol ile alfa, beta, gama ve delta tokotrienol). Diğer dokularda olduğu gibi  $\alpha$ -TC insan derisinde baskın olan vitamin E homologudur. Bu nedenle diğer vitamin E türevleri ile ilgili çalışmalar son derece kısıtlıdır. *Stratum Kerneum*'daki  $\alpha$ -TC düzeyinin azalması derideki foto oksidatif hasarlanmanın bulgusu olarak değerlendirilmektedir.

Aktif vitamin E ile çok sayıda vitamin E esterleri ve diğer vitamin E türevleri, cilt bakım ürünlerinden, güneşten koruyuculara, bebek ve saç bakım ürünlerine kadar birçok alanda farklı konsantrasyon ve formülasyonlarda güvenli olarak kullanılmaktadır.  $\alpha$ -TC kozmetik ürünlerde %5 ya da daha az konsantrasyonda kullanılmaktadır. %0.2'den daha

az konsantrasyonlarda *Stratum Korneum*'daki vitamin E düzeyini arttırdığı ve lipid peroksidasyonuna karşı *in vivo* koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Transepidermal su kaybını azaltan E vitamininin bu doğal nemlendirici özelliği nedeniyle, nemlendirici maddeler, saç bakım ürünleri ve güneşten koruyucuların içerisinde de yaygın olarak kullanımı söz konusudur. Ayrıca yapılan çalışmalarda vitamin E'nin kırışıklık, deri pürüzlülüğü, kırışıklık derinliğini azalttığı, yaşlanma karşıtı ve fotoprotektif etkilere sahip olduğu gösterilmiştir.

$\alpha$ -TC suda az çözünen bir bileşiktir ve oksijene, ışığa, alkali pH'ya maruz kaldığında dekompoze olma gibi başka olumsuzluklara da sahiptir.  $\alpha$ -TC kimyasal dayanıksızlığı nedeniyle aktif hidroksil grubu esterleştirilerek (asetat, suksinat, linoleat, nikotinat) korunur. Vitamin E, tezgâh üstü (OTC) ürünlerde en sık  $\alpha$ -TC veya TC asetat olarak bulunmaktadır.  $\alpha$ -TC, asetat esterine göre oksidatif bozunmaya karşı çok daha hassastır ve kullanıldığı ürünlerde depolama sürecinde aktivite kaybına uğramaktadır. Bu nedenle, ticari ürünler aktif  $\alpha$ -TC yerine daha çok inaktif ön-ilacı olan  $\alpha$ -TC asetat esteri içermektedir. Ancak klinik çalışmalarda  $\alpha$ -TC'un asetat formunun deride yeterli absorpsiyonuna rağmen, biyolojik aktif form  $\alpha$ -TC'e dönüşmediği gösterilmiştir.  $\alpha$ -TC içeren kozmetik ve tedavi amaçlı ürünlerde beklenen etkinliğin sağlanması için,  $\alpha$ -TC kararlılığını koruyan formülasyonların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Araştırmanın çıkış noktası,  $\alpha$ -TC'un kararlı bir yapı içerisinde sunulmasının sağlanmasıdır.

Siklodekstrin (CD)'ler, nişastanın enzimatik degradasyonu ile elde edilen nontoksik siklik oligosakkaritlerdir. Kesik koni şeklindeki moleküler yapıyı oluşturan,  $\alpha$ -1,4-bağlı glikopiranoz birimlerinden oluşurlar. Yaygın olarak kullanılan CD tipleri, sırasıyla 6, 7 ve 8 glikopiranoz ünitesine sahip olan  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ve  $\gamma$ -CD'dir. Kavite boyutu CD'nin tipine bağlıdır ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD ve  $\gamma$ -CD için 6, 8 ve 10 Å). CD'ler uygun polarite ve boyuttaki çeşitli moleküllerle, kovalent olmayan inklüzyon kompleks (IC) leri oluşturma kabiliyetine sahiptir. IC oluşumu, konuk molekülün özelliklerinde önemli gelişmelere yol açmaktadır (buharlaştırma, bozunma ve oksidasyondan koruma; çözünürlük ve kimyasal kararlılığı artırma; salım hızını kontrol etme; permeabilite, biyoyararlanım ve etkinlik artışı gibi). Son yıllarda, antioksidan ve antibakteriyel bileşiklerin olumsuz özelliklerinde iyileşme sağlamak amacıyla CD'lerin kullanımı artış göstermektedir.

Literatürde çözünürlük artışı ve ürünlerin oksidatif kararlılığını artırmak için,  $\alpha$ -TC'le CD'lerin ( $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD,  $\gamma$ -CD, hidroksipropil  $\beta$ -CD, hidroksipropil  $\gamma$ -CD, dimetillenmiş  $\beta$ -CD) inklüzyon kompleksi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Yapılan bu çalışmalarda, CD IC'lerinin hazırlanması ile  $\alpha$ -TC'un çözünürlük ve oksidasyona karşı kararlılığında artış elde edildiği gösterilmiştir.

Çalışmada kozmetik formülasyonlar için  $\alpha$ -TC'un kararlı bir yapı içerisinde sunulabilmesine yönelik olarak,  $\alpha$ -TC'un çözünürlük ve kararlılığını iyileştirmek, antioksidan etkinliğini artırmak amacıyla, hidroksipropil  $\beta$ -CD (HPBCD) ve rastgele metillenmiş  $\beta$ -CD (RAMEB) ile IC'leri hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

## 2. KAYNAK BİLGİSİ

### 2.1. Siklodekstrinler

Siklodekstrinler, selülozun bakteriler tarafından enzimatik yolla parçalanması ile ortaya çıkan doğal bileşiklerdir (Loftsson vd., 2005). Bu enzimatik reaksiyon molekül içi bir reaksiyondur, reaksiyon sonucu su açığa çıkmaz ve halkalı yapıdaki CD'leri meydana gelir. CD'ler, toroidal (kesik koni) şekillidirler ve siklik oligosakkarit yapısında, konakçı konuk tipi etkileşim yapabilen kafes yapısındaki supramoleküllerdir (Avcı ve Dönmez, 2010). CD'ler suda çözünürlüğü az, ısı ve ışık gibi stres koşullarına dayanıksız moleküller ile konakçı-konuk tipinde bir etkileşimle oluşan inklüzyon bileşiklerini meydana getirebilirler.

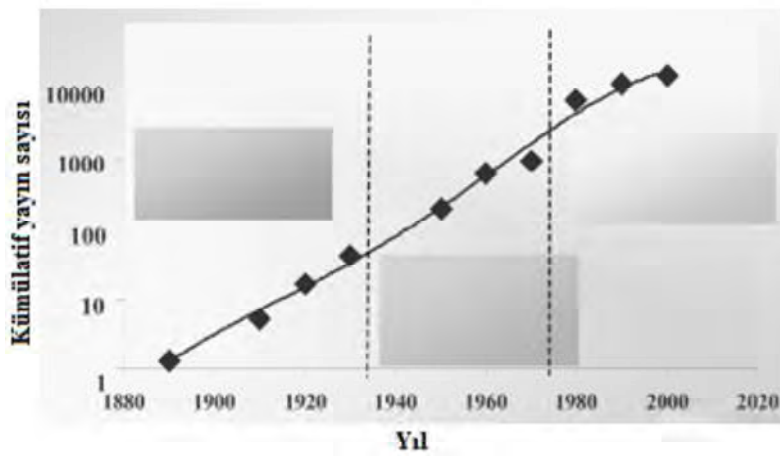
#### 2.1.1. Siklodekstrinlerin tarihçesi

CD'lerin 1891'de keşfiyle başlayan ve 45 yıl süren dönemi CD'ler için "keşif dönemi" olarak adlandırılabilir (Szejtli, 2004). Bu dönemde; CD kavramına tarihte ilk kez Villier'in çalışmalarında rastlanır. 1891 yılında Villier tarafından *Bacillus Amylobacter* bakterisinin yardımıyla ilk kez CD üretilmiş, selülozin olarak isimlendirilmiş ve kimyasal özelliklerinin belirlenmesi amacıyla ön çalışmalar yapılmıştır (Avcı ve Dönmez, 2010; Kurkov ve Loftsson, 2013; Martin vd., 2018).

1903 yılında Schardinger tarafından selülozin maddelerinin siklik yapısı belirlenmiş ve  $\alpha$ - ve  $\beta$ -dekstrin adı verilmiştir (Avcı ve Dönmez, 2010). 1911 yılında CD sentezinden sorumlu bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen *Bacillus Macerans*'ın yardımıyla nişastadan daha fazla şeker üretildiği keşfedilmiş ve üretilen madde "Schardinger şekeri" olarak adlandırılmıştır. Daha sonra farklı CD'ler arasındaki farkı anlamak için denemeler yapılmaya başlanmıştır (Avcı ve Dönmez, 2010; Kurkov ve Loftsson, 2013). 1930'lu yıllarda CD'in bağlı olduğu maltoz birimlerinin, molekül için yapı taşı olduğu bulunmuş ve ilk saf CD'in izolasyonu yapılmıştır. 1935-1936 yıllarında gama CD ( $\gamma$ -CD) keşfedilmiş ve CD'lerin siklik yapısı açıklanmıştır (Kurkov ve Loftsson, 2013). Keşif döneminin son 10 yılında CD'lerin kompleks oluşturmaya uygun olduğu keşfedilmiştir. Ancak verilerin çoğu uygun yöntem kullanılmaması veya saf olmayan bileşikler ile çalışılması nedeniyle tam olarak güvenilir değildir (Hashizume vd., 2017).

CD'lerin 1936-1970 yılları arasındaki dönemi ise "araştırma dönemi" olarak adlandırılır (Szejtli, 2004). Bu dönemde, 1940'lı yıllarda ilk kez inklüzyon kompleksi hazırlanması fikri ortaya atılmıştır (Kurkov ve Loftsson, 2013). Alfa CD ( $\alpha$ -CD), beta CD ( $\beta$ -CD) ve gama CD ( $\gamma$ -CD)'in yapısı X-ray difraktometresi ile belirlenmiştir (Arslan, 2012; Kurkov ve Loftsson, 2013). 1950'li yıllarda French ve Cramer CD'leri saf bileşenlerine ayırarak incelemişlerdir (Arslan, 2012). Daha sonra büyük halkalı CD'ler keşfedilmiş inklüzyon komplekslerinin özellikleri üzerinde çalışılmıştır (Kurkov ve Loftsson, 2013). 1953 yılında Freudenberg ve Cramer CD ve komplekslerine ait ilk patenti almıştır (Kurkov ve Loftsson, 2013; Taneri, 2004). 1957 yılında French'in inceleme yazılarını, 1965 yılında Thoma ve Stewart tarafından yayınlanan monograf ve 1968 yılında Ceasar tarafından yayınlanan monograf takip etmiştir (Szejtli, 2004). 1965 yılında inklüzyon kompleksi mekanizmasının matematiksel modeli geliştirilmiştir (Kurkov ve Loftsson, 2013).

1970'lerden sonra CD'ler için "yararlanma dönemi" başlamıştır. Yararlanma döneminde çalışmalar artmış, üretim artmış ve üretimdeki artışa bağlı olarak CD fiyatları düşmüştür (Szejtli, 2004). Ayrıca toksikolojik açıdan kullanıma uygun oldukları belirlenmiştir (Hashidzume vd., 2017). 1975 yılında CD üzerine ilk yayın yapılmıştır. 1980'li yıllarda gıda ve kozmetik alanında CD'lerin endüstriyel uygulamalarına başlanmıştır. HPBCD Avrupa ve Amerika'da patentlenmiştir (Kurkov ve Loftsson, 2013). 1990 yılında binlerce ton CD üretilmiş ve CD teknolojisi hızlı gelişme göstermiştir (Şekil 2.1.) (Arslan, 2012; Szejtli, 2004).



Şekil 2.1. CD teknolojisinin gelişimindeki aşamalar (Szejtli, 2004).

### 2.1.2. Siklodekstrinlerin üretimi

*Bacillus Macerans*, *Klebsiella Pneumonie* ve *Alcalophile Bacillus* suşlarından “Siklodekstrin Glikozil Transferaz” (SGTaz) enzimi elde edilmektedir. Bu enzimin üretiminde hem modifiye hem de doğal suşlar kullanılabilir. CD’lerin üretiminde kullanılan bu enzim,  $\alpha$  amilaz enzim grubuna dahil olmakla birlikte,  $\alpha$  amilaz enzimi ile farklı reaksiyonları katalizlemektedir. SGTaz enzimi çok fonksiyonlu bir enzimdir ve temel reaksiyonu siklizasyon olmakla birlikte, birleştirme ve hidroliz gibi reaksiyonları da katalizleyebilir (Avcı ve Dönmez, 2010).

Hidrolize olmuş nişastanın SGTaz enzimi ile degrade olması sonucunda siklik ve asiklik ürünler meydana gelir. Oluşan primer ürün intermoleküler bir reaksiyona girerek CD’leri meydana getirir. Reaksiyon endüstriyel olarak hem çözücülü hem de çözücsüz olarak gerçekleştirilebilir. Çözücsüz reaksiyonlarda CD karışımlarının tamamı alınır ve karışım halindeki CD’ler organik bir çözücü yardımıyla izole edilirler. Çözücülü reaksiyonlarda ise organik bir çözücü ile tek tip bir CD üretilir. Her mikroorganizma ile farklı bir tür ve farklı miktarda CD üretilmektedir (Avcı ve Dönmez, 2010).

### 2.1.3. Siklodekstrinlerin yapı ve özellikleri

CD’ler, beyaz, kokusuz ve kristal yapılu toz maddelerdir. Oldukça kararlıdır ve senelerce bozunmadan saklanabilirler. Sıcaklık arttıkça sudaki çözünürlükleri artmaktadır. Yaklaşık 200°C’de bozunmaya başlarlar. Gözlemlenen termoanalitik özellikler kristal yapısına, su miktarına, atmosfer koşullarına göre değişiklik gösterebilir (Arslan, 2012). Sıklıkla kullanılan CD’lerin fizikokimyasal özellikleri **Tablo 2.1.**’de, farklı sıcaklıklarda sudaki çözünürlükleri **Tablo 2.2.**’de, organik çözücülerdeki çözünürlükleri **Tablo 2.3.**’de verilmiştir.

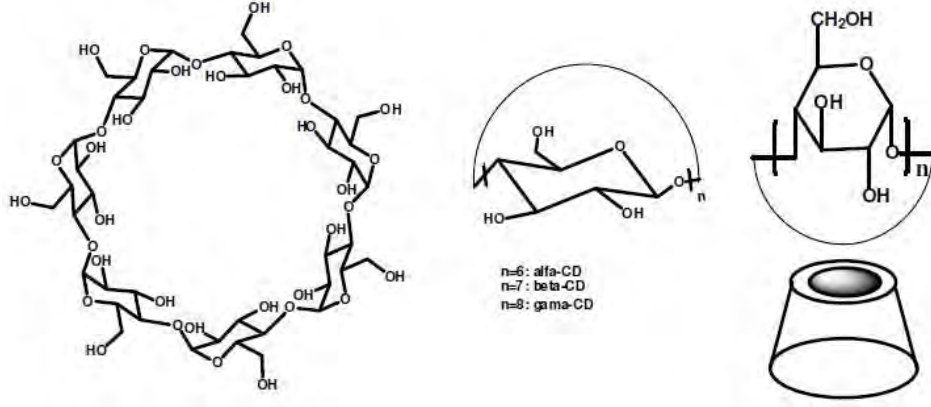
CD’ler sterik engelden dolayı en az 6 glukopiranoz ünitesinden oluşabilirler. Bu glukopiranoz üniteleri  $\alpha$ -(1,4) bağları ile birbirine bağlıdır. Teorik olarak 8’den fazla glukopiranoz sayılı CD üretmek mümkündür. Fakat kompleks oluşturma kabiliyetlerinin azalması sebebiyle sıklıkla kullanılmazlar. En yaygın kullanılan CD türevleri 6,7,8 glukopiranoz ünitesi içeren ve sırasıyla  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - CD olarak adlandırılan türevlerdir (**Şekil 2.2.**) (Hazekamp ve Verpoorte, 2006; Akyürek, 2010; Arslan, 2012).

**Tablo 2.1.** Siklodekstrinlerin fizikokimyasal özellikleri (Arslan, 2012).

Siklodekstrinler	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Glikoz sayısı	6	7	8
Boşluk çapı (Å)	5,7-6,3	6-6,5	7,5-8,3
Yükseklik (Å)	7,9	7,9	7,9
Çap (Å)	14,6	15,4	17,5
Yaklaşık boşluk hacmi (Å)	174	262	427
Molekül ağırlığı	973	1135	1297
Sudaki çözünürlük (mg/ 10 mL)	14,5	1,85	23,2
Erime noktası (C°)	275	280	275
Kristal suyu	10,2	13,2-14,5	8,13-17,7
1 g CD'deki boşluk hacmi (mL)	0,10	0,14	0,20

**Tablo 2.2.** Siklodekstrinlerin sudaki farklı sıcaklıklardaki çözünürlükleri (Taneri, 2004).

Sudaki çözünürlük (mg CD/g su)			
Sıcaklık (°C)	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
20	90	16,4	185
25	127	18,8	256
30	165	22,8	320
35	204	28,3	390
40	242	34,3	460
45	285	44,0	585
50	347	52,7	-

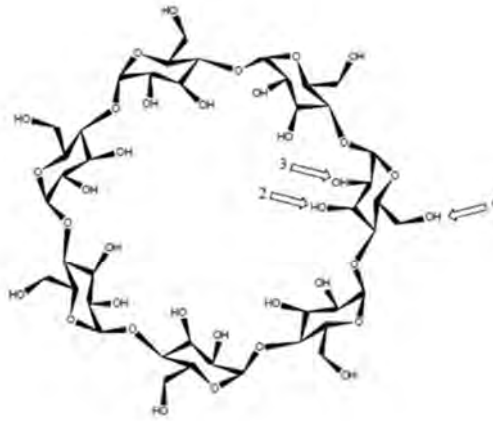


Şekil 2.2. Siklodekstrinlerin yapısı (Arslan, 2012).

Tablo 2.3. Siklodekstrinlerin organik çözücülerdeki çözünürlükleri (Arslan, 2012).

Organik çözücü	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Metanol %100	Çözünmez	Çözünmez	>0,1
Metanol %50	0,3	0,3	208
Etanol %100	Çözünmez	Çözünmez	>0,1
Etanol %50	>0,1	1,3	2,1
İzopropanol	Çözünmez	Çözünmez	>0,1
Aseton	Çözünmez	Çözünmez	>0,1
Kloroform	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez
Piridin	7	37	-
Tetrahidrofur	Çözünmez	Çözünmez	Çözünmez
Dimetilformamid	54	32	-
Dimetilsülfoksit	2	35	-
Etilenglikol	9	21	-
Propilenglikol	1	21	-
Gliserin	Çözünmez	4,3	-

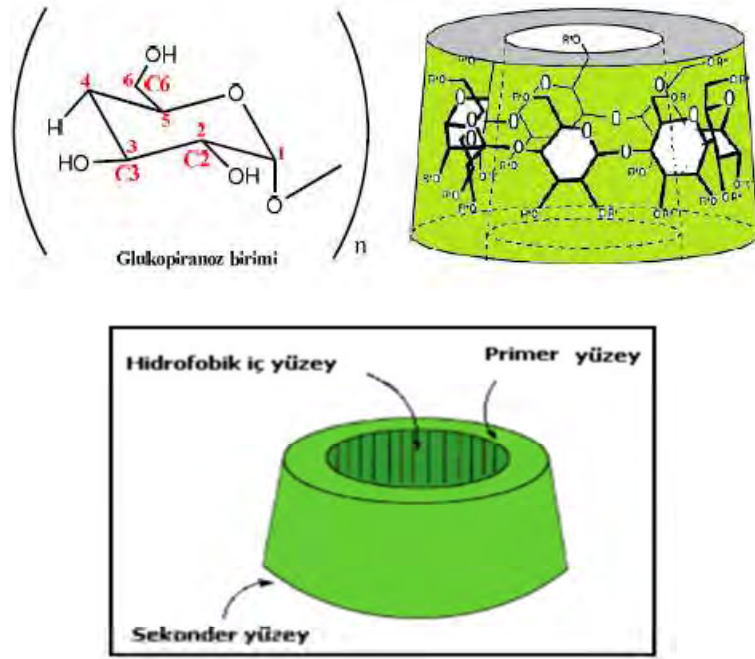
**Şekil 2.3.**'de 2 ve 3 numaralı işaretler C2 ve C3 karbonlarına bağlı hidroksil gruplarını göstermektedir. C2 ve C3'e bağlı sekonder –OH grupları kesik koni biçimindeki CD'in geniş kısmında C6'ya bağlı primer –OH grubu ise dar kısmında bulunmaktadır (Arslan, 2012). C6 karbon atomu C2 ve C3 hidroksil gruplarına göre rotasyon yapabilmesi sebebiyle koninin üst kısmı daha dardır (Akçakoca ve Atav, 2006). Kesik koni yapısındaki CD'in alt ve üst yüzeyindeki serbest –OH grupları su ile etkileşerek suda çözünebilme kabiliyeti sağlar. CD'in iç kavitesinin hidrofobik olmasının sebebi ise iç yüzeydeki –H atomları ve glikozidik -O- köprüleridir (Gökmen vd., 2012).



**Şekil 2.3.**  $\beta$  siklodekstrinin kimyasal yapısı (Arslan, 2012).

Glukopiranoz ünitelerinin sandalye konformasyonunda bulunması sayesinde tüm hidroksil grupları konik yapının dış yüzeyindedir. Bu durum molekülün sudaki çözünürlüğünü artırır. Konik yapının dış yüzeyi hidrofilik iken kavitesi hidrofilik ortamda amfifilik ve hidrofobik özellik gösteren maddelere ev sahipliği yapabilecek hidrofobik yapıdadır (**Şekil 2.4.**) (Akçakoca ve Atav, 2006; Avcı ve Dönmez, 2010). Bunun sebebi Lewis Bazı özelliğinin bulunması ve elektron yoğunluğunun fazla olmasıdır (Yavuz, 2009).

CD'ler, kristal haldeyken kafes ya da kanal formunda bulunabilirler. Kanal formunda iken her bir CD kafa- kuyruk ya da kuyruk- kuyruk şeklinde dizilirler. Kanal formunda, kaviteler birleşerek kanal benzeri bir yapı oluşturur. İnküzyon bileşikleri oluşurken misafir molekül kanalın içerisine yerleşir. Kafes formunda ise CD yapıları birbiri içerisine geçmiş olarak bulunur, kaviteler bir diğer CD molekülü tarafından kapatılır. CD molekülünün ve kristal yapının iç bölümlerinde bulunan su molekülleri ile misafir molekül yer değiştirerek inküzyon kompleksini oluşturur (Arslan, 2012).



Şekil 2.4. Siklodekstrinlerin üç boyutlu yapısı (Taneri, 2004).

#### 2.1.4. Siklodekstrin türevleri

CD'ler,  $\alpha$ -CD'de 18,  $\beta$ -CD'de 21 ve  $\gamma$ -CD'de 24 olmak üzere çok sayıda -OH grubuna sahiptirler. Bu -OH grupları üzerine amin, eter ve ester gibi fonksiyonel gruplar eklenerek CD'lerin modifikasyonu sağlanabilir. Hidroksil gruplarının reaktivitesi pH ve sıcaklık gibi reaksiyon koşullarına bağlıdır (Szejtli, 2004).

Modifikasyonun amaçlarından biri, sudaki çözünürlüğü, aynı karbon sayılı dekstrinlere göre daha az olan CD'lerin sudaki çözünürlüğünü arttırmaktır (Gönülşen, 2013). Bu amaçla bir bazik çözelti içerisinde çözündürülen  $\beta$ -CD, propilen oksit ile muamele edildiğinde sudaki çözünürlüğü %1,85'ten %60'a çıkan 2-hidroksipropil- $\beta$ -CD elde edilir (Avcı ve Dönmez, 2010; Gönülşen, 2013). Diğer amaçlar ise, CD'lerin istenmeyen özelliklerini azaltmak, kompleks yapma kapasitelerini arttırmak ve kontrollü salım yapma özelliği kazanmalarını sağlamaktır (Szejtli, 2004).

Modifikasyonlar, mono fonksiyonlandırma ve çoklu fonksiyonlandırma olarak 2 farklı yolla sağlanabilir. Eğer CD'e tek bir -OH grubu üzerinden fonksiyonel grup eklenirse bu duruma mono fonksiyonlandırma, birden fazla -OH grubu üzerinden fonksiyonel grup eklenirse bu duruma çoklu fonksiyonlandırma adı verilir (Arslan, 2012).

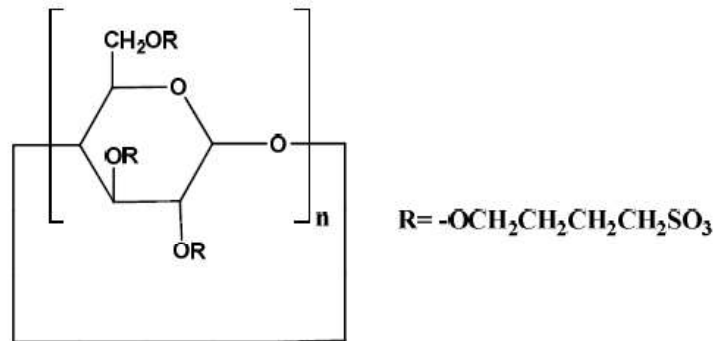
Fonksiyonel gruplar rastgele eklenebildiği gibi tüm -OH gruplarına da eklenebilir. Yapılan modifikasyonlar ile CD'lerin fizikokimyasal özelliklerinde değişimler gözlenebilir. Kısmi modifikasyon yapılan CD suda diğerinden daha fazla çözünür (Avcı & Dönmez, 2010). Kısmi modifikasyon suda çözünürlüğü arttırmasının yanı sıra ısı ve ışığa dayanıklılığı da arttırır (Desai ve Park, 2005; Gönülşen 2013).

CD türevleri oluşturulurken başlangıç molekülü mono-6-deoksi-6-tosil-β-CD (TsCD)'dir. p-toluensülfonilklorür β-CD ile tepkimeye girer ve suda kristallendirilirse TsCD molekülü elde edilir. Bu sülfonatlı CD'ler ara basamak olarak kullanılır ve tosil grupları iyodür, azid, tiyoasetat, hidroksilamin, aril ya da poli-alkilamin gibi nükleofil grupları ile yer değiştirirse CD türevleri elde edilir (Arslan, 2012).

Endüstriyel olarak kullanılan bazı modifiye CD örnekleri, rastgele metillenmiş β-siklodekstrin (RAMEB), hidroksipropil β-siklodekstrin (HPBCD), hidroksietil β-siklodekstrin (HEBCD), 2,6-dimetil β-siklodekstrin (DİMEB), 2,3,6-trimetil β-siklodekstrin (TRİMEB)'dir (Avcı ve Dönmez, 2010).

#### 2.1.4.1. Sülfobutileter türevleri

Sülfobutileter türevi CD'lerin, β-CD'lere göre suda çözünebilirliği ve hidroksipropil CD'lere göre kompleksleşme kapasitesi daha yüksektir. Daha az hemoliz oluşturur ve daha az nefrotoksiktir. CD kavitesinden uzağa sülfobutil eklendiği için inklüzyon bileşiği yapma yeteneği etkilenmez (**Şekil 1.5.**) (Numanoğlu, 2003; Arslan, 2012).



**Şekil 2.5.** Siklodekstrinlerin sülfobutileter türevlerinin kimyasal yapısı (Arslan, 2012).

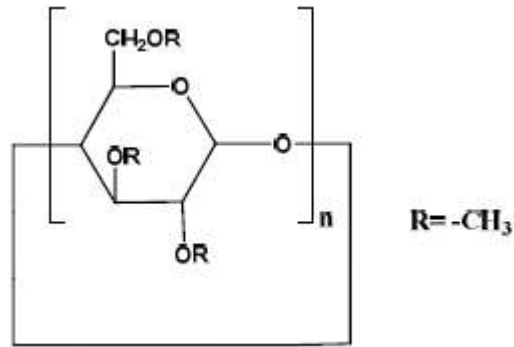
#### 2.1.4.2. Amfifilik siklodekstrinler

Amfifilik CD'ler, doğal CD'lerin farmasötik alandaki sınırlamalarını ortadan kaldırmak amacıyla üretilmişlerdir. Amfifilik CD'ler ile herhangi bir yüzey aktif maddeye gerek kalmaksızın nanopartikül hazırlanması mümkündür. Amfifilik CD'lerin yüzey aktif özelliği alifatik zincirin yapısı, uzunluğu, bağ tipine göre değişebilir (Bilensoy vd., 2008; Yavuz, 2009).

#### 2.1.4.3. Metil türevleri

C2, C3, C6'daki -OH grupları üzerinden metil grubu bağlanarak  $\beta$ -CD'lerin fizikokimyasal özellikleri değiştirilebilir (**Şekil 2.6.**). Bu modifikasyon ile RAMEB, DİMEB, TRİMEB hazırlanmıştır. Bu türevlerin sudaki çözünürlükleri doğal  $\beta$ -CD'lere göre çok daha iyidir. Metillenmiş CD türevlerinin doğal  $\beta$ -CD'lerin aksine sıcaklık arttırıldıkça sudaki çözünürlükleri azalır (Taneri, 2004). Bunun yanında hemolitik yan etkileri vardır (Arslan, 2012). Bazı metillenmiş CD türevlerinin fizikokimyasal özellikleri **Tablo 2.4.**'de verilmiştir.

Metil gruplarının simetrik bağlanması ile modifiye heptakis (2,6-di-O-methyl)  $\beta$ -CD'in soğuk sudaki çözünürlüğü artmıştır. Fakat sıcaklık arttıkça çözünürlük azalmış ve 60°C'de çözünmeyen kristallere dönüşmüştür (Szejtli, 2004).

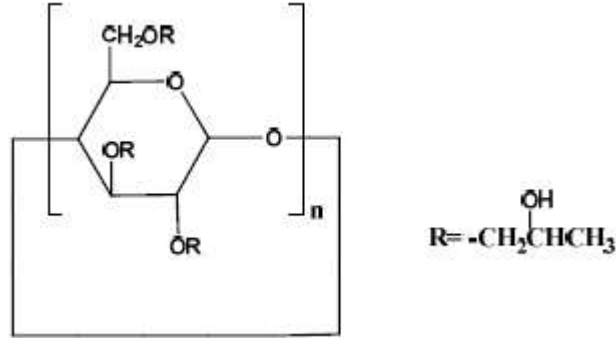


**Şekil 2.6.** Siklodekstrinlerin metil türevlerinin kimyasal yapısı (Szejtli, 2004).

#### 2.1.4.4. Hidroksialkali türevleri

Hidroksialkali türevleri, alkali ortamda  $\beta$ -CD ile propilen oksit kondenzasyonu ile  $\beta$ -CD'in bir ya da birkaç -OH grubuna 2-hidroksipropil eklenmesi ile hazırlanır (**Şekil 2.7.**). HPBCD, HEBCD gibi hidroksialkalilenmiş  $\beta$ -CD'in türevlerinin sudaki çözünürlükleri doğal  $\beta$ -CD'lere göre çok daha iyidir (Taneri, 2004). Sübstitüsyon

derecesi arttıkça yüzey aktiviteleri ve apolar özellikleri artmaktadır. Süstitüsyon derecesi, bir glukopiranoz ünitesi üzerindeki süstitüe olmuş hidroksillerin sayısını ifade eder ve bu sayı 1, 2 veya 3 olabilir.



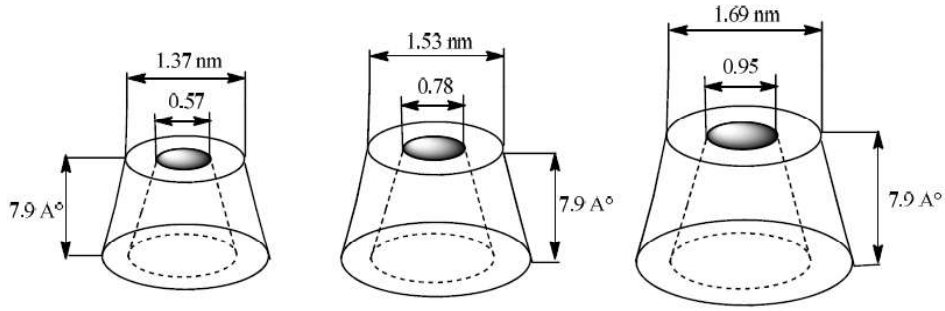
Şekil 2.7. Siklodekstrinlerin hidroksialkali türevlerinin kimyasal yapısı (Arslan, 2012).

Tablo 2.4. Metillenmiş siklodekstrin türevlerinden bazılarının fizikokimyasal özellikleri (Taneri, 2004).

CD tipi	$\beta$ -CD	DİMEB	TRİMEB
Erime derecesi (°C)	280	295-300	157
Spesifik rotasyon $[\alpha]_D^{20}$ (°)	+163	+160	+158
Sudaki çözünürlük (g/100 mL)	2	57	31
Su içeriği (%)	13	1	<1
0,1 mM çözeltinin yüzey gerilimi (mN m <sup>-1</sup> )	71	62	56

## 2.2. İnküzyon Bileşikleri

CD'ler halka içi hidrojen atomları ve glikozidik oksijen atomları sebebiyle elektronik olarak zengin bir iç yüzeye sahiptirler ve hidroksil gruplarının varlığı sebebiyle hidrofilik bir dış yüzeye sahiptirler. Hidrofobik iç yüzeyleri sayesinde amfilik ve hidrofobik molekülleri kavimelerinde taşıyabilirler (Şekil 2.8.). Taşıdıkları moleküle “misafir molekül”, bu molekül ile oluşturdukları komplekse “içerik kompleksi”, oluşan bileşiğe ise “inküzyon bileşiği” adı verilir. CD ile hazırlanan içerik kompleksi moleküler düzeydeki enkapsülasyon yöntemidir (Gökmen vd., 2012).

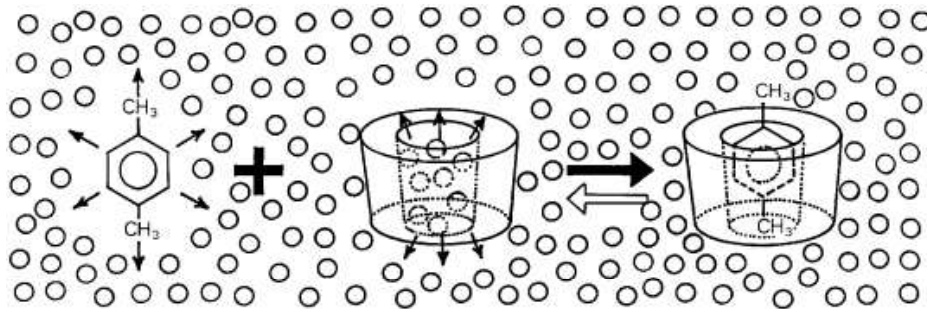


Şekil 2.8.  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -siklodekstrinlerin moleküler boyutları (Martin vd., 2018).

CD ile misafir molekül arasında kurulacak komplekse dört etkileşim yardımcı olur. Bunlar;

1. CD'lerin sulu çözeltisine misafir molekül eklendiğinde kavite içerisinde bulunan su moleküllerinin kaviteyi terk etmesi,
2. Su molekülü ve halkanın iç yüzeyi arasında kurulmuş olan van der Waals etkileşimleri ve H bağları sayısının azalması (CD halkasının konformasyon enerjisinin azalması),
3. Misafir molekülün kaviteye yerleşmesi,
4. -H bağları ile van der Waals etkileşimlerinin yeniden kurulmasıdır.

CD'in sulu çözeltisi, su molekülü ve kavitenin iç yüzeyi arasındaki polar-apolar etkileşimden dolayı kararsızdır ve entalpisi yüksektir. İnküzyon kompleksi kurulduğunda, misafir molekül ve kavitenin iç yüzeyi arasında apolar-apolar etkileşim bulunduğu için entalpi düşük, kurulan etkileşim dayanıklıdır. Fakat kalıcı değildir. Hidrofobik ve amfoterik bileşikler ile oluşturulan inküzyon bileşiklerinde, konakçı ve misafir molekül arasında kovalent bağ kurulmaz. Oluşan kompleks dinamik bir dengededir (Şekil 2.9.) (Akçakoca ve Atav, 2006; Çetin, 2014).

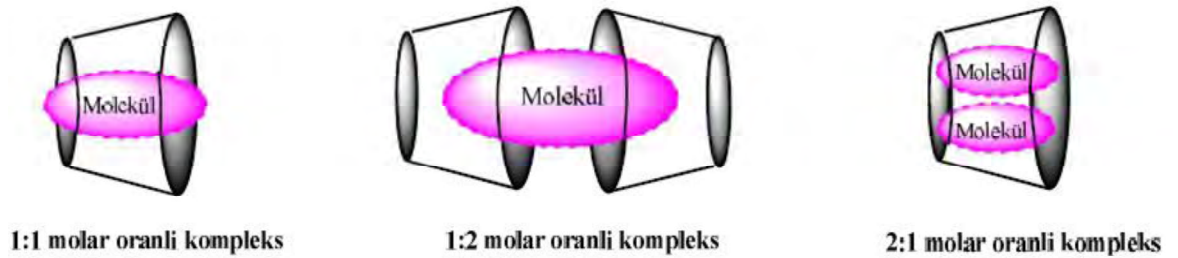


Şekil 2.9. İnküzyon bileşiği (Szejtli, 2004).

CD molekül ağırlığına bağlı olarak genellikle 1 misafir molekül ile bağlanır (Desai ve Park, 2005; Gökmen vd., 2012; Martin vd., 2018). İnküzyon bileşiği oluşurken önemli olan, misafir molekülün kavitenin çapına uygun olması ve kavitenin iç yüzeyi ile temas etmesidir. Misafir molekül ve CD'in arasındaki geometrik uyum kimyasal uyumdan daha önemlidir.

6, 7 ve 8 C sayılı  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ - CD'ler C ünite sayılarının farkına bağlı olarak farklı çaptadırlar. Bu sebeple farklı çaptaki moleküller ile inküzyon bileşiklerini meydana getirirler. 6 C sayılı  $\alpha$ -CD alifatik zincirli moleküller ile, 7 C sayılı  $\beta$ -CD aromatik ve heterosiklik moleküller ile, 8 C sayılı  $\gamma$ - CD ise makrosiklik moleküller ve steroid yapılı moleküller ile inküzyon bileşiklerini oluşturabilirler (Rajewski ve Stella, 1996).

İçerik kompleksinin oluşması için geometrik uyum, molekülün polaritesi ve molar oran uygun olmalıdır. Eğer misafir molekül kaviteden büyük ise boşluğa yerleşemez ve kompleks oluşmaz. Eğer küçük ise boşluğa girer fakat orada tutunamaz ve kompleks oluşmaz (Arslan, 2012). Normalde 1:1 sitokiyometrik oranda kompleks kurulması beklenirken misafir molekülün CD kavitesi ile boyutlarının uymaması sonucu bu oran değiştirilerek farklı oranlarda kompleksler oluşturulabilir (**Şekil 2.10.**) (Akçakoca ve Atav, 2006).



**Şekil 2.10.** 1:1, 1:2 ve 2:1 molar oranlarındaki kompleks konfigürasyonları (Arslan, 2012).

CD'lerin kavitesine geçici olarak hapsedilen misafir moleküllerin yapısında fiziksel, kimyasal ve biyolojik önemli değişiklikler gözlenebilir. Örneğin; molekülün ısı, ışık ve oksidasyona dayanıklılığının artması, molekülün kötü koku ve tadının maskelenmesi gibi (Akçakoca ve Atav, 2006).

## **2.2.1. İnküzyon kompleksinin oluşumunu etkileyen faktörler**

### **2.2.1.1. Çözelti dinamiği**

Çözelti halindeki CD'ler kristal formdaki CD'lere göre kompleks oluşturmaya daha uygundur. Konuk molekül çözelti halindeyse veya ince partikül halindeyse kompleks oluşumu daha hızlıdır (Çetin, 2014). Çözeltinin sıcaklığı arttıkça kompleks oluşum hızı artar (Akçakoca ve Atav, 2006).

### **2.2.1.2. Sıcaklık**

Denge halindeki sıcaklık, kararlılık ve çözünürlük açısından önemlidir. Bunun sebebi sıcaklık yüksekken çözünürlüğün artması fakat kararlılığın azalmasıdır. Sıcaklık konuk molekülün dayanıklılığına göre ayarlanmalıdır (Del Valle, 2004).

### **2.2.1.3. Çözücü kullanımı**

Su CD'ler ile inküzyon kompleksi hazırlanmasında kullanılan en uygun çözücüdür. Bunun sebebi misafir molekül ile kolaylıkla yer değiştirebilmesidir. Fakat bazı misafir moleküller için su iyi bir çözücü değildir. Bu moleküller için organik bir çözücü kullanılmalıdır. Bu organik çözücü CD ile kolaylıkla kompleks oluşturabilmeli ve kolaylıkla buharlaşmalıdır, etanol, dietiler gibi (Akçakoca ve Atav, 2006).

### **2.2.1.4. Suyun etkisi**

Su miktarı arttıkça misafir molekül ve CD'lerin çözünürlüğü artar. Fakat çok fazla su eklenirse çözelti seyrek bir çözelti olur ve CD ile misafir molekül birbirlerine temas edemez. Birbirine temas edemeyen misafir molekül ve CD arasında kompleks kurulamaz. Bu nedenle yeterli miktarda su kullanılmalıdır (Akçakoca ve Atav, 2006).

## **2.2.2. İnküzyon kompleksi oluşturma yöntemleri**

### **2.2.2.1. Birlikte çöktürme ile kompleks hazırlama**

CD'in sulu çözeltisi karıştırılırken misafir molekül bu çözeltiliye eklenir, çözelti karıştırılarak soğutulur ve kompleksin çökmesi sağlanır. Kaptan kaba aktarma, santrifüjleme ve filtreleme ile kompleks ayrılabilir (Numanoğlu, 2003).

### **2.2.2.2. Sulu hamur kompleksleşmesi ile kompleks hazırlama**

CD %50-60 oranında katı halde suya eklenir ve karıştırılır. Sulu faz CD ile doyurulur. Misafir molekül çözeltiliye eklenir, CD ile kompleks oluşturur, kompleks

kristallendirme yoluyla veya çökelti oluşturularak ayrılır. Kaptan kaba aktarma, santrifüjleme ve filtreleme ile kompleks ayrılabilir (Akçakoca ve Atav, 2006).

#### ***2.2.2.3. Pasta kompleksleşmesi ile kompleks hazırlama***

Büyük bir karıştırıcı içerisinde CD ve az miktarda su eklenip karıştırılır. Misafir molekül üzerine eklendikçe -yapısına bağlı olarak bir süre sonra- kompleks oluşur, oluşan kompleks direkt kurutulabilir veya az miktar su ile yıkanıp filtrasyon veya santrifüj ile ayrılabilir (Del Valle, 2004).

#### ***2.2.2.4. Nemli karıştırma ve ısıtma ile kompleks hazırlama***

Çok az su kullanılan bu yöntemde CD ve misafir molekül karıştırılır ve kapalı bir konteynıra konulur. Konteynır 100°C'ye kadar ısıtılır ve içindekiler uzaklaştırılır. Eklenen su miktarı, ısıtma zamanı, karıştırma derecesi misafir moleküle göre belirlenir (Akçakoca ve Atav, 2006).

#### ***2.2.2.5. Ekstrüksiyon yöntemi ile kompleks hazırlama***

CD, misafir molekül ve su karıştırılır ve ekstrüder içerisinde alınır. Bu sistemde karıştırma derecesi, ısıtma miktarı ve süre kontrol edilebilir. Su miktarına bağlı olarak içerik kendi halinde kurumaya bırakılabilir veya kurutma için bir fırına konulabilir. Kesintisiz bir prosesdir ve çok az su kullanılır. Isıya dayanıklı misafir moleküller için uygundur (Ongar, 2019).

#### ***2.2.2.6. Kuru karıştırma ile kompleks hazırlama***

Yağlar ve sıvı misafir moleküller için uygun bir yöntem olan kuru karıştırmada misafir molekül ve CD direkt karıştırılır. Yıkama işlemi gerekmediği sürece su kullanımı gerekmez. Oda sıcaklığında hazırlanabilir. Sıcaklık artarsa pastalaşma gözlenebilir ve karıştırma yetersiz kalırsa kompleksleşme tamamlanamayabilir (Del Valle, 2004).

#### ***2.2.2.7. Liyofilizatör yardımıyla kompleks hazırlama***

Misafir molekül bir çözücü yardımıyla çözülür. Bu çözeltiye CD'leri de çözen bir çözücü ilave edilir. Molar oranda istenen miktarda CD ilavesi ile denge süresi boyunca iyice karıştırılır. Bu çözelti -80 °C'de dondurulur ve liyofilizatörde çözücü uçurulduktan sonra kompleks elde edilir (Akçakoca ve Atav, 2006).

### 2.2.3. Komplekslerin kurutulması

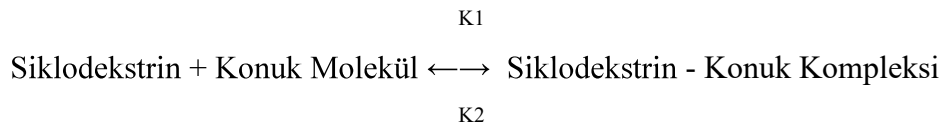
CD ve misafir molekül, çözücünün bulunduğu bir ortamda kompleks oluşturabiliyorsa kompleks oluşturma aşamasından sonra çözücünün ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Bu kurutma işlemi fırın, etüv gibi bir cihaz yardımıyla yüksek sıcaklıklarda yapılabildiği gibi püskürtürerek, desikatörde veya liyofilizatör yardımıyla düşük sıcaklıklarda da yapılabilir. Yüksek sıcaklıkta bozulan veya buharlaşıp kayba uğrayan misafir moleküller için düşük sıcaklıklarda çalışılması gerekir. Kurutma işlemi misafir moleküle göre seçilmeli ve optimize edilmelidir (Akçakoca ve Atav, 2006).

### 2.2.4. Kompleksleşmenin veriminin artırılması

Suda çözünen bir polimerin %0,1-%0,25 oranlarında misafir molekül-CD karışımına eklenmesi ile misafir molekülün sudaki çözünürlüğünün ve CD ile kompleksleşme veriminin arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda polimer eklenmesi ile maliyeti yüksek CD kullanımı da azaltılabilir. Bu işlem sırasında karışım otoklavda 120-140 °C' de ısıtılmalıdır (Taneri, 2004).

### 2.2.5. İnküzyon kompleksi oluşumunun kararlılık sabitleri

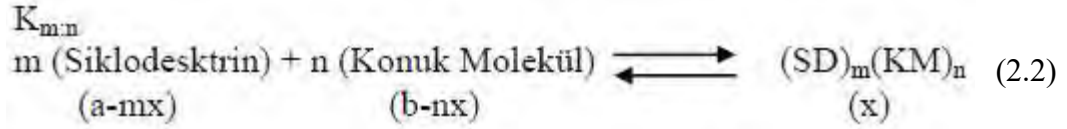
CD ve misafir molekül kompleksinin denge sabiti, misafir molekülün fizikokimyasal değişiminin göstergesidir. Kararlılık sabiti hesaplanmasında iki tür yaklaşım vardır. Bunlardan birincisi kinetik yaklaşımdır.  $K_1$ = Oluşum hız sabiti,  $K_2$ = Ayrışma hız sabitidir.



Kompleks oluşum ve ayrışma hızı çok yavaş olduğunda denge sabiti, aşağıdaki formülü yardımıyla hesaplanır (Akçakoca ve Atav, 2006)

$$K_c = K_1/K_2 \quad (2.1)$$

İkinci yaklaşım ise denge yaklaşımıdır. Oda sıcaklığında hızla dengeye gelen sistemlerin kararlılık sabitleri denge yaklaşımı ile hesaplanır (Akçakoca ve Atav, 2006).



$$\text{Oluşum sabiti: } K_{m:n} = x / [(a - mx)^m \cdot (b - nx)^n] \quad (2.3)$$

$$\text{Ayrışma sabiti: } K_{m:n} = [(a - mx)^m \cdot (b - nx)^n] / x \quad (2.4)$$

Reaksiyonun serbest enerjisi  $\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K$  denkleminde faydalanılarak bulunur. Farklı sıcaklıklarda hesaplanan denge sabitlerinden faydalanılarak da reaksiyonun entalpisi Van't Hoff denklemi ile hesaplanır (Akçakoca ve Atav, 2006)

$$\text{Log} \left( \frac{K_2}{K_1} \right) = \left[ -\frac{\Delta H}{-2.303 \cdot R} \right] \cdot \left[ \frac{T_2 - T_1}{T_1 \cdot T_2} \right] \quad (2.5)$$

Bu denklem yardımıyla  $\Delta H$  belirlenir. Reaksiyonun entropisi

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad (2.6)$$

formülü ile bulunur.  $\Delta G$ ; serbest enerji değişimi,  $\Delta H$ ; standart entalpi değişimi ve  $\Delta S$ ; standart entropi değişimidir. Potansiyometrik ve spektroskopik yöntemler kararlılık sabitlerinin hesaplanmasında sıklıkla kullanılmaktadır (Akçakoca ve Atav, 2006).

## 2.2.6. İnküzyon komplekslerinin analiz yöntemleri

Kompleks oluşumuyla birlikte misafir molekülde görülen fizikokimyasal özelliklerin değişiminin incelenmesi için öncelikle inküzyon kompleksinin oluşup oluşmadığı incelenmelidir. Analiz için fizikokimyasal ve termodinamik yöntemlerden faydalanılabilir.

### 2.2.6.1. X ışını kırınımı

X ışını kırınımı yöntemi, yalnızca katı haldeki moleküllerin analizinde kullanılır. Misafir molekül, CD ve kompleksleri arasında karşılaştırma yapılması esasına dayanır. Kompleksin kırınım modeli, CD ve misafir molekülün kırınımından oldukça farklıdır. Sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Kalitatif teşhis için önemlidir (Numanoğlu, 2003; Submaraniam vd., 2010).

X ışınları kaynaktan belli bir açı ile materyale düşürülür. Her maddenin kendine özgü yansıması ve pik değeri vardır. Bir dedektör yardımıyla pik değerleri ölçülür. Karşılaştırma yapılarak kompleks oluşumu incelenebilir (Akçakoca ve Atav, 2006).

#### **2.2.6.2. Termal yöntemler**

CD, misafir molekül ve inklüzyon kompleksinin her birinin ayrı ayrı termal özelliklerinin incelenmesi esasına dayanır. Diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) ve diferansiyel termogravimetrik analiz (DTA) kullanılan termal analiz yöntemleridir (Numanoğlu, 2003; Submaraniam vd., 2010).

DSC yönteminde fazların dönüşüm ısıları kantitatif olarak ölçülür (Akçakoca ve Atav, 2006). Numune ısıtılırken, soğutulurken veya sabit bir sıcaklıkta tutulurken soğurulan veya salıverilen enerji miktarını ölçer. Bu teknikte, referans ile numuneden gelen veya uzaklaşan ısı farkı sıcaklığa veya zamana bağlı olarak gösterilir (http-1). DTA yönteminde ise entalpi değişimleri saptanır (Akçakoca ve Atav, 2006).

#### **2.2.6.3. NMR (Nükleer manyetik rezonans)**

Misafir molekül ve CD'in manyetik alandaki sinyal değişimlerinin incelenmesi ile etkileşim olan yerler anlaşılabilir (Akçakoca ve Atav, 2006). NMR spektroskopisi, elektromanyetik rezonansın ölçümü prensibine dayanır. Inklüzyon komplekslerinin oluştuğuna en kesin kanıt NMR spektroskopisi ile yapılan analizlerdir. Eğer inklüzyon kompleksi oluşmuş ise C3 ve C5 deki H atomları misafir molekülün protonları ile gölgelenir ve yüksek alana kayma gözlenir (Numanoğlu, 2003).

#### **2.2.6.4. Diğer spektroskopik yöntemler**

UV, IR, floresans spektroskopisi yöntemleri ile kompleks oluşumu incelenebilir. CD ve misafir molekül arasındaki etkileşim piklerde meydana gelen değişimler incelenerek saptanır (Akçakoca ve Atav, 2006).

İnfrared spektroskopisi (IR), katı durumdaki CD ve misafir molekül arasındaki etkileşmeyi tayin etmek amacıyla kullanılır. Kompleksteki misafir molekül miktarı %25'ten az ise bantlar CD tarafından maskelenir. Bu sebeple az bilgilendirici bir yöntemdir (Numanoğlu, 2003).

### 2.2.6.5. Kromatografik yöntemler

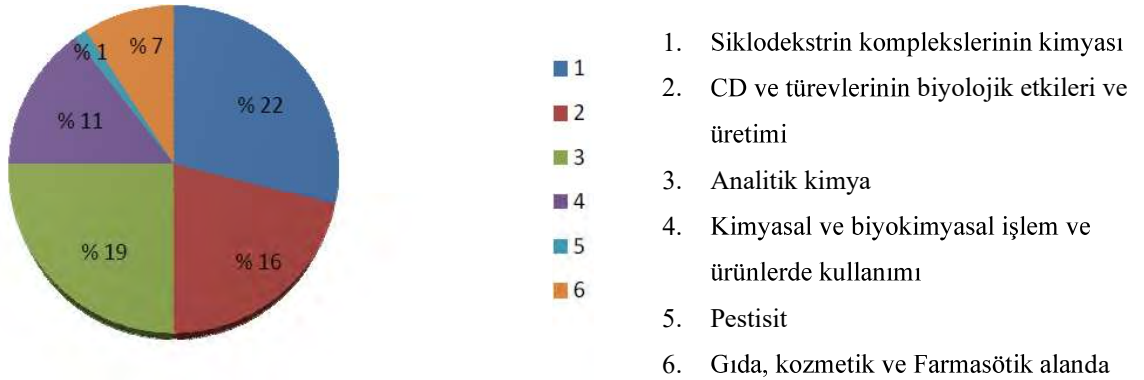
İnce tabaka kromatografisi (İTK), yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kompleks oluşumunun doğrulanması için kullanılabilir (Numanoğlu, 2003).

### 2.2.6.6. Diğer yöntemler

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM), çözünme testleri, iletkenlik ölçümleri de kompleks oluşumunun incelenmesi amacıyla kullanılan analiz yöntemleridir (Numanoğlu, 2003).

## 2.3. Siklodekstrinlerin Kullanım Alanları

CD'ler, suda çözünmeyen veya az çözünen moleküllerin çözünürlüğünü arttırabilir, uçucu moleküller ile kompleks oluşturarak uçuculuğu azaltabilir, kötü koku ve tadı maskeleyebilir, taşıdığı misafir molekülün kararlılığını arttırabilir, sıvı bileşikleri toz haline getirebilirler. Bu üstünlükleri nedeniyle ilaç, kozmetik, tarım, ambalaj, tekstil gibi sektörlerde kullanılmaktadır (Şekil 2.11.) (Tarımcı, 2005; Submaraniam vd., 2010; Arslan, 2012).



Şekil 2.11. Siklodekstrinlerin kullanım alanları (Arslan, 2012)

### 2.3.1. Siklodekstrinlerin kozmetik uygulamaları

Hoş kokulu kozmetik formülasyonlarda aromatik kokunun çözünürlüğünün artırılması, kalıcılığın artırılması hem de formülasyon kararlılığının artırılması amacıyla eklenen stabilizör ve yüzey aktif maddeler ciltte tahrişe ve ışığa duyarlılığa ve ayrıca formülasyonda bulanıklığa sebep olabilmektedir (Numanoğlu vd., 2007). Bu veya bunun gibi durumları engellemek amacıyla CD'ler kozmetik taşıyıcı sistemler olarak

kullanılabilmektedirler. Kozmetik alanında kullanılmak üzere hem boş CD'ler hem de inklüzyon bileşikleri hazırlanabilmektedir (Yapar ve Tanrıverdi, 2016).

Boş CD'lerin sulu veya alkollü çözeltileri vücuttaki istenmeyen kokuları maskeleyen amacıyla kullanılabılırler. Bitki ekstraktları, antimikrobik maddeler ile kompleksleri hazırlanan CD'ler ile ağız ve ayak kokusunu giderici ürün formülasyonları hazırlanabilir. Ciltteki sebümü emme özellikleri sayesinde anti akne özellik gösterirler ve cildi temizlerler. Fazla sebümü emme özelliklerinden dolayı cilt bakım ürünlerinde ve saç bakım ürünlerinde kullanılabılırler. Ayrıca yüzey etkin madde kullanılmaksızın emülsiyonların kararlılığını arttırırlar. Film tabakası yapabilirler. Bu özellikleri yardımıyla hazırlanmış cold krem ve losyonlar vardır (Tarımcı, 2005). CD'ler nişastanın aksine mikroorganizmalar için besin ögesi değildir. Bu sebeple CD'ler ile hazırlanan formülasyonlarda koruyucu oranı azaltılabilir (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

İnküzyon bileşikleri ise sudaki çözünürlüğü arttırması, derideki tahrişi azaltması, etkin maddenin kararlılığını arttırması, keskin koku ve acı tadı gidermesi ve uzatılmış etki sağlaması sebebiyle kozmetik alanında kullanılabılır (Tarımcı, 2005; Yapar ve Tanrıverdi, 2016). İnküzyon bileşiklerinin kozmetik alandaki kullanımına ait örnekler ise aşağıdaki gibidir;

Bitkisel yağlar, hidrokarbonlar, yağ asitleri ve onların esterleri, hormonlar ve bazı vitaminler suda çözünmeyen ve kararlılığı düşük maddelerdir. Bu maddelerin CD ile kompleksleri hazırlandığında suda çözünürlükleri ve kararlılıkları artar. Formülasyonlarda kullanımları kolaylaşır (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

UV filtresi olan 2-etilhekzil p-dimetilamino benzoatın hidrokispropil CD ile kompleksinin hazırlanmasından sonra kimyasal kararlılığının ve suda çözünürlüğünün arttığı, deriyi irite edici özelliğinin ise azaldığı gözlenmiştir (Scalia, 1999).

Güneşsiz bronzlaşma sağlayan dihidroksi asetonun deri ile temasında kötü kokular oluşmaktadır. Fakat  $\gamma$ -CD ile kompleksi hazırlandığında istenmeyen kokular maskelenmektedir (Tarımcı, 2005).

Fotoprotektör ve antioksidan bir ajan olan ferulik asit serbest halde iken ısı, ışık ve oksijenden etkilenmektedir. Fakat CD kompleksi hazırlandığında kararlılığının arttığı ve bozunma ürünlerinin azaldığı gözlenmiştir (Centini vd., 2007).

CD'lerin kozmetik alanda kullanım amaçları **Tablo 2.5.**'de verilmiştir.

**Tablo 2.5.** Siklodekstrinlerin kozmetik alanda kullanım amaçları (Amann ve Dressnandt, 1993;  
(Buschmann ve Schollmeyer, 2002; Submaraniam vd, 2010)

<b>1. Aktif bileşiklerin ve uçucu maddelerin stabilizasyonunun sağlanması</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Isı ve ışık ile meydana gelen reaksiyonların önlenmesi</li><li>• Oksidasyon ve hidrolizin önlenmesi</li><li>• Diğer organik bileşikler ile kimyasal reaksiyonların önlenmesi</li><li>• Buharlaştırma ile madde kaybının önlenmesi</li></ul>
<b>2. Lipofilik misafir moleküllerin sudaki çözünürlüğünün artırılması</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Çözünürlüğün artırılması</li><li>• Çözünme hızının artırılması</li><li>• Organik çözücü kullanımının önlenmesi</li></ul>
<b>3. İstenmeyen özelliklerin düzeltilmesi</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Hoşa gitmeyen koku ve tadın düzeltilmesi</li><li>• Deri iritasyonunun önlenmesi</li><li>• Yüzey etkin madde miktarının azaltılması</li><li>• Nem çekici özelliğin azaltılması</li></ul>
<b>4. Kullanım kolaylığının sağlanması</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Sıvı ve yağlı maddelerin toz haline dönüştürülmesi</li><li>• Emülsiyonların kararlılığının artırılması</li><li>• Viskozitenin düzenlenmesi</li></ul>
<b>5. Kontrollü salımın sağlanması</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Kozmetik maddelerin kontrollü salımının sağlanması</li><li>• Koku verici maddelerin kontrollü salımının sağlanması</li></ul>

Çay ağacı yağı antimikrobiyal özellik gösterir. Saf yağ, ışık ve oksijenin olmadığı ortamda 1 aya kadar dayanıklıdır. Yapısındaki terpenik bileşenler oksijen ile reaksiyona girerek cildi tahriş eder. CD kompleksi hazırlanan çay ağacı yağı ise ışık ve oksijene karşı daha dayanıklıdır. Ayrıca çay ağacı yağının antimikrobiyal ve anti inflamatuvar özelliği de kompleks oluşumuyla birlikte artar (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

Ağız bakım ürünlerinde kullanılan mentolün acı tadının giderilmesi için  $\beta$ -CD ile kompleksi hazırlanabilir. Ortam koşullarına dayanıklı olmayan A ve E vitamininin CD'ler ile kompleksi hazırlanarak toz haline getirildiği, bu sayede dayanıklılığının arttığı gözlenmiştir. Cilt rengini açmak amacıyla kullanılan hidrokinon düşük pH aralığında karardır. CD ile kompleksi hazırlandığında kararlılığı ve depigmentasyon özelliği artar (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

Melanin oluşumunu engelleyerek deri renginin açılmasını sağlayan kojik asidin çözünürlüğü azdır ve ışıktan kolaylıkla etkilenir. Isı veya ışık ile bozduğunda rengi yeşilimsi kahverengiye dönüşür.  $\beta$ -CD ile kompleksi hazırlanan kojik asidin çözünürlüğünün dolayısıyla etkinliğinin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca kararlılığı da artmıştır (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

Salisilik asit keratolitik ve antibakteriyeldir. Kendisinin ve türevlerinin sudaki çözünürlüğü düşüktür. CD kompleksinin, salisilik asidin çözünürlüğünü ve keratolitik özelliğini arttırdığı ve anti akne özelliğini iyileştirdiği gözlenmiştir (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

Akne tedavisinde kullanılan retinoik asit suda çözünmez, hava ve ışığa duyarlıdır.  $\beta$ -CD ile kompleksi hazırlandığında çözünürlüğünün arttığı, yan etkilerinin azaldığı, anti akne ve nemlendirici özelliğinin iyileştiği gözlenmiştir (Kılıç Şen , 2000).

Retinol UV hasarına uğramış cildi yeniler ve yaşlanma karşıtı preparatların formülasyonlarında kullanılır. Fakat UV ışığından ve oksijenden kolaylıkla etkilenir. CD kompleksi ise daha dayanıklıdır. Retinol palmitat ve  $\beta$ -CD kompleksi etkinliğinin iyi olduğu bilinmektedir (Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

CD kompleksleri ile deodorant hazırlanırken antimikrobiyal etkinin yanında uzamış bir parfüm salımı ile estetiğin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca esansların, yüzey etkin maddeye gerek duyulmaksızın çözünürlüğü artmıştır (Tanaka vd., 1996).

İnklüzyon bileşiği yüksek enerjili bir bariyer oluşturarak uçuculuğu azaltır ve uzun süreli koku sağlar. Ayrıca kötü kokulu merkaptanların uçuculuğunu azaltması sebebiyle de saç bakım ürünlerine eklenebilir (Arslan, 2012). Uçucu yağların ve esansların mikroenkapsülasyonları arasında en etkili yöntem  $\beta$ -CD ile kompleksinin hazırlanmasıdır. Bu kompleks ile uçuculuğu azaltılarak daha uzun süreli etki elde

edilebilir (Buschmann & Schollmeyer, 2002). Silika bazlı CD'ler, triklosanın kullanılabilirliğini artırarak diş macunlarının antimikrobiyal etkinliğini arttırmaktadır.

Antiseptik özellik gösteren iyodun  $\alpha$ -CD ile kompleksi hazırlandığında oda sıcaklığında 16 ay kalabilecek şekilde kararlılığının arttığı, suda çözünürlüğünün arttığı, uçuculuğunun ise azaldığı gözlenmiştir (Leroy-Lechat vd., 1992; Tomono vd., 2002). Oksidasyona hassas saç boyalarının CD ile inklüzyon kompleksi hazırlandığında raf ömrü uzamıştır ve klasik boyalara göre kalıcılığı artmıştır (Duchene vd., 1999). CD ile hazırlanan kozmetik preparat örnekleri **Tablo 2.6.**'da sunulmuştur.

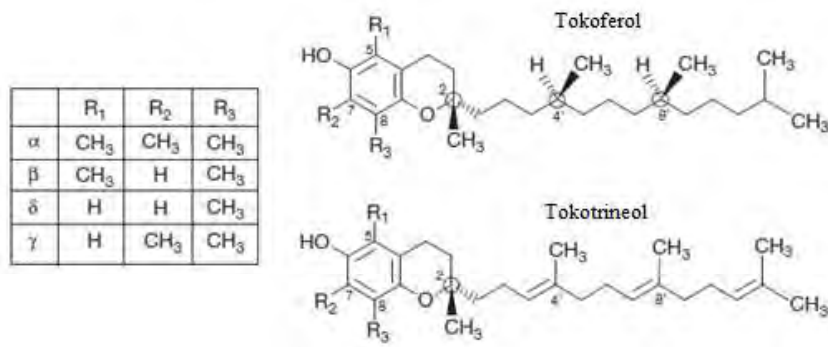
**Tablo 2.6.** Siklodekstrin ile hazırlanmış kozmetik preparatlar (Duchene vd., 1999; Buschmann ve Schollmeyer, 2002).

Madde	Etkisi	Siklodekstrinin kullanım amacı	Ürün
Çay ağacı yağı	Antimikrobiyal	Stabilizasyon	Epicutin TT Pickelex
Salisilik asit	Antibakteriyel Keratolitik	Çözünürlük artışı, iritasyon azalması	Lipo CD- SA
Tokoferol	Kozmetik etkin madde	Çözünürlük artışı	Luminys Cream
Retinol	Anti aging	Stabilizasyon	Dexol A
Dihidroksi aseton	Bronzlaştırıcı	Yavaş salım	Ultrasun Selftan
L-karnitin	Anti selülit	Etki artışı	Cellutex Cream
$\beta$ -CD	-	Yağ absorblama	Klorane kuru şampuan

#### 2.4. E Vitamini

E vitamini, ilk kez 1922 yılında Herbert M. Evans ve Katharine Bishop tarafından keşfedilmiş ve 1936 yılında izole edilmiştir (Konger, 2006). Bir kromanol halkası ve izoprenoid zincirinden oluşmaktadır (Al-Salih vd., 2013). Yağda çözünen bir vitamindir. İnsan vücudunda sentezlenemez, bitkisel ürünlerden ve en çok da tohum ve meyvelerden

alınır. Derinin bütün tabakalarında bulunur. Plazma, membran ve dokulardaki ana lipofilik antioksidandır. Yaşlanma ile birlikte zamanla azalmaktadır. 4 adet tokoferol formu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) ve 4 adet tokotrineol formu ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) mevcuttur (Altiner vd., 2017; Aktürk, 2017). Tokoferol ve tokotrineol türevlerinin kimyasal yapısı **Şekil 2.12.**'de sunulmuştur. E vitamini tokoferol ve tokotrineol türevlerinin genel adıdır. Tokoferol ise biyolojik aktiviteye bakılmaksızın mono-, di-, trimetiltokokromanollerin genel tanımıdır ve E vitamini ile eş anlamlı bir terim değildir (Craft, 2016).



**Şekil 2.12.** Tokoferol ve tokotrineol türevlerinin kimyasal yapısı (Craft, 2016).

E vitamininin ana antioksidan rolünün, genel olarak lipit peroksil radikallerini temizleyerek zincir çoğalmasının durdurulması olduğu düşünülmektedir. Tokoferolün ilk oksidasyon ürünü, tokofetanlar tarafından tokoferole indirgenebilen veya tokoferol kinaz vererek reaksiyona girebilen metastatik tokoferoksil radikalidir. Askorbat ve glutatyon gibi birkaç hidrofilik koantioksidan, E vitaminini tokoferoksil radikalinden yeniden üretir ve böylece E vitaminin antioksidan kapasitesini artırır (Thiele vd., 2005; Türsen, 2006).

Deride normal fonksiyonlar sonucunda oksidatif ürünler açığa çıkabilir. Ayrıca stres, yanlış beslenme, UV ışınları (UVA: 320-340 nm, UVB: 290-320 nm) gibi faktörler bu serbest oksijen radikallerinin artmasına neden olabilir. Bu radikaller DNA hasarına ve hücre membranı, protein ve lipitler üzerinde hasara neden olur (Baumann ve Spencer, 1999). Fakat vücutta bu radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için enzimatik ve nonenzimatik antioksidatif savunma mekanizmaları mevcuttur. Antioksidan moleküller, dört farklı yolla serbest oksijen radikallerini bertaraf ederek antioksidatif özellik gösterirler. Bu yollar:

1. Toplayıcı etki; serbest oksijen moleküllerini zayıf moleküllere dönüştürme,

2. Bastırıcı etki; oksidan moleküllerde saldırgan yapının sebebi olan eksik –H molekülünü tamamlama ve aktivitelerini azaltma,
3. Zincir kırıcı etki; serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırarak fonksiyonlarını bozma,
4. Onarıcı etki; serbest oksijen radikallerinin çevre dokularda verdiği hasarı onarma şeklindedir (Aktürk, 2017).

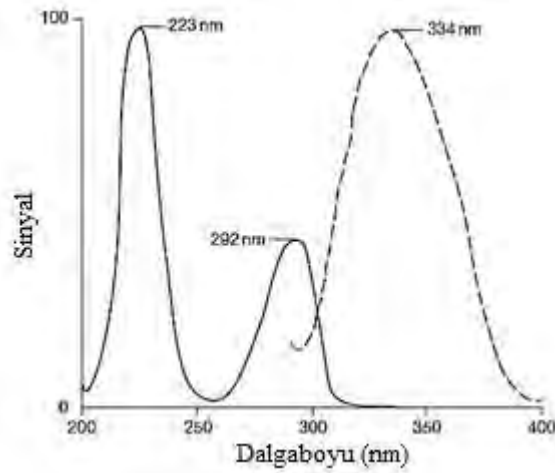
Serbest oksijen radikallerinin artması durumunda antioksidatif savunma mekanizmaları yeterli olmayacak ve oksidatif stres durumu ortaya çıkacaktır. Oksidatif stresin ise deride yaşlanma belirtilerinin artması ve cilt hastalıklarının yaygınlaşmasına ve deri kanserlerine neden olduğu bilinmektedir. İşte böyle durumlarda eksojen antioksidanların alınması gereklidir. Bu eksojen antioksidanlardan biri de E vitamininin aktif formu  $\alpha$ -TC'dir.  $\alpha$ -TC güçlü bir antioksidandır ve cilt sağlığı için önemlidir (Aktürk, 2017).

$\alpha$ -TC oda sıcaklığında hafif kokulu viskoz bir yapıdadır, açık sarı renktedir. Pratik olarak suda çözünmez; alkol, kloroform gibi organik bir çözücüde çözünebilir (Fiume, 2002). Oksijen ve ışık varlığında kararlı değildir, sıcaklıkla bozunma hızı artar, hava ile temas sonrası kararır, UV ışıkta dekompoze olur, oksijen ve ışık olmadığında yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır (Fiume, 2002).  $\alpha$ -TC'nin bazı özellikleri **Tablo 2.7.**'de, UV absorbans spektrum ve floresans emisyon spektrumu ise **Şekil 2.13.**'de verilmiştir (Fiume, 2002; Craft, 2016).

$\alpha$ -TC, antioksidan özelliğini lipit ve lipit peroksil radikallerine hidrojen vererek yani bastırıcı etki şeklinde gösterir.  $\alpha$ -TC esansiyel bir kofaktördür ve lipitlerin oksidasyonunu önler (Aktürk, 2017; Altner vd., 2017).  $\alpha$ -TC kimyasal olarak en aktif form olmasına rağmen ışığa ve ısıya dayanıksız olması sebebiyle bu haliyle antioksidan olarak kullanılamaz. Ester formu daha kararlıdır fakat daha az antioksidatif özellik taşır (Özer, 2015). Esterifikasyon fenolik hidroksi grubunda gerçekleştiğinden, antioksidan etki azalır (Lautenschläger, 2011).

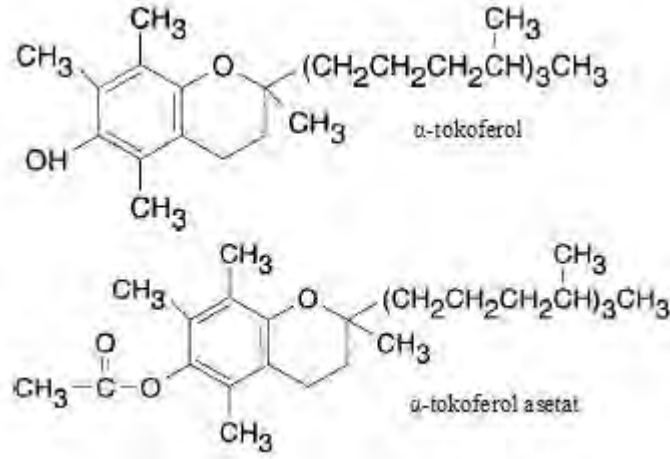
**Tablo 2.7.**  $\alpha$ -TC'nin bazı özellikleri (Fiume, 2002).

$\alpha$ -TC	
Molekül ağırlığı	430.7 g/mol
Kimyasal formülü	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>
Dansitesi (25 °C)	0.947-0.958
Erime noktası	3 °C
Kaynama noktası	200-220 °C
UV spektrofotometrede absorbanı	290-300 nm



**Şekil 2.13.**  $\alpha$ -TC'nin UV absorbanı spektrumu ve floresans emisyon spektrumu (Craft, 2016).

$\alpha$ -TC asetat, antiinflamatuvar özellik gösterir. Ayrıca  $\alpha$ -TC'nin membran proteinlerini koruyucu özellik gösterdiği de bilinmektedir. Transdermal su kaybını önleyen  $\alpha$ -TC'nin asetat ve linoat formu nemlendirici, güneşten koruyucu ve güneş sonrası bakım yapan ürünler ve antiaging ürünler gibi kozmetik ve kozmesötik ürünlerin içerisine eklenmektedir (Konger, 2006; Mevlitoğlu vd., 2009; Türsen, 2006).  $\alpha$ -TC ve  $\alpha$ -TC asetat'ın kimyasal yapıları **Şekil 2.14.**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.14.  $\alpha$ -TC ve  $\alpha$ -TC asetat'ın kimyasal yapıları (Fiume, 2002).

Dermatolojik olarak da önemli olan  $\alpha$ -TC, topikal olarak uygulandığında transdermal su kaybını azaltır. *Stratum Corneum*'un hidrasyonunu ve su bağlama kapasitesini artırır, hücre yenilenmesini teşvik eder (Lautenschläger, 2011). Cilt kuruluğuna bağlı oluşan yaşlanma belirtilerinin iyileşmesine yardımcı olur. Kırıksıklık ve deri pürüzlülüğünü azaltır. Protein kinaz C'yi inhibe ederek yaşlanma belirtilerinin ortaya çıkmasına neden olan kollojenaz inhibisyonunu azaltır. Ayrıca topikal E vitaminin fotoprotektif ve antikarsinojenik etkileri de vardır (Türsen, 2006; Gianeti vd., 2012; Fiume, 2002).

E vitamini, fotokoruma sağlayabilmesi için, tokoferol yapısının parçalanmasını önleyecek diğer antioksidanlar ile kombine halde kullanılmalıdır (Türsen, 2006), (Mevlitoğlu vd., 2009). Örneğin, koenzim Q'nun geri dönüşüm mekanizmalarıyla tokoferolü fotooksidasyondan koruduğuna dair kanıtlar vardır. Antioksidan askorbat, glutatyon ve koenzim Q gibi koantioksidanların eksikliği, E vitamininin antioksidan özelliklerini azaltabilir. Nonenzimatik *Stratum Corneum* antioksidanlarını araştıran bir dizi çalışma, insan cildinde E vitamininin *Stratum Corneum* ve dermiste baskın olan fizyolojik bariyer antioksidanı olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, yaşlanma belirtileri gösteren kişilerde, cilt bariyerinin ve üst dermisin antioksidan koruma eksikliği gösterdiğini ortaya koymaktadır. UV maruziyetinde, en belirgin oksidatif protein hasarını gösteren kutanöz bölgelerdir. Buna bağlı olarak, E vitamini ve sinerjistik olarak aktif olan koantioksidanlar, C vitamini gibi antioksidan takviyeler, güneş koruyucularının foto-koruyucu stratejilerini arttırabilir (Gianeti vd., 2012; Thiele vd., 2005).

Ayrıca antioksidan kombinasyonlarının kozmetik ürün içeriğine eklenmesi, ürünün dayanıklılığın artmasına yardımcı olur ve raf ömrünü uzatır. Örneğin E vitamininin A ve C vitaminleri ile kombinasyonunun kullanılması sonucunda serbest radikal yakalayıcı, DNA hasarını ve keratinosit ölüm hızını azaltıcı etkileri artarken *Stratum Corneum*'un nemlenmesi de artar ve cilt pürüzlülüğü azalır (Gianeti vd., 2012; Thiele vd., 2005).

Tek başına kullanılan A, E ve C vitaminleri ile bunların kombinasyonlarıyla hazırlanan kozmetik ürünlerin raf ömürleri karşılaştırıldığında kombinasyonların eklendiği ürünün raf ömrünün daha uzun olduğu gözlenmiştir. Diğer vitaminler ile E vitamininin tek başına eklendiği ürünün raf ömrü karşılaştırıldığında tokoferol asetat eklenen ürünün raf ömrünün daha uzun olduğu **Tablo 2.8.**'de görülmektedir (Gianeti vd., 2012).

**Tablo 2.8.** A, C ve E vitamin türevleri eklenen ürünlerin raf ömrü (Tek başlarına farklı formülasyonlarda veya kombinasyon halinde aynı formülasyonda ilave edildiklerinde) (Gianeti vd., 2012).

Vitamin Türevleri	Raf Ömrü (Gün)	
	Yalnız	Kombinasyon halinde
Retinil Palmitat	61	120
Askorbil Tetraisopalmitat	173	318
Tokoferil Asetat	757	1116

Antioksidan özellikleri veya cilde sağladığı yararların yanı sıra, topikal E vitamini uygulaması ile bazı hastalarda deride nadiren de olsa kontakt dermatit, kaşıntı ve döküntü gözlenebilir. Bunun sebebi  $\alpha$ -TC eklenen ürünün, saklama koşullarının uygun olmaması sebebiyle, kolayca okside olmasıdır (Baumann ve Spencer, 1999; Çayırılı ve Açıkgoz, 2013; Tanaydin vd., 2016).

### 3. GEREÇLER

#### 3.1. Kullanılan Maddeler

$\alpha$ -Tokoferol	Fluorochem, Birleşik Krallık
Rastgele Metillenmiş $\beta$ Siklodekstrin (RAMEB)	CTD, Inc., ABD
Hidroksipropil $\beta$ Siklodekstrin (HPBCD)	Applichem, Almanya
Asetonitril	Merck, Almanya
Metanol	Merck, Almanya
Etanol	Merck, Almanya
Dötorokloroform (CDCl <sub>3</sub> )	Merck, Almanya
Sodyum Lauril Sülfat	Merck, Almanya

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı	Ohaus E1 2140, ABD
Yatay Çalkalayıcı	WiseShake SHR-1D, Yeni Zelanda
Döner Buharlaştırıcı	Büchi R-205, ABD
Derin Dondurucu	Liebherr LGEX 3410 Medline, İsviçre
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Shimadzu 20-A, Japonya
UV- Spektrofotometre	Shimadzu, 160-A, Japonya
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC)	Shimadzu DSC-60, Japonya
FT-IR	Perkin Elmer Spectrum 2000, ABD
<sup>1</sup> H-NMR	Bruker Ultra Shield CPMAS NMR 500 MHz, Almanya
pH Metre	WTW Profi Lab pH 597, Almanya
Viskozimetre	Brookfield Reometre DV-III Ultra, ABD
Etüv 40 °C	Nüve, EN055/120, Türkiye
4°C Saklama Dolabı	Liebherr Medline, İsviçre
Manyetik Karıştırıcı	Wisd Laboratory Instruments, Daihan SMH5-3, Kore
Santrifüj	Eppendorf, Centrifuge 5417r, ABD
Ultrasonik Banyo	Elma T470/ H Singen, Almanya

Vortex

IKA, Almanya

Liyofilizatör

Leybold-Heraeus Lyovac GT-2

Germany

SEM

Zeiss, Supratm 50 VP, Almanya

## 4. YÖNTEMLER

### 4.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları

Araştırmanın çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında UV Spektrofotometri yöntemi,  $\alpha$ -TC/CD komplekslerindeki kantitatif analizler için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. Yöntemlerin uygunluğunu ve elde edilecek sonuçların doğruluk ve güvenilirliğini verilerle ispatlamak amacıyla, her iki yöntem de Uluslararası Harmonizasyon Konseyi (ICH) kılavuzları doğrultusunda doğrusallık, doğruluk, kesinlik, çalışma aralığı, seçicilik, hassasiyet ve kararlılık parametreleri değerlendirilmiştir (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A (R2), 2005).

#### 4.1.1. HPLC yöntem validasyonu çalışmaları

$\alpha$ -TC'nin literatürdeki HPLC ile yapılmış olan çalışmaları incelenerek, laboratuvarımızdaki HPLC cihaz ve ekipmanı ile ön denemeler yapılmıştır (Gupta vd., 2013; Scalia vd., 1995; Başığit vd., 2018). Ön denemeler ile pik alıkonma zamanı ve morfolojisi açısından uygunluğuna karar verilen yöntem ile çalışmalara devam edilmiştir (Başığit vd., 2018) (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.**  $\alpha$ -TC'nin yüksek performanslı sıvı kromatografisi çalışma koşulları (Başığit vd., 2018).

<b>Cihaz</b>	Shimadzu- 20A
<b>Kolon</b>	C18 (250mm X 4.6, 5 $\mu$ m)
<b>Kolon Sıcaklığı</b>	30 °C
<b>Çözücü Sistemi</b>	Metanol/ Asetonitril 95:5 (h/h)
<b>Dedektör</b>	Diodearray
<b>Çalışılan Dalga Boyu</b>	292 nm
<b>Akış Hızı</b>	1 mL.dk <sup>-1</sup>
<b>Enjeksiyon Hacmi</b>	20 $\mu$ L

#### **4.1.1.1. Doğrusallık**

$\alpha$ -TC'un HPLC yönteminde kullanılacak standart eğrisinin belirlenmesi amacıyla, 10 mg  $\alpha$ -TC, 10 mL mobil faz (metanol:asetonitril 95:5, *h/h*) içerisinde çözündürülerek 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltinin mobil faz ile seyreltilmesi ile 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda çalışma stoğu hazırlanmıştır. Çalışma stoğundan 15-90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyon (15, 30, 45, 60, 75, 90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ile çalışmalar yapılmıştır. Hazırlanan çözeltiler **Tablo 4.1.**'de belirtilen şartlarda HPLC'ye enjekte edilerek  $\alpha$ -TC'nin konsantrasyonuna karşılık gelen pik alanları bulunmuştur. Elde edilen pik alan değerleri ile çözeltilerin teorik konsantrasyonları kullanılarak regresyon eşitliği oluşturulmuş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.1.1.2. Doğruluk**

Doğruluk çalışmaları için, çalışma stoğunun mobil faz ile seyreltilmesi ile çalışma aralığının en alt, orta, en üst konsantrasyonlarındaki (15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) çözeltiler hazırlanmış ve HPLC yöntemi ile analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanlarının regresyon eşitliği ile hesaplamaları yapılarak, teorik  $\alpha$ -TC konsantrasyonları ile pratik olarak bulunan değerler karşılaştırılmış ve yöntemin doğruluğu yüzde geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Konsantrasyonu bilinen üç farklı örnek üzerindeki çalışmalar üç kez tekrarlanmıştır.

#### **4.1.1.3. Kesinlik**

Kesinlik çalışmaları 3 farklı konsantrasyon ile 6 tekrarlı olarak 3 farklı günde çalışılarak gerçekleştirilmektedir. Bu amaçla  $\alpha$ -TC'nin üç farklı konsantrasyonda (15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 45  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) çözeltileri doğruluk çalışmasında açıklandığı şekilde hazırlanmış ve HPLC ile analiz edilmiştir. Her gün için ayrı bir çalışma stoğu hazırlanmış, elde edilen sonuçlar ile yöntemin gün-içi ve günler-arası kesinlik değerleri hesaplanmıştır.

#### **4.1.1.4. Çalışma aralığı**

Analitik yöntemin doğrusallık, doğruluk ve kesinlik koşullarına sahip olduğunun gösterilmesi için çalışılan aralık, örneğin alt ve üst konsantrasyonlarının aralığıdır. Bu aralık doğrusallık çalışmaları ile belirlenmiştir.

#### 4.1.1.5. *Hassasiyet*

Hassasiyet çalışmalarında, sistemin kantitatif sınırlar içerisinde girmeyen en düşük derişimi olan LOD değeri aşağıdaki eşitlik (4.1) yardımıyla hesaplanmıştır (ICH Q2B, 1996).

$$\text{LOD} = \frac{[3.3 \times \text{SS}]}{m} \quad (4.1)$$

(SS: y eksenini kesim değeri nin standart sapması, m: regresyon eğrisinin eğimi)

Analizi yapılan örneğin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının belirlenebildiği LOQ değeri ise eşitlik (4.2) kullanılarak belirlenmiştir (ICH Q2B, 1996).

$$\text{LOQ} = \frac{[10 \times \text{SS}]}{m} \quad (4.2)$$

(SS: y eksenini kesim değeri nin standart sapması, m: regresyon eğrisinin eğimi)

#### 4.1.1.6. *Seçicilik*

HPLC analizlerinde kullanılan yöntemin, mobil faz ve çözünme hızı çalışma ortamında  $\alpha$ -TC için seçici olduğunu göstermek amacıyla, mobil faz, çözünme hızı çalışma ortamı,  $\alpha$ -TC'un mobil faz içerisindeki çözeltisi ve  $\alpha$ -TC'un çözünme hızı ortamındaki çözeltisi HPLC ile aynı şartlarda analiz edilerek kromatogramları karşılaştırılmıştır.

#### 4.1.1.7. *Kararlılık*

Çözünme hızı çalışma ortamındaki kararlılığı incelemek üzere,  $37 \pm 0.5$  °C'deki etanol:fosfat tamponu (76:24, *h/h*, pH 7.4) içerisinde  $\alpha$ -TC'un  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti aynı sıcaklıkta ışıktan korunarak bekletilmiş ve belirli zaman aralıklarında (1, 2, 4, 8, 12, 24 ve 48. saat) HPLC ile analiz edilerek konsantrasyondaki olası değişimler takip edilmiştir. Çalışma üç kez tekrar edilmiştir.

#### 4.1.2. *UV Spektrofotometri yöntem validasyonu çalışmaları*

UV Spektrofotometre ile validasyon çalışmalarına başlamadan önce, CD komplekslerini hazırlamayı planladığımız 2:1 *h/h* oranında etanol:su içeren çözücü

ortamında  $\alpha$ -TC'un UV spektrumunu alarak, analizlerin yapılacağı maksimum dalga boyu ( $\lambda_{\text{maks}}$ ) belirlenmiştir. UV Spektrofotometri yönteminin validasyon çalışmalarında, ICH kılavuzları doğrultusunda doğrusallık, doğruluk, kesinlik, çalışma aralığı, seçicilik ve hassasiyet parametreleri değerlendirilmiştir (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A (R2), 2005).

#### **4.1.2.1. Doğrusallık**

$\alpha$ -TC'nin UV Spektrofotometri yönteminde kullanılacak standart eğrisinin belirlenmesi amacıyla, 12 mg  $\alpha$ -TC 12 mL etanol:su 2:1 (*h/h*) çözücü ortamında çözüldürülerek konsantrasyonu 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  olan stok çözelti elde edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerden seyreltmeler yapılarak 20-120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığında 6 farklı konsantrasyon (20, 40, 60, 80, 100, 120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin absorbansları  $\lambda_{\text{maks}}$  olarak belirlenen 292 nm'de çözücüye karşı ölçülmüştür.  $\alpha$ -TC konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri kullanılarak regresyon eşitliği oluşturulmuş ve korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. Çalışma 3 kez tekrarlanmıştır.

#### **4.1.2.2. Doğruluk**

Doğruluk çalışmaları için, stok çözeltinin çözücü (2:1, etanol:su, *h/h*) ile seyreltilmesi ile çalışma aralığının en alt, orta, en üst konsantrasyonlarındaki (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) çözeltiler hazırlanmış ve UV Spektrofotometre ile 292 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Ölçülen absorbans değerlerinin regresyon eşitliği ile hesaplamaları yapılarak, teorik  $\alpha$ -TC konsantrasyonları ile pratik olarak bulunan değerler karşılaştırılmış ve yöntemin doğruluğu yüzde geri kazanım olarak hesaplanmıştır. Çalışmalar altı kez tekrarlanmıştır.

#### **4.1.2.3. Kesinlik**

Kesinlik çalışmaları için  $\alpha$ -TC'nin üç farklı konsantrasyondaki (20  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) çözeltileri, stok çözeltilerden hareketle doğruluk çalışmasında açıklandığı şekilde hazırlanmış ve UV spektrofotometre ile 292 nm'de absorbansları ölçülmüştür. Her gün için ayrı bir çalışma stoğu hazırlanmış, elde edilen sonuçlar ile yöntemin gün-içi ve günler-arası kesinliğini gösteren RSD değerleri hesaplanmıştır. Çalışmalar 3 ayrı gün için her bir konsantrasyonda 6 tekrarlı yapılmıştır ( $k=3$ ,  $n=6$ ).

#### 4.1.2.4. Çalışma aralığı

UV Spektrofotometrik yöntemin doğrusallık, doğruluk ve kesinlik koşullarına sahip olduğunun gösterilmesinde kullanılan en alt ve en üst konsantrasyonlar (20-120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) çalışma aralığıdır.

#### 4.1.2.5. Hassasiyet

$\alpha$ -TC'nin UV Spektrofotometrik miktar tayininin hassasiyet değerlendirmelerinde, LOD ve LOQ değerleri, HPLC yöntem validasyonu bölümünde sunulan ilgili eşitlikler (4.1 ve 4.2) yardımıyla hesaplanmıştır (ICH Q2B, 1996).

#### 4.1.2.6. Seçicilik

$\alpha$ -TC 292 nm dalga boyunda maksimum absorbans göstermektedir. HPBCD ve RAMEB'in bu dalga boyunda  $\alpha$ -TC ile girişim yapıp yapmadığının gösterilmesi ve yöntemin seçiciliğinin belirlenmesi için, etanol:su (2:1, *h/h*) çözücü sistemi içerisinde saf  $\alpha$ -TC, saf HPBCD, saf RAMEB'in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanmış ve UV spektrofotometre ile spektrumları alınmıştır.

### 4.2. $\alpha$ -Tokoferol ile Yapılan Çalışmalar

#### 4.2.1. Çözünürlük tayini

$\alpha$ -TC'nin saf sudaki çözünürlüğünün saptanabilmesi için, balonjojelere konulan saf su üzerine  $\alpha$ -TC'nin aşırı miktarı konulmuş ve oda sıcaklığında 1 gün manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 0.45  $\mu\text{m}$  por çapına sahip PTFE filtreden süzülerek alınan örnekler HPLC cihazı ile analiz edilmiş ve suda hiç çözünmediği tespit edilmiştir. Bunun üzerine suya %1 konsantrasyonda sodyum lauril sülfat (SLS) eklenerek çalışma aynı şekilde yeniden yapılmıştır. Deney üç kez tekrarlanmıştır.

#### 4.2.2. Termal analiz

$\sim 4$  mg ağırlığındaki  $\alpha$ -TC'nin termal analizi diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) cihazı kullanılarak, basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 40 mL.dk<sup>-1</sup> azot gazı akış hızı, 10°C.dk<sup>-1</sup> ısı artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve maddenin termogramı elde edilmiştir.

### 4.2.3. FT-IR Analizi

$\alpha$ -TC'nin Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi (FT-IR) analizi, 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  dalga boyu aralığında, potasyum bromür (KBr) ile hazırlanan diski kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 4.2.4. $^1\text{H-NMR}$ Analizi

$\alpha$ -TC'nin  $^1\text{H-NMR}$  analizi  $25^\circ\text{C}$ 'de, çözücü olarak dötorokloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) kullanılarak yapılmıştır.

## 4.3. $\alpha$ -Tokoferol/Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

### 4.3.1. Çözünürlük faz diyagramlarının ve kompleksleşme oranlarının belirlenmesi

Çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında kullanılacak denge süresinin belirlenmesi amacıyla saf su içerisinde belirli konsantrasyonlarda HPBCD ve RAMEB içeren çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilere aşırı miktarlarda  $\alpha$ -TC ilave edilerek 225 vuruş/dakika hız ile yatay çalkalayıcıda ışıktan korunarak çalkalamaya bırakılmıştır. 24 saat aralıklarla 7 gün boyunca her bir çözeltiden alınan örnekler  $0,45 \mu\text{m}$  por çapına sahip PTFE filtreden süzülerek HPLC ile analiz edilmiş ve çözünürlük artışının tamamlandığı 3. gün denge süresi olarak tespit edilmiştir.

Denge süresi belirlendikten sonra, 2:1 etanol:su ( $h/h$ ) çözücü sisteminde hazırlanmış artan konsantrasyonlardaki (0-30 mM) HPBCD ve RAMEB çözeltileri içerisine  $\alpha$ -TC'nin aşırı miktarı eklenerek denge süresince (3 gün) yatay çalkalayıcıda 225 vuruş/dakika hız ile çalkalanmıştır. Fotokimyasal bozunmanın önlenmesi için, tüpler çalkalama sırasında alüminyum folyo ile sarılmıştır. Sürenin sonunda çözeltiler  $0,45 \mu\text{m}$  por çapına sahip PTFE filtreden süzülmüş, elde edilen süzüntü 1/10 oranında seyreltilerek UV spektrofotometrede absorbans değerleri ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri ve daha önceden 2:1 etanol:su ( $h/h$ ) ortamında oluşturulan regresyon eşitliği kullanılarak miktar tayini yapılmıştır. Çalışma her iki CD ve çalışılan tüm konsantrasyonlar için 6 kez tekrarlanmıştır (Demirel vd., 2006).

CD konsantrasyonlarına karşılık  $\alpha$ -TC konsantrasyonlarına ait değerlerin grafiğe geçirilmesi ile oluşturulan diyagramlar yardımıyla faz diyagram tipleri belirlenmiş,

Higuchi eşitliğine göre kompleks oluşturma oranları ve Eşitlik 4.3 ile kararlılık sabitleri ( $K_c$ ) hesaplanmıştır (Higuchi ve Connors, 1965; Ataç vd., 2016; Del Valle, 2004).

$$K_c = \text{eğim} / \text{kesişim} (1 - \text{eğim}) \quad (4.3)$$

#### 4.3.2. İnküzyon komplekslerinin hazırlanması

$\alpha$ -TC ve CD içeren kompleksler çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında belirlenen  $A_L$  tipi nedeniyle 1:1 etkin madde:CD molar oranı kullanılarak dondurarak kurutma yöntemi ile hazırlanmıştır.

$\alpha$ -TC/HPBCD kompleksinin hazırlanabilmesi için 100 mg  $\alpha$ -TC tartılarak, 78 mL etanol:su (2:1,  $h/h$ ) karışımında çözündürülmüştür. Elde edilen berrak çözelti manyetik karıştırıcıda karıştırılırken üzerine, 1:1 molar oranına karşılık gelen 338,98 mg HPBCD eklenmiştir. Karışım denge süresince yatay çalkalayıcı ile 225 vuruş/dakika hızla ışıktan korunarak çalkalanmıştır. Sürenin sonunda çözelti derin dondurucuya alınarak -80 °C de 1 gün bekletilerek dondurulmuştur. Ertesi gün donmuş olan çözeltiler, önceden -80 °C'ye soğutulan liyofilizatöre erimeden konulmuş ve kompleksler kuru toz formda elde edilmiştir (Güleç ve Demirel, 2016). Kompleksler karakterizasyon çalışmalarında kullanılmaya kadar desikatörde ağzı sıkı kapalı kaplarda ışıktan uzakta bekletilmiştir.

$\alpha$ -TC/RAMEB kompleksinin hazırlanabilmesi için de 100 mg  $\alpha$ -TC tartılmış ve 78 mL etanol:su (2:1,  $h/h$ ) karışımında çözündürülmüştür. Bu çözelti de manyetik karıştırıcıda karıştırılırken üzerine 1:1 molar oranına karşılık gelen 304,62 mg RAMEB eklenmiştir. HPBCD kompleksi için yukarıda anlatılan basamaklar aynı şekilde gerçekleştirilerek liyofilizasyon ile kuru toz formdaki kompleksler elde edilmiş ve analizlere kadar desikatörde saklanmıştır.

#### 4.3.3. İnküzyon kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar

##### 4.3.3.1. Sudaki çözünürlük çalışmaları

Kompleksleşme sonrasında  $\alpha$ -TC'nin çözünürlüğündeki artışın tespiti için, HPBCD ve RAMEB ile hazırlanan komplekslerin aşırı miktarları %1 SLS içeren saf su içerisine konulmuş ve oda sıcaklığında 1 gün manyetik karıştırıcıda 100 rpm'de karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 0.45  $\mu$ m por çapına sahip PTFE filtreden süzülerek alınan örnekler HPLC cihazı ile analiz edilmiş ve çözünen  $\alpha$ -TC miktarları hesaplanmıştır. Deneyle her bir kompleks için üçer kez tekrarlanmıştır.

#### **4.3.3.2. Morfolojik analiz**

Saf CD'ler ve bu CD'ler ile hazırlanan CD komplekslerinin morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesi için, numunelerin fotoğrafları farklı büyütmelemlerle 3kV voltaj ile taramalı elektron mikroskobu (SEM, Zeiss, Supratm 50 VP, Almanya) kullanılarak çekilmiştir.

#### **4.3.3.3. Termal analiz**

Etkin madde, saf CD'ler, etkin madde/CD fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin termal davranışlarını belirlemek üzere diferansiyel taramalı kalorimetre (DSC) kullanılmıştır. Her bir örnek basınç yardımıyla kapatılmış alüminyum örnek kabında, 40 mL.dk<sup>-1</sup> azot gazı akış hızı, 10°C.dk<sup>-1</sup> ısı artışı ile 30-300°C aralığında alüminyum referansa karşı analiz edilmiş ve örneklere ait termogramlar elde edilmiştir.

#### **4.3.3.4. FT-IR analizi**

Etkin madde, saf CD'ler, etkin madde/CD fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin FT-IR analizi, 4000-400 cm<sup>-1</sup> dalga boyu aralığında, potasyum bromür (KBr) ile hazırlanan diski kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

#### **4.3.3.5. <sup>1</sup>H-NMR analizi**

$\alpha$ -TC, saf CD'ler, etkin madde/CD fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin <sup>1</sup>H-NMR analizi 25°C'de, çözücü olarak dötörokloroform (CDCl<sub>3</sub>) kullanılarak yapılmıştır. <sup>1</sup>H-NMR sonuçlarına göre protonlardaki kimyasal kaymalar ( $\Delta\delta$ ) Eşitlik 4.4.'e göre değerlendirilerek ilaç:CD etkileşmesinin kuvveti araştırılmıştır.

$$\Delta\delta = \delta(\text{Kompleks}) - \delta(\text{Serbest}) \quad (4.4.)$$

#### **4.3.3.6. Enkapsülasyon etkinliği**

Hazırlanan komplekslerde enkapsülasyon etkinliği (EE)'nin tespit edilmesi için, 1 mL mobil faz içerisinde 3 mg kompleks çözündürülmüş, elde edilen çözelti 1:10 oranında mobil faz ile seyreltilerek HPLC cihazında miktar tayini gerçekleştirilmiştir. Miktar tayini ile elde edilen sonuçlar ve Eşitlik 4.5. kullanılarak EE hesaplanmıştır (Das vd., 2010; Gupta vd., 2010). Aynı çalışmalar her iki kompleks için üçer kez yapılmıştır.

$$\begin{aligned} \text{Enkapsülasyon etkinliği (\%)} & \quad (4.5) \\ & = [(\text{Enkapsüle edilen etkin madde miktarı}) : (\text{Formülasyondaki etkin madde miktarı})] \times 100 \end{aligned}$$

#### 4.3.3.7. Çözünme hızı çalışmaları ve çözünme profillerinin benzerliği

CD komplekslerinin in vitro ilaç salım özellikleri, modifiye edilmiş bir diyaliz torbası difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Al-Heibshy vd., 2020). 34 mg  $\alpha$ -TC'e eşdeğer miktarda  $\alpha$ -TC içeren CD kompleksleri alt tarafı bağlanmış silindirik diyaliz membran (10 kDa MWCO) içerisine 1 mL çözünme ortamı ve manyetik balık ile birlikte yerleştirilmiş, membran üstten sıkıca bağlanarak diyaliz torbası hazırlanmıştır. Diyaliz torbası 50 mL etanol:fosfat tamponu (76:24, h/h) (pH 7.4) içeren bir behere konulmuştur (Ying vd., 2017). Çalışma  $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 'de 100 rpmlik manyetik bir karıştırma hızı ile gerçekleştirilmiştir. 1 mL örnekler önceden belirlenmiş zaman aralıklarında (1, 4, 8, 12, 20, 24, 30, 36, 46 ve 48 saat) alınmış ve sink koşullarını korumak için aynı miktarda taze ortamla değiştirilmiştir. Numuneler valide edilmiş HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Çalışma üç kez tekrar edilmiştir.

Çözünme profillerinin istatistiksel olarak benzerliğinin belirlenmesi için, f1 (fark faktörü) ve f2 (benzerlik faktörü) olarak adlandırılan ve resmi otoriteler tarafından kabul edilen iki yöntem bulunmaktadır (Shah vd., 1998). DDSolver yazılım programı ile aşağıdaki Eşitlik 4.6. kullanılarak CD komplekslerinin çözünme hızı profillerinin benzerlik faktörü değerlendirilmiştir (Zhang vd., 2010)

$$f_2 = 50 \log \left\{ \left( \sqrt{1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t + T_t)^2} \right)^{-1} \times 100 \right\} \quad (4.6)$$

#### 4.3.3.8. Antioksidan aktivite

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil), organik çözücüler içinde serbest radikal üreten şiddetli renk veren nitrojen radikalidir. Antioksidan tarafından DPPH serbest radikale proton transferi reaksiyonu, 517 nm' de DPPH 'tan kaynaklanan mor rengin absorbansının azalmasına neden olmaktadır (Carmona-Jiménez vd., 2016). CD kompleksleri ve saf  $\alpha$ -TC'nin antioksidan aktiviteleri, DPPH radikale yönelik süpürücü aktivitenin tespiti ile UV spektrofotometrede çalışılmıştır (Kumari vd., 2010).

DPPH testi için; 11.2896 mg DPPH radikali 150 mL etanolde çözündürülmüş ve DPPH stok çözeltisi (0.2 mM) hazırlanmıştır. 5 mg saf  $\alpha$ -TC ve 5 mg  $\alpha$ -TC içeren miktarlarda kompleksler ayrı ayrı tartılarak 25 mL etanolde çözündürülmüş ve komplekslere ait stok çözeltiler ( $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) hazırlanmıştır. DPPH stok çözeltisi,  $\alpha$ -TC içeren stok çözeltileri ve etanol hesaplanan hacimlerde karıştırılarak 6 farklı konsantrasyonda (1.25, 2.5, 5, 15, 25, 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )  $\alpha$ -TC içeren karışımlar **Tablo 4.2.**'de belirtilen şekilde hazırlanmıştır.

**Tablo 4.2.** Antioksidan aktivite çalışmasında kullanılan çözeltilere ait karışımlar

$\alpha$ -TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0.2 mM DPPH stok çözeltisi (mL)	200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda $\alpha$ -TC içeren stok çözeltisi ( $\mu\text{L}$ )	Etanol ( $\mu\text{L}$ )
1.25	2	25	1975
2.5	2	50	1950
5	2	100	1900
15	2	300	1700
25	2	500	1500
50	2	1000	1000

Öncelikle etanole karşı DPPH:etanol (1:1, *h/h*) çözeltisinin absorbanı 517 nm'de okunarak  $A_0$  kaydedilmiştir. **Tablo 4.2.**'deki hacimlerde karıştırılan çözeltiler vorteksle karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda 30 dk bekletilmiş ve sürenin sonunda 517 nm'deki absorbanları çözücüye karşı okunmuştur. Aynı çalışma  $\alpha$ -TC,  $\alpha$ -TC içeren kompleksler ( $\alpha$ -TC/HPBCD kompleksi ve  $\alpha$ -TC/RAMEB kompleks) için ayrı ayrı yapılarak, çalışmalar üçer kez tekrarlanmıştır. UV-spektrofotometre ile elde edilen absorbanlar ve Eşitlik 4.7. kullanılarak DPPH absorbanındaki azalmaya bağlı olarak antioksidan aktiviteler hesaplanmıştır (Wu vd., 2008).

$$\text{İnhibisyon}(\%) = [(A_0 - A_1) : (A_0)] \times 100 \quad (4.7)$$

A<sub>0</sub>; aynı koşullarda hazırlanan standardın absorbansı, A<sub>1</sub>; örneklerin absorbansıdır.

#### **4.3.3.9. Kararlılık çalışmaları**

15 mg saf  $\alpha$ -TC ve aynı miktarda  $\alpha$ -TC içeren  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksleri ayrı ayrı tartılarak etanolde çözüldürülmüş ve bilinen konsantrasyondaki çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltilerin HPLC ile analizleri yapılarak başlangıç konsantrasyonları pratik olarak hesaplanmıştır. Çözeltiler 2-8°C buzdolabı, 25°C karanlık, 25°C gün ışığı, 40°C karanlık ortamlarında bekletilerek, 12. Gün, 20. Gün ve 1. Ay sonunda örneklerin HPLC cihazında miktar tayinleri tekrarlanmıştır. Çalışmalar her bir ortamda 3 farklı örnek üzerinden yürütülerek sonuçların ortalama ve standart hata değerleri hesaplanmıştır.

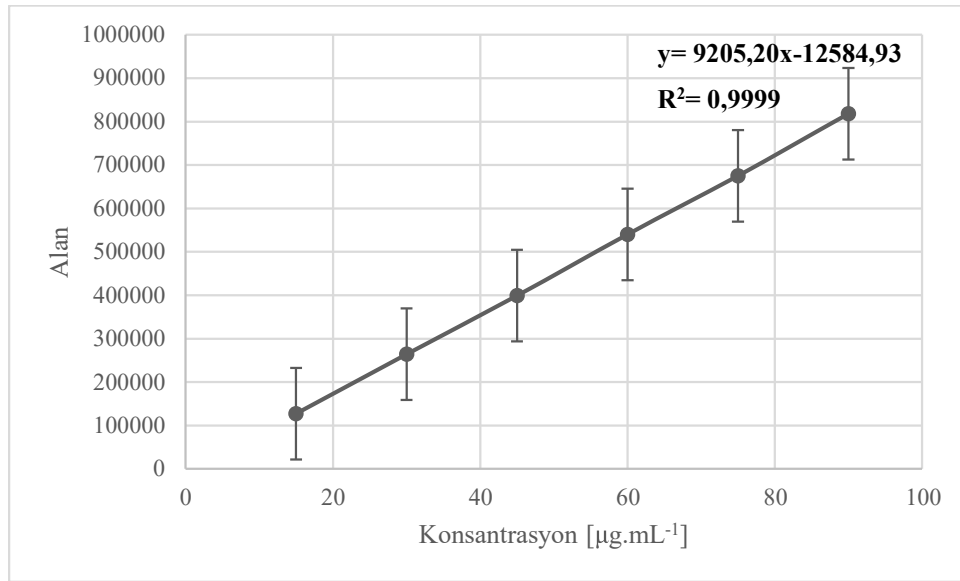
## 5. BULGULAR

### 5.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları

#### 5.1.1. HPLC yöntem validasyonu çalışmaları

##### 5.1.1.1. Doğrusallık

Bir analitik yöntemin doğrusallığının kanıtlanabilmesi için determinasyon katsayısının 0,999'dan yüksek olması gerekmektedir (ICH Q2B, 1996; ICH Q2A(R2), 2005).  $\alpha$ -TC'nin mobil faz (metanol:asetonitril, 95:5, *h/h*) içerisinde eşit aralıklı altı farklı konsantrasyonda hazırlanan üç seri çözeltisiyle yapılan HPLC analizleriyle elde edilen korelasyon katsayısı, çalışılan konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusal olduğunu göstermiştir. Mobil faz ortamında HPLC ile yapılan doğrusallık çalışmasına ait standart eğri **Şekil 5.1.**'de verilmiştir.



**Şekil 5.1.** HPLC yöntemi ile yapılan doğrusallık çalışmasına ait standart eğri ( $n=3$ ,  $\pm SH$ )

##### 5.1.1.2. Doğruluk

Doğruluk için yüzde geri kazanım değerlerinin kabul edildiği aralık  $\pm \%2$ 'dir (ICH Q2A(R2), 2005). Mobil faz ortamında HPLC yöntemi ile yapılan doğruluk çalışmalarında, çalışma aralığının en alt, orta, en üst konsantrasyonları için elde edilen ortalama yüzde geri kazanım ve standart hata değerleri **Tablo 5.1.**'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre analitik yöntemin doğruluk değerinin uygun olduğu gösterilmiştir.

**Tablo 5.1.** HPLC yöntemi ile elde edilen doğruluk değerleri ( $n=3$ ,  $\pm SH$ )

Teorik $\alpha$ -TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Pratik $\alpha$ -TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% Geri kazanım
15	14,90 $\pm$ 0,13	99,33 $\pm$ 0,87
45	45,29 $\pm$ 0,22	100,64 $\pm$ 0,73
90	90,29 $\pm$ 0,40	100,33 $\pm$ 0,44

### 5.1.1.3. Kesinlik

ICH'e göre analitik yöntemin kesinliği ile ilgili tekrarlanabilirlik (gün-içi) ve tekrar elde edilebilirlik (günler-arası) ölçümlerinin değerlendirildiği çalışmalarda, % rölatif standart sapma (RSD) değerleri 2'nin altında ise kullanılan yöntemin kesinliği kanıtlanabilir (Q2A(R2), 2005). Literatür ayrıca tekrarlanabilirlik için maksimum % 3, tekrar elde edilebilirlik için maksimum % 5 değerini de vermektedir (Shabir, 2003). Kesinlik çalışmasına ait analizler farklı üç günde, üç konsantrasyonda (15, 45, 90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) yapılmış ve bulunan RSD değerleri **Tablo 5.2.**'de verilmiştir.

**Tablo 5.2.** HPLC yöntemi ile elde edilen RSD değerleri ( $k=3$ ,  $n=6$ )

$\alpha$ - TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Gün-içi	Günler-arası
15	1,21	1,38
45	1,36	4,79
90	0,28	5,73

Doğrusallık, doğruluk ve kesinlik çalışmalarının sonuçlarına göre 15-90  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığı analitik yöntemin çalışma aralığı olarak tespit edilmiştir.

### 5.1.1.4. Hassasiyet

Kullanılan analitik yöntemin, derişimdeki küçük değişimleri saptama kapasitesi ve düşük konsantrasyonları saptama yeteneğini belirlemek için, LOD ve LOQ değerleri belirlenmiştir. Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan LOD değeri 1,54  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise 4,68  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

### 5.1.1.5. Seçicilik

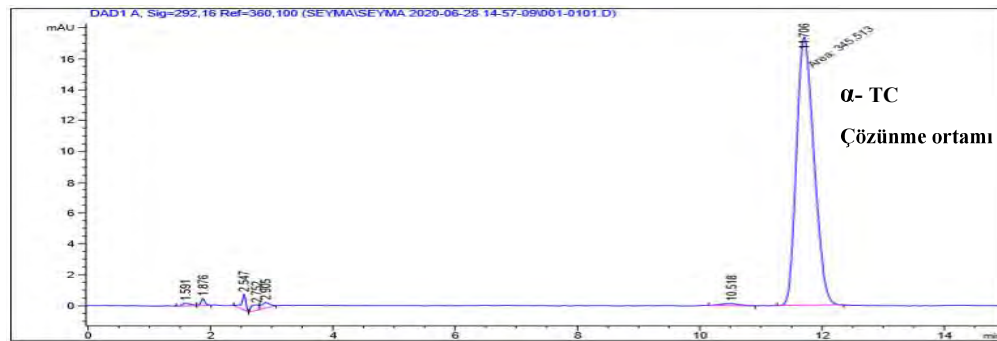
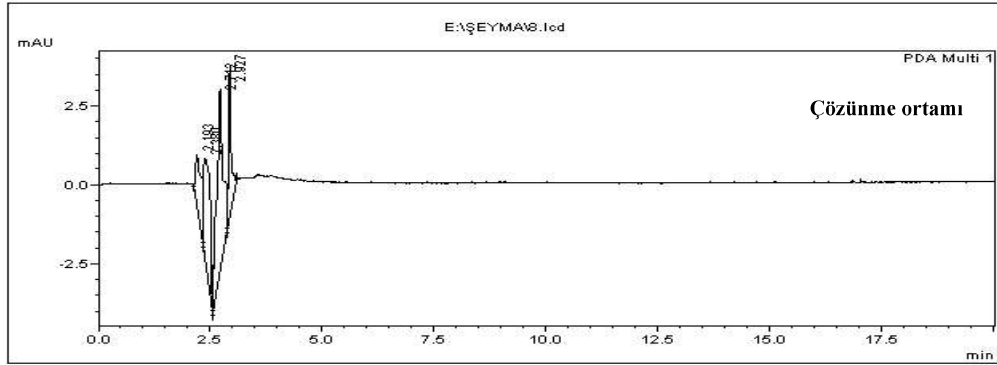
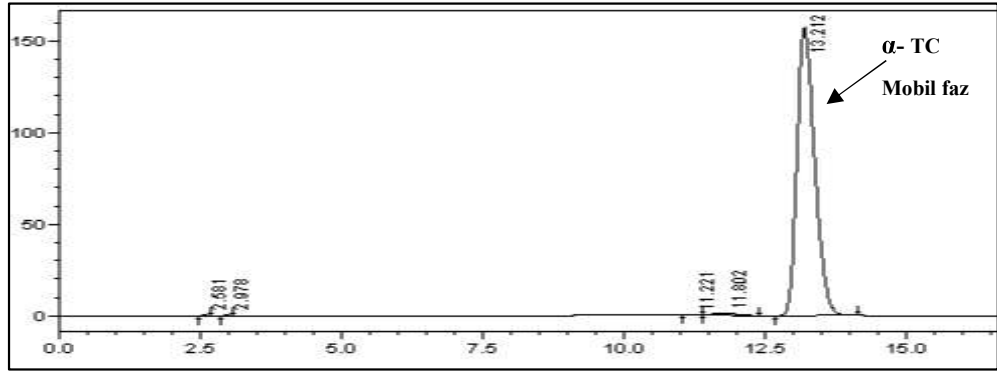
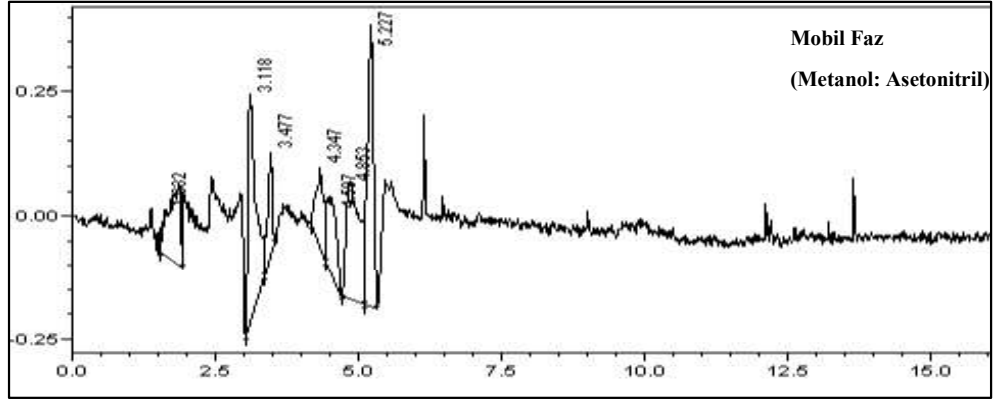
Mobil fazdan, analiz yapılan çözünme hızı ortamından kaynaklı herhangi bir pikin etkin madde piki ile girişim yapmadığını göstermek amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda mobil faz, çözünme hızı çalışma ortamı,  $\alpha$ -TC'un mobil faz içerisindeki çözeltisi ve  $\alpha$ -TC'un çözünme hızı ortamındaki çözeltisi HPLC ile analiz edilerek kromatogramları alınmıştır. Analitik yöntemin seçiciliğini gösteren kromatogramlar Şekil 5.2.'de verilmiştir.

### 5.1.1.6. Kararlılık

Etkin maddenin çözünme hızı çalışmasının yapıldığı ortamında kararlılığı araştırılmıştır. pH 7,4 etanol:fosfat tamponu (76:24, h/h) ile  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler,  $37 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de çözünme hızının takip edildiği süre (48 saat) bekletilmiş, belirli zaman aralıklarında HPLC ile ölçülen konsantrasyonlar ile elde edilen sonuçlar Tablo 5.3.'de verilmiştir.

**Tablo 5.3.**  $\alpha$ -TC'nin etanol:fosfat tamponundaki kararlılık çalışmasına ait sonuçlar (n=3)

Zaman	C ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) $\pm$ SH	% Geri kazanım $\pm$ SH
Başlangıç	50,81 $\pm$ 0,15	101,62 $\pm$ 0,31
1. Saat	50,91 $\pm$ 0,49	101,83 $\pm$ 0,98
2. Saat	50,81 $\pm$ 1,20	101,62 $\pm$ 2,40
4. Saat	50,92 $\pm$ 0,72	101,85 $\pm$ 1,44
8. Saat	51,45 $\pm$ 0,59	102,90 $\pm$ 1,17
12. Saat	50,55 $\pm$ 1,22	101,09 $\pm$ 2,44
24. Saat	51,10 $\pm$ 0,92	102,19 $\pm$ 1,84
48. Saat	50,73 $\pm$ 1,16	101,47 $\pm$ 2,32

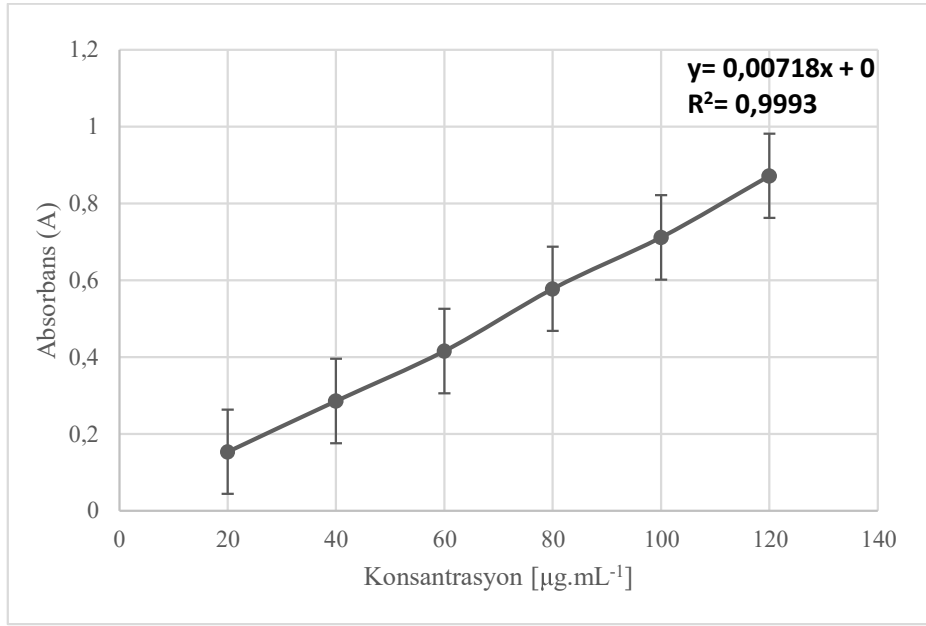


**Şekil 5.2.** HPLC yönteminin seçicilik çalışmasına ait kromatogramlar

## 5.1.2. UV Spektrofotometri yöntem validasyonu çalışmaları

### 5.1.2.1. Doğrusallık

Çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında kullanılan çözücü ortamı (etanol:su, 2:1, *h/h*) içerisinde  $\alpha$ -TC'nin eşit aralıklı altı farklı konsantrasyonda hazırlanan üç seri çözeltisiyle yapılan UV Spektrofotometri analizleriyle elde edilen absorbans değerleri ile çalışılan konsantrasyon aralığında yöntemin doğrusallığı gösterilmiştir. Etanol:su (2:1, *h/h*) ortamında UV spektrofotometre ile yapılan doğrusallık çalışmasına ait standart eğri ve doğru denklemi **Şekil 5.3.**'de verilmiştir.



**Şekil 5.3.** UV-spektrofotometri yöntemi ile yapılan doğrusallık çalışmasına ait standart eğri ( $n=3$ ,  $\pm SH$ )

### 5.1.2.2. Doğruluk

Etanol:su (2:1, *h/h*) ortamında UV spektrofotometri yöntemi ile yapılan doğruluk çalışmalarında, çalışma aralığının en alt, orta, en üst konsantrasyonları için ölçülen absorbanslar ve regresyon eşitliği ile elde edilen ortalama yüzde geri kazanım ve standart hata değerleri **Tablo 5.4.**'de verilmiştir.

### 5.1.2.3. Kesinlik

Kesinlik çalışmasına ait analizler farklı üç günde, üç konsantrasyonda (20, 60, 120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) yapılmış ve bulunan RSD değerleri **Tablo 5.5.**'de verilmiştir.

**Tablo 5.4.** UV spektrofotometri yöntemi ile elde edilen doğruluk değerleri ( $n=3$ ,  $\pm SH$ )

Teorik $\alpha$ -TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Pratik $\alpha$ -TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	% Geri kazanım
20	20,01 $\pm$ 0,93	100,05 $\pm$ 4,65
60	59,89 $\pm$ 1,53	99,81 $\pm$ 2,55
120	119,92 $\pm$ 2,43	99,93 $\pm$ 2,03

**Tablo 5.5.** UV spektrofotometri yöntemi ile elde edilen RSD değerleri ( $k=3$ ,  $n=6$ )

$\alpha$ -TC konsantrasyonu ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Gün-içi	Günler-arası
20	2,63	5,31
60	3,01	3,83
120	0,83	5,6

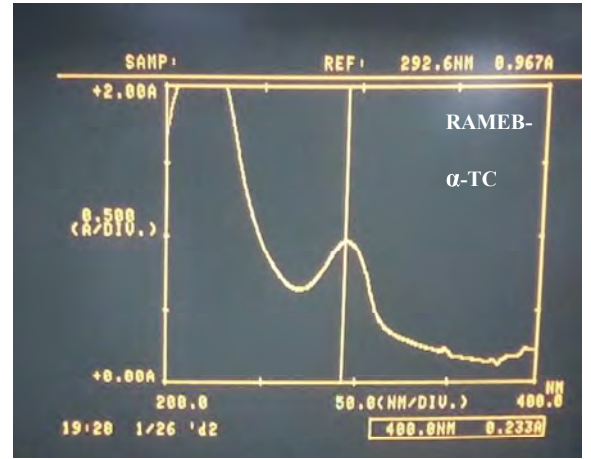
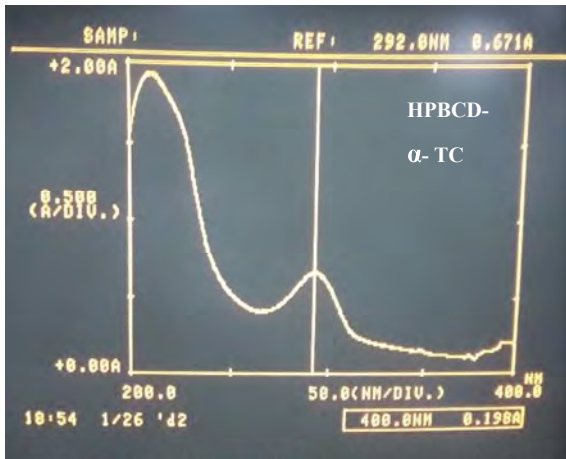
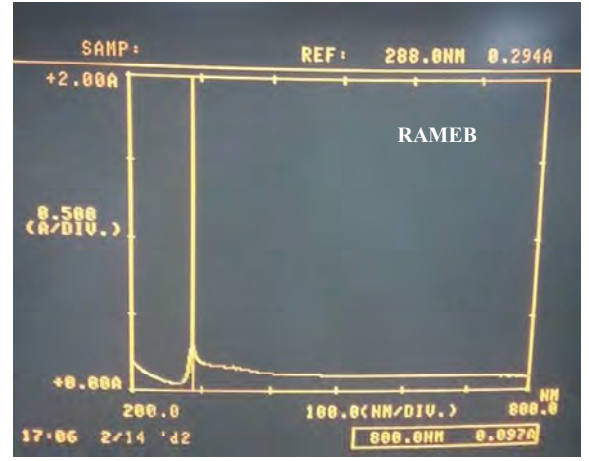
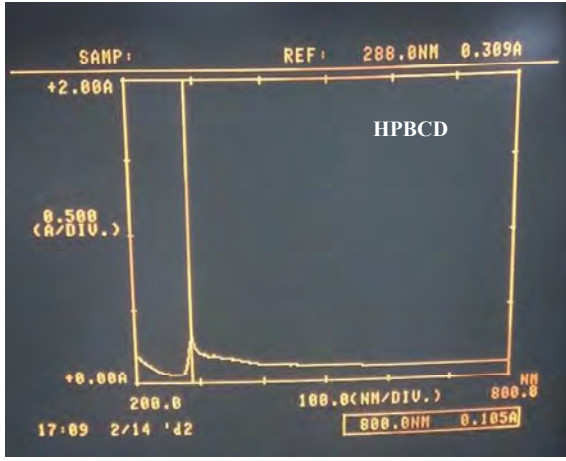
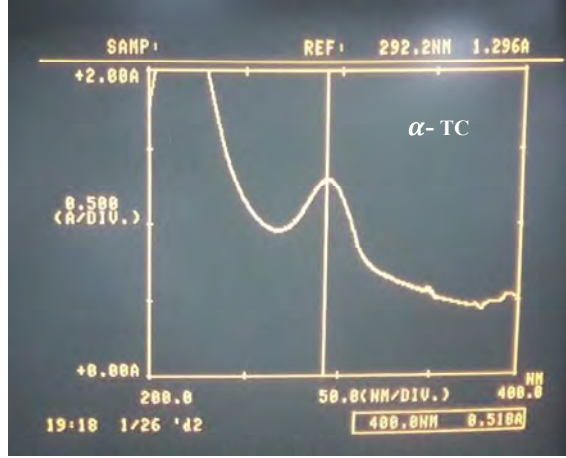
Doğrusallık, doğruluk ve kesinlik çalışmalarının sonuçlarına göre 20-120  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığı analitik yöntemin çalışma aralığı olarak tespit edilmiştir.

#### **5.1.2.4. Hassasiyet**

UV spektrofotometre sonuçlarına göre Eşitlik 4.1 kullanılarak hesaplanan LOD değeri 1,47  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , Eşitlik 4.2 kullanılarak hesaplanan LOQ değeri ise 4,44  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur.

#### **5.1.2.5. Seçicilik**

Saf HPBCD, saf RAMEB'den kaynaklı herhangi bir pikin etkin madde piki (292 nm) ile girişim yapmadığını göstermek amacıyla seçicilik çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda çözücü sistemi (etanol:su, 2:1,  $h/h$ ) içerisindeki  $\alpha$ -TC, HPBCD, RAMEB'in tek başına ve  $\alpha$ -TC ile HPBCD'in,  $\alpha$ -TC ile RAMEB'in bir arada bulunduğu çözeltilerin UV spektrofotometre ile spektrumları alınmıştır. UV spektrofotometri yönteminin seçiciliğini gösteren spektrumlar **Şekil 5.4.**'de verilmiştir.



Şekil 5.4. UV spektrofotometri yönteminin seçicilik çalışmasına ait spektrumlar

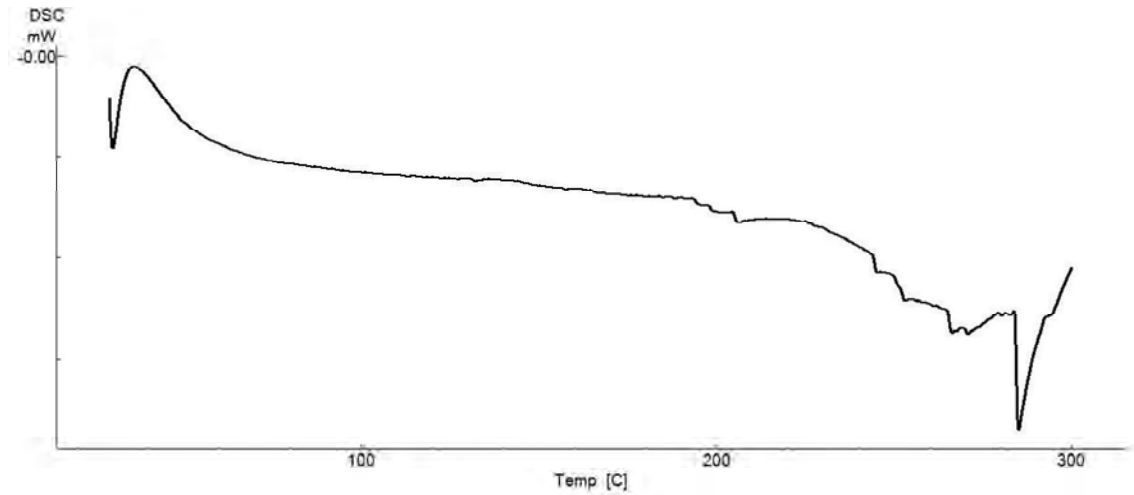
## 5.2. $\alpha$ -Tokoferol ile Yapılan Çalışmalar

### 5.2.1. Çözünürlük tayini

CD ile kompleksleşme sonrası  $\alpha$ -TC'nin çözünürlüğündeki artışı tespit için saf  $\alpha$ -TC ile yapılan çalışmada,  $\alpha$ -TC'nin %1 oranında SLS içeren saf su ortamında oda sıcaklığındaki çözünürlük değeri  $7,74 \pm 3,08 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (ort  $\pm$  SH) olarak bulunmuştur (n=3).

### 5.2.2. Termal analiz

Kompleksleşme sonrası referans olarak kullanılmak üzere, saf  $\alpha$ -TC'nin termal analizi 30-300°C aralığında DSC ile alüminyum referansa karşı gerçekleştirilmiş ve termogram Şekil 5.5.'te sunulmuştur.



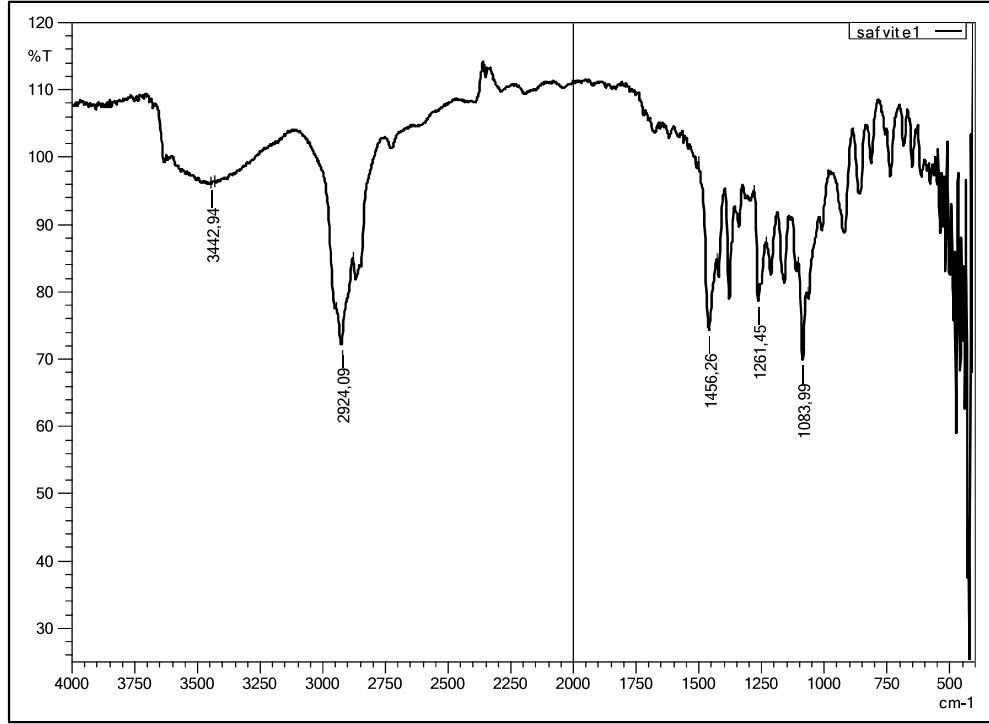
Şekil 5.5. Saf  $\alpha$ -TC'nin DSC analizine ait termogram

### 5.2.3. FT-IR Analizi

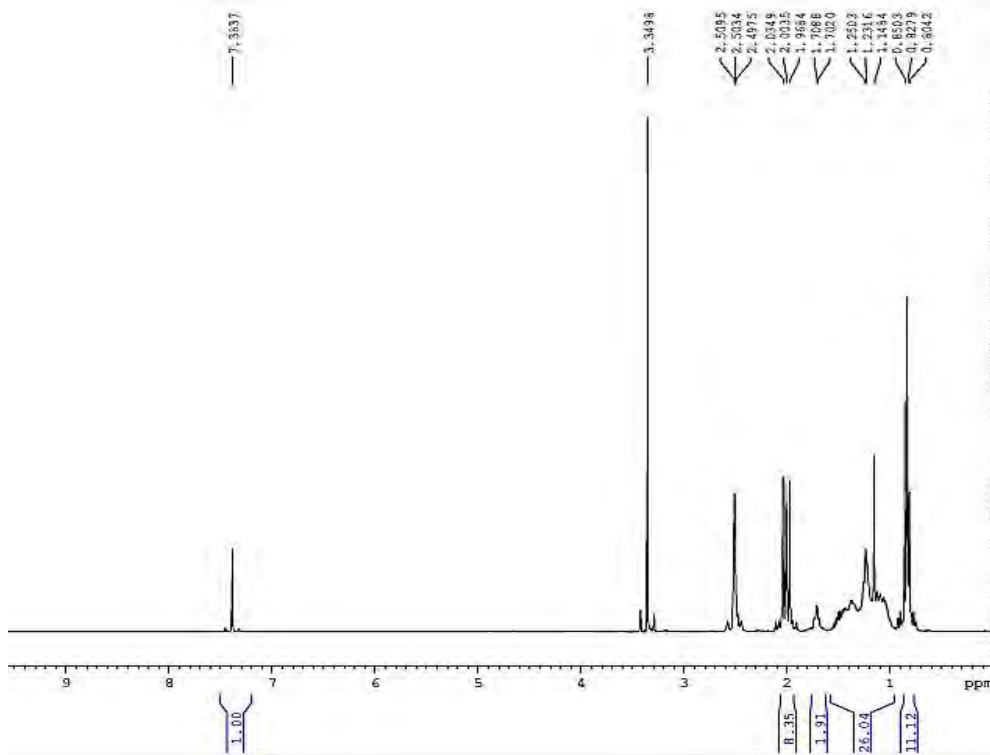
CD'ler ile kompleksleşme sonrasındaki değişimleri izlemek amacıyla yapılan analiz ile elde edilen  $\alpha$ -TC'e ait FT-IR spektrumu Şekil 5.6.'da sunulmuştur.

### 5.2.4. $^1\text{H-NMR}$ Analizi

HPBCD ve RAMEB kompleksleri ile saf  $\alpha$ -TC'yi karşılaştırmak için yapılan saf  $\alpha$ -TC'nin  $^1\text{H-NMR}$  analizi ile alınan spektrum Şekil 5.7.'de sunulmuştur.



Şekil 5.6. Saf  $\alpha$ -TC'nin FT-IR analizine ait spektrum

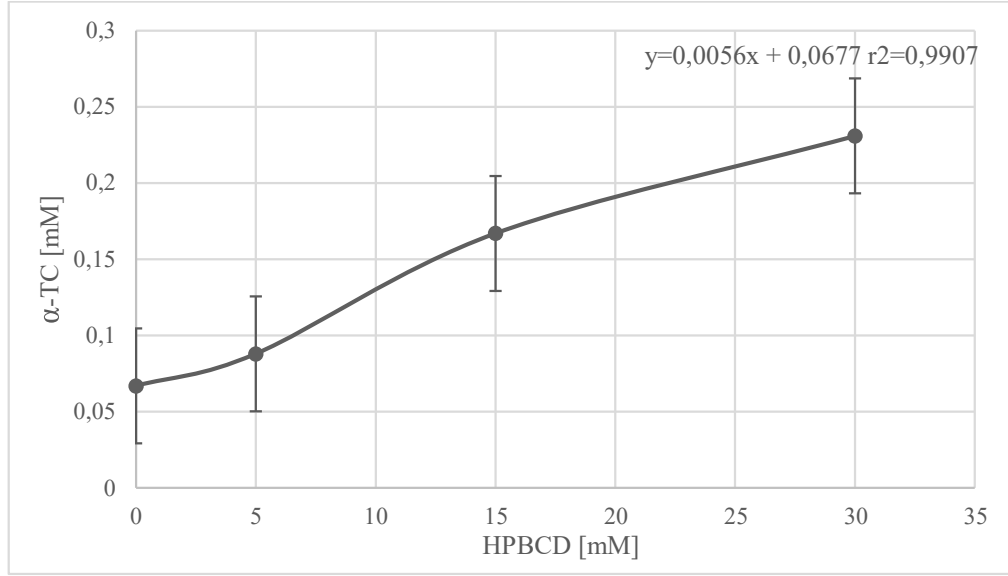


Şekil 5.7. Saf  $\alpha$ -TC'nin  $^1\text{H}$ -NMR analizine ait spektrum

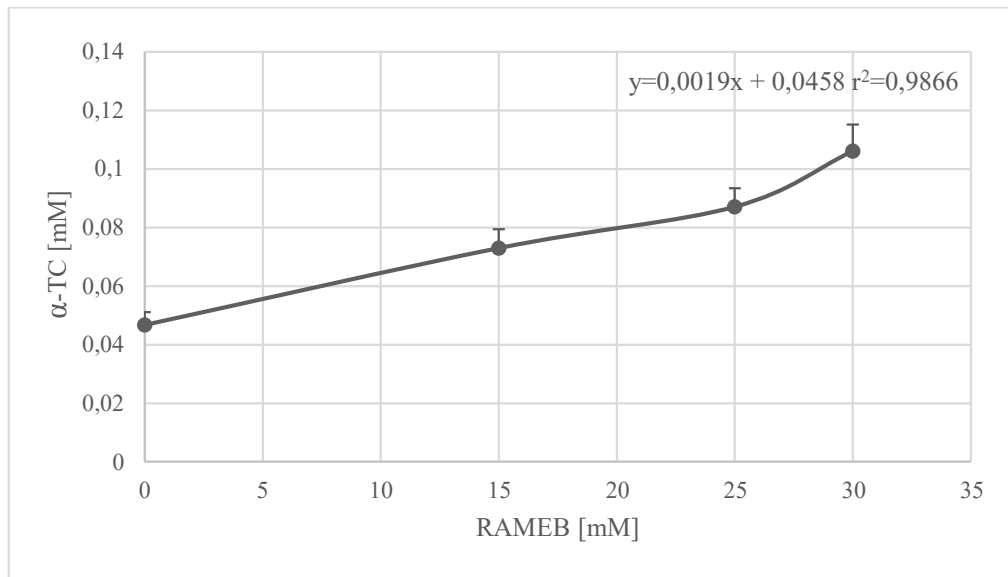
### 5.3. $\alpha$ -Tokoferol/Siklodekstrin Komplekslerinin Değerlendirilmesi

#### 5.3.1. Çözünürlük faz çalışmaları

0-30 mM konsantrasyon aralığında CD içeren sulu çözeltilere  $\alpha$ -TC'nin aşırı miktarlarının ilavesinden sonra denge süresince çalkalama ile elde edilen çözünürlük faz diyagramları Şekil 5.8. ve Şekil 5.9.'da gösterilmiştir.

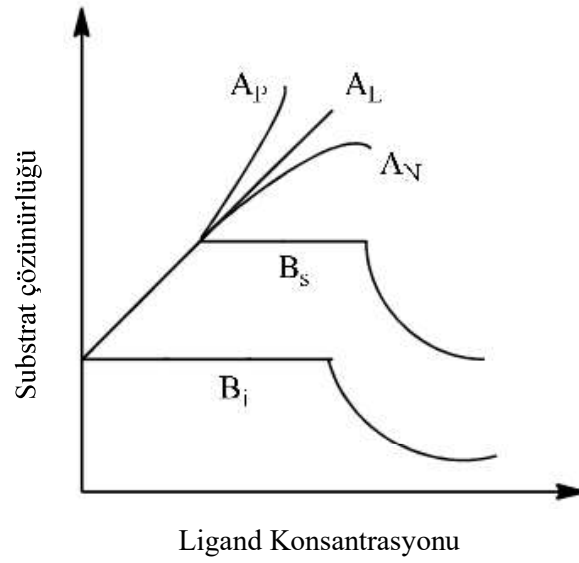


Şekil 5.8.  $\alpha$ -TC:HPBCD çözünürlük faz diyagramı (n=6,  $\pm SH$ )



Şekil 5.9.  $\alpha$ -TC:RAMEB çözünürlük faz diyagramı (n=6,  $\pm SH$ )

**Şekil 5.8.** ve **5.9.**'daki sonuçlardan her iki CD'in de artan konsantrasyonu ile ilişkili olarak  $\alpha$ -TC konsantrasyonlarında lineer bir artış olduğu hem görsel olarak hem de regresyon karesi ( $R^2$ ) değerlerinden izlenmektedir. Böylece elde edilen çözünürlük diyagramlarının Higuchi'nin çözünürlük faz diyagramlarından  $A_L$  tipi diyagrama uygunluk gösterdiği tespit edilmiştir (**Şekil 5.10.**).  $A_L$  tipi diyagramla ilişkili olarak, inklüzyon komplekslerinin hazırlanmasında 1:1 molar oranda  $\alpha$ -TC:HPBCD ve 1:1 molar oranda  $\alpha$ -TC:RAMEB kullanılmasına karar verilmiştir (Higuchi ve Connors, 1965).



**Şekil 5.10.** Higuchi'nin faz-çözünürlük diyagramı (Loftsson vd., 2005)

Artan CD konsantrasyonuna bağlı olarak çizilen çözünürlük faz diyagramı ve Eşitlik 4.3 kullanılarak hesaplanan  $K_c$  değerleri  $\alpha$ -TC:HPBCD için  $82,31 \text{ M}^{-1}$ ,  $\alpha$ -TC:RAMEB için  $40,32 \text{ M}^{-1}$  bulunmuştur.

### **5.3.2. Inklüzyon kompleksleri üzerinde yapılan çalışmalar**

#### **5.3.2.1. Çözünürlük çalışmaları**

Suya aşırı miktarda saf  $\alpha$ -TC,  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB komplekslerinin eklenmesi ile hazırlanan karışımlar 1 gün boyunca manyetik karıştırıcıda  $100 \text{ rpm}$ 'de karıştırılmış ve 1 günün sonunda HPLC cihazında analiz edildiğinde  $\alpha$ -TC'nin suda çözünmediği anlaşılmıştır. %1'lik SLS çözeltisi içerisine aşırı miktarda saf  $\alpha$ -TC,  $\alpha$ -

TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksi eklenerek benzer şekilde çalışıldığında, elde edilen sonuçlar **Tablo 5.6.**'de verilmiştir.

**Tablo 5.6.**  $\alpha$ -TC,  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB komplekslerinin %1' lik SLS varlığında sudaki çözünürlüğü ( $n=3$ ,  $\pm SH$ )

	$\alpha$ -TC $\pm$ SH	$\alpha$ -TC : HPBCD kompleksi $\pm$ SH	$\alpha$ -TC : RAMEB kompleksi $\pm$ SH
C ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	7,74 $\pm$ 3,08	18,49 $\pm$ 4,28	23,99 $\pm$ 7,41

### 5.3.2.2. Morfolojik analiz

Saf CD'ler ve bu CD'ler ile hazırlanan CD komplekslerinin morfolojik özelliklerini gösteren SEM fotoğrafları **Şekil 5.11.**'de verilmiştir.

### 5.3.2.3. Termal analiz

Saf etkin madde, saf CD'ler, etkin madde/CD fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin DSC analizleri ile elde edilen termogramlar **Şekil 5.12.** ve **Şekil 5.13.**'de verilmiştir.

### 5.3.2.4. FT-IR analizi

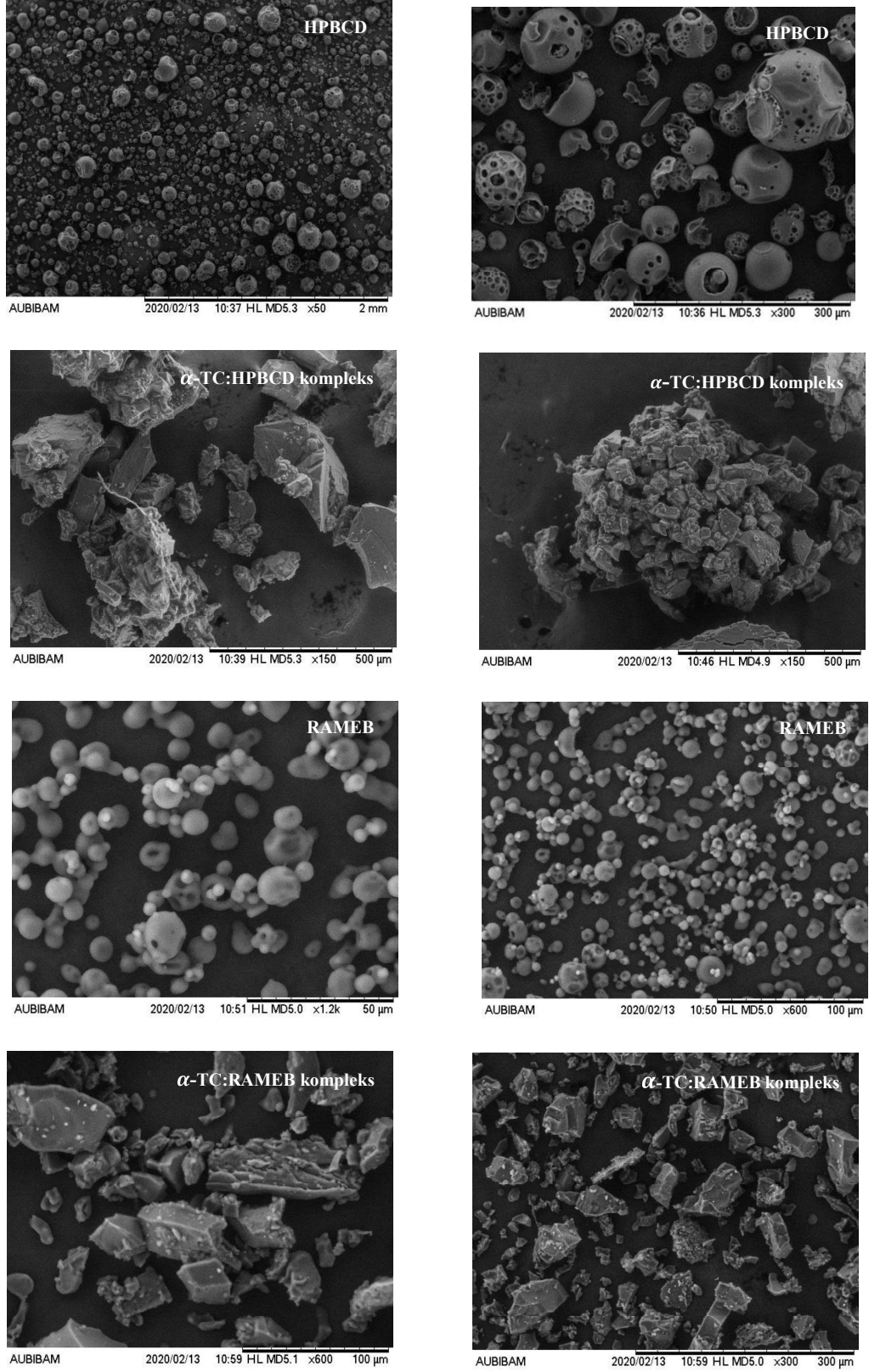
Saf etkin madde, saf CD'ler, etkin madde/CD fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin FT-IR analizleri ile elde edilen spektrumları **Şekil 5.14-5.17.**'de verilmiştir.

### 5.3.2.5. $^1\text{H-NMR}$ analizi

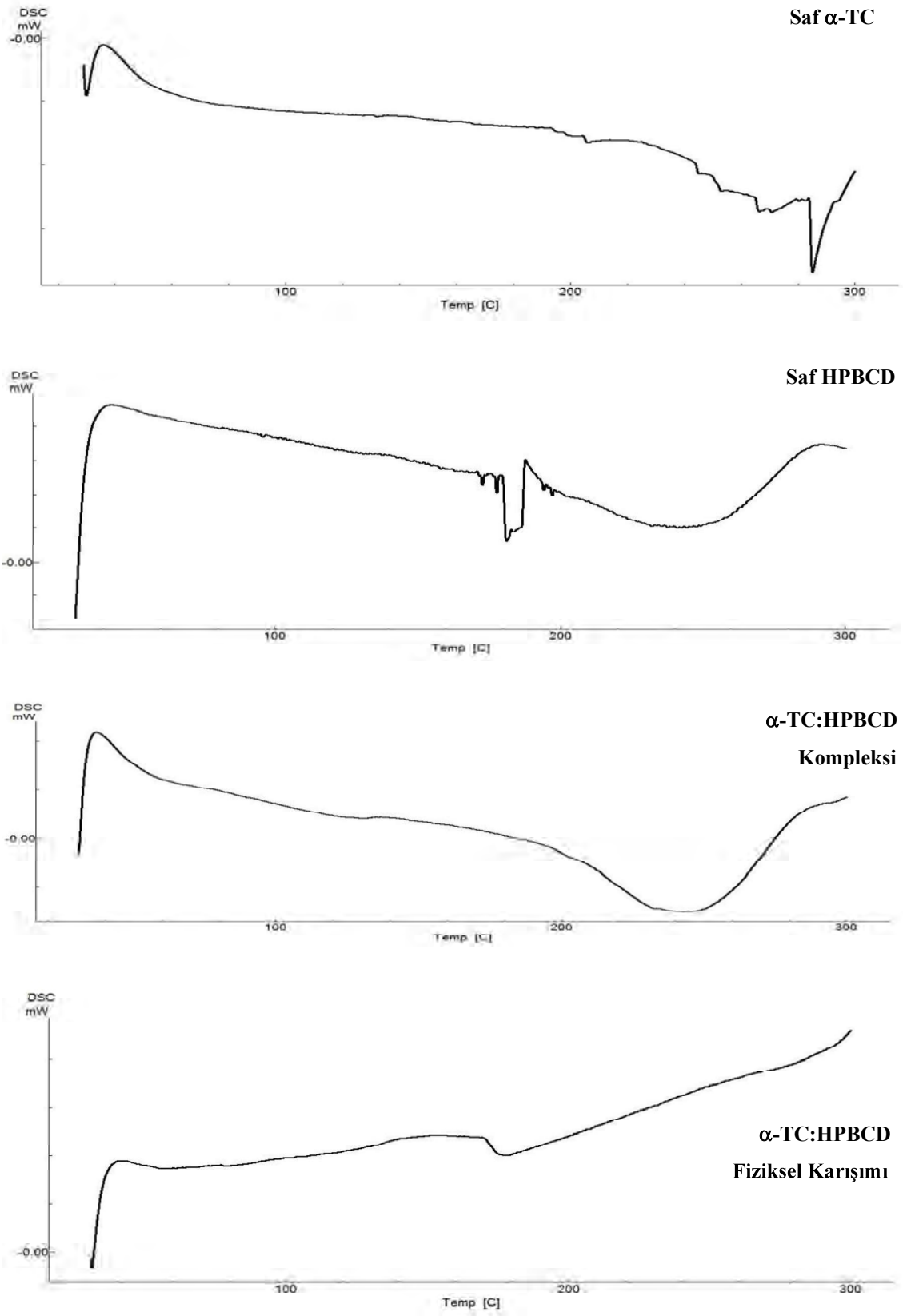
$\alpha$ -TC, saf CD'ler, etkin madde/CD fiziksel karışımlarının ve hazırlanan komplekslerin  $^1\text{H-NMR}$  analizlerine ait spektrumlar **Şekil 5.18-5.21**'de sunulmuştur.

CD'ler ile gerçekleştirilen moleküler enkapsülasyon sonrasında, misafir molekül ve CD molekülüne ait karakteristik piklerde meydana gelen kimyasal kaymaların ( $\Delta\delta$ ) değerlendirilmesi önem taşımaktadır.  $\Delta\delta$ 'ların karşılaştırılmasında NMR analizleri oldukça güçlü bir yöntemdir (Folch-Cano vd., 2013). Karbon NMR spektroskopisinden daha hassas olan proton NMR spektroskopisi ise CD'leri içeren inklüzyon kompleksleri karakterize etmede daha çok kullanılmaktadır (Zheng vd., 2005).  $\Delta\delta$ 'ları izleyerek iki molekül arasındaki etkileşmeleri tespit için saf bileşenler ile kompleksler ve fiziksel

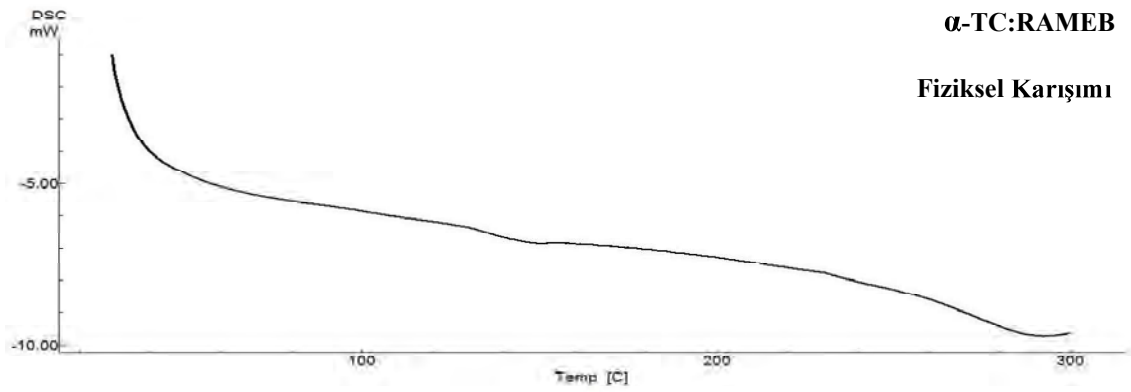
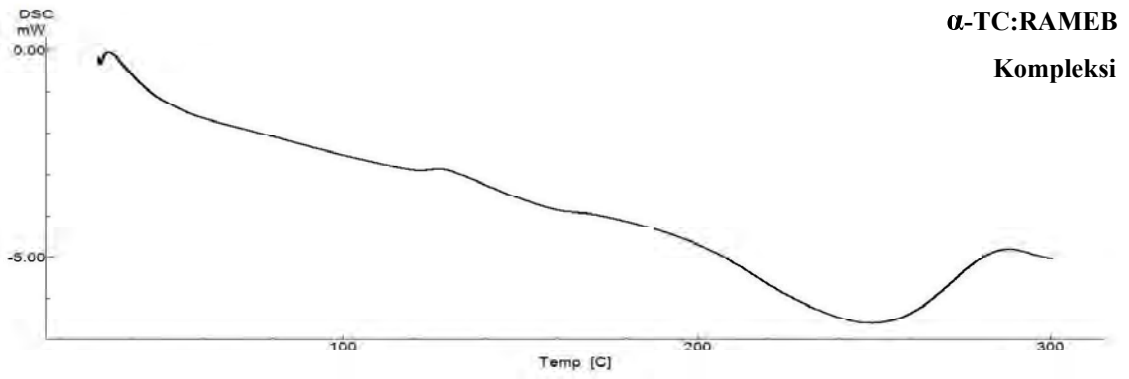
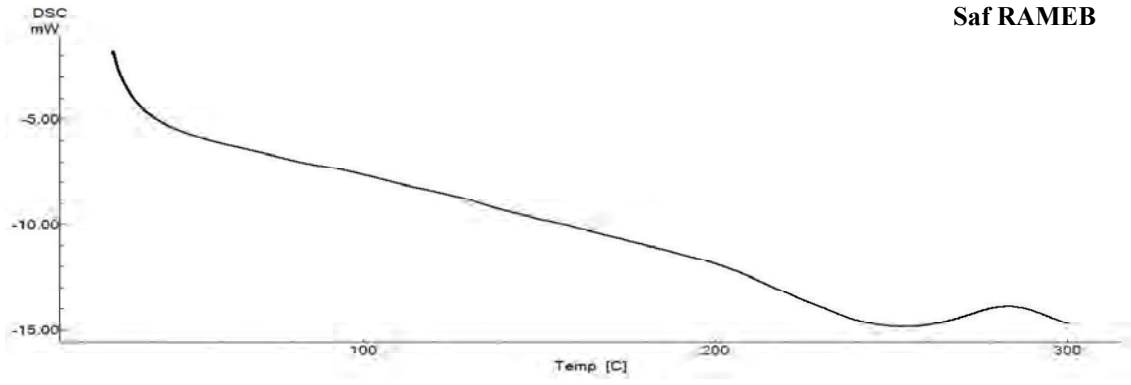
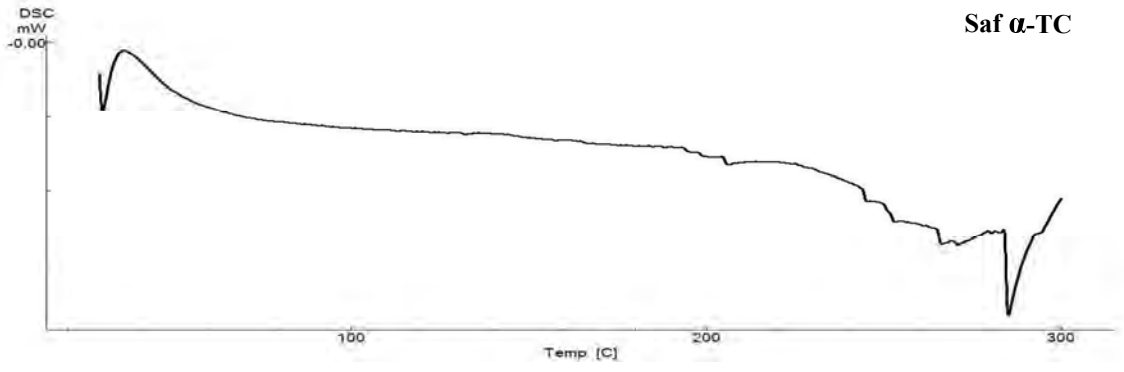
karişımların protonlarına ait  $^1\text{H-NMR}$  piklerindeki kaymalar hesaplanarak sonuları Şekil 5.22-5.25 ile Tablo 5.7-5.10'da verilmiştir.



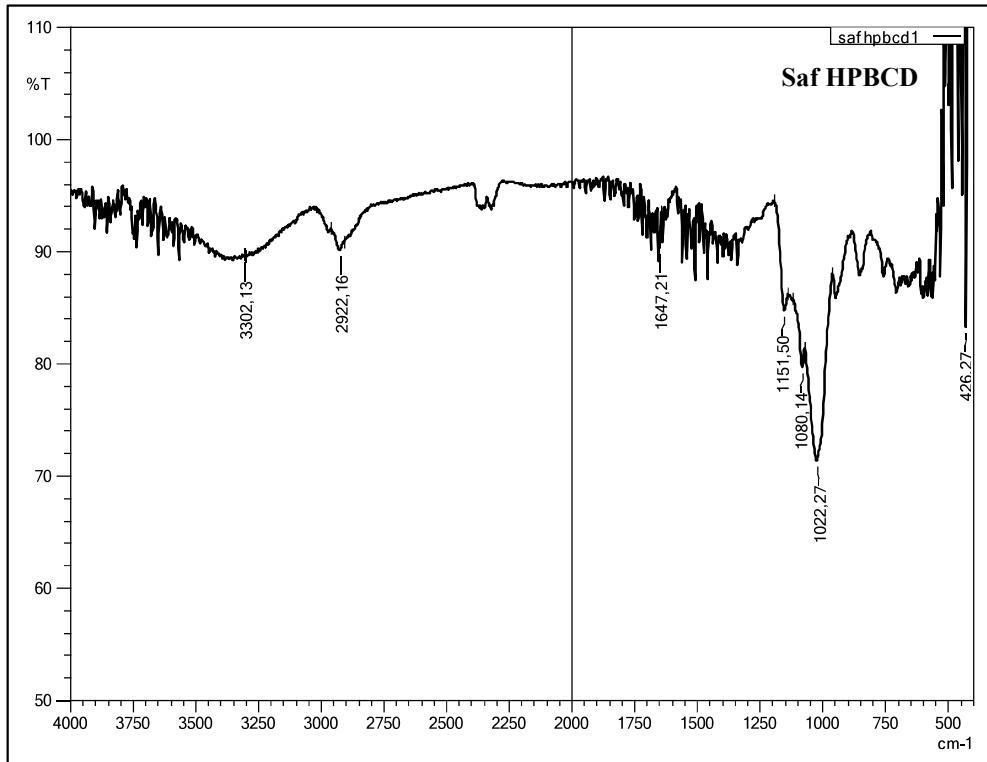
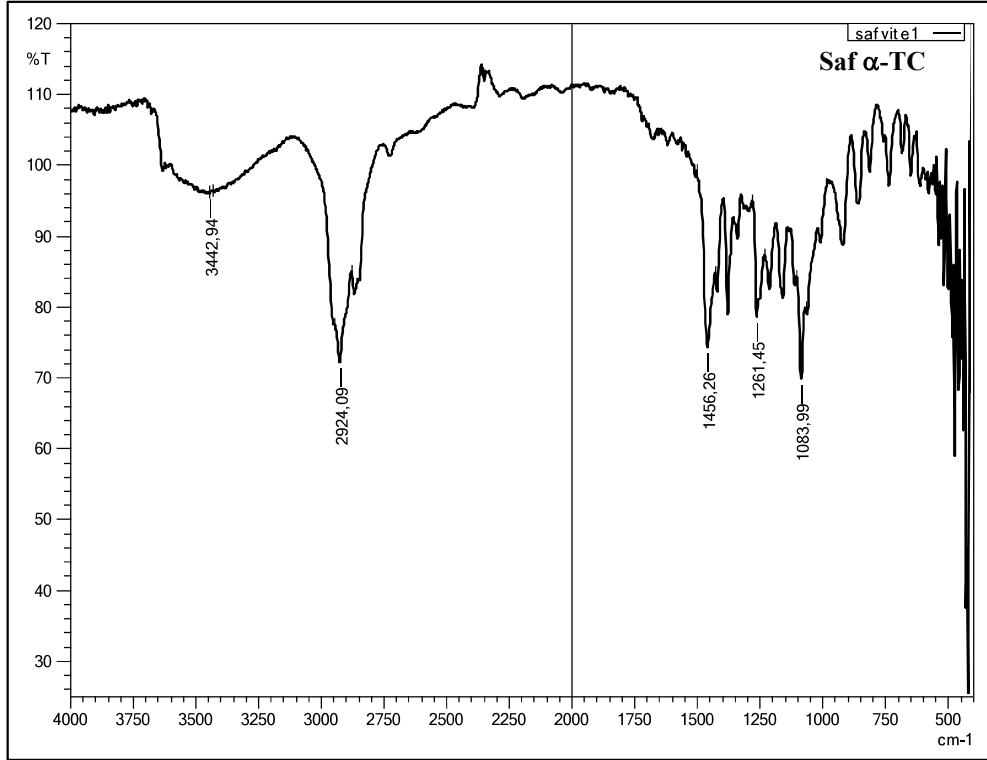
Şekil 5.11. HPBCD, RAMEB ve komplekslerinin SEM görüntüleri



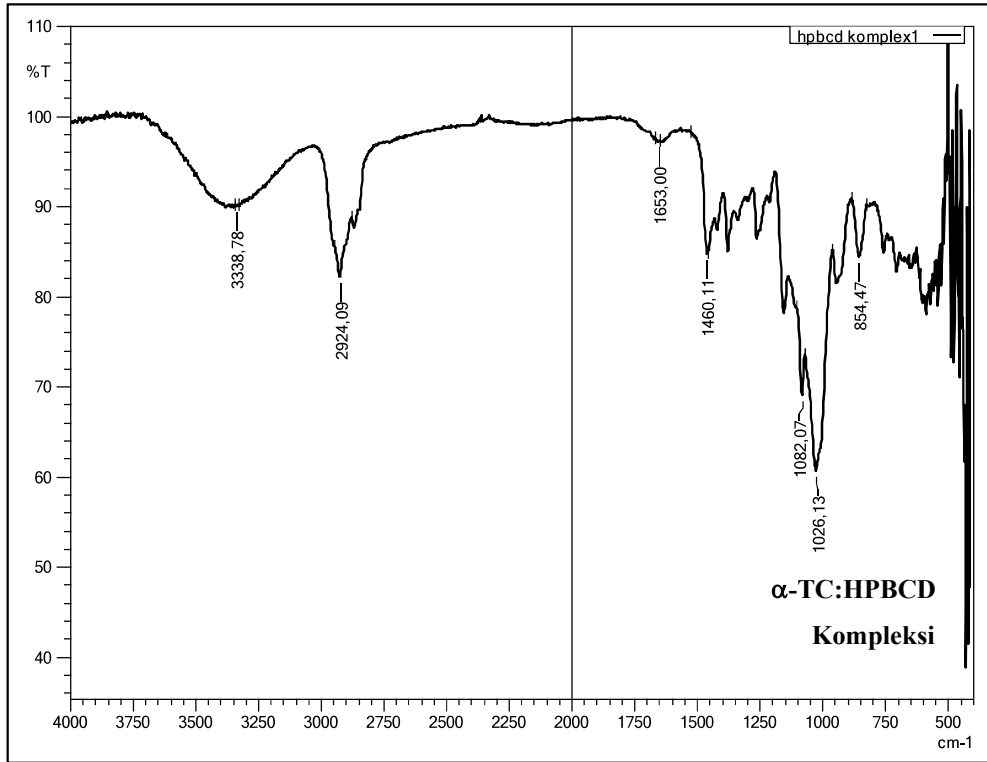
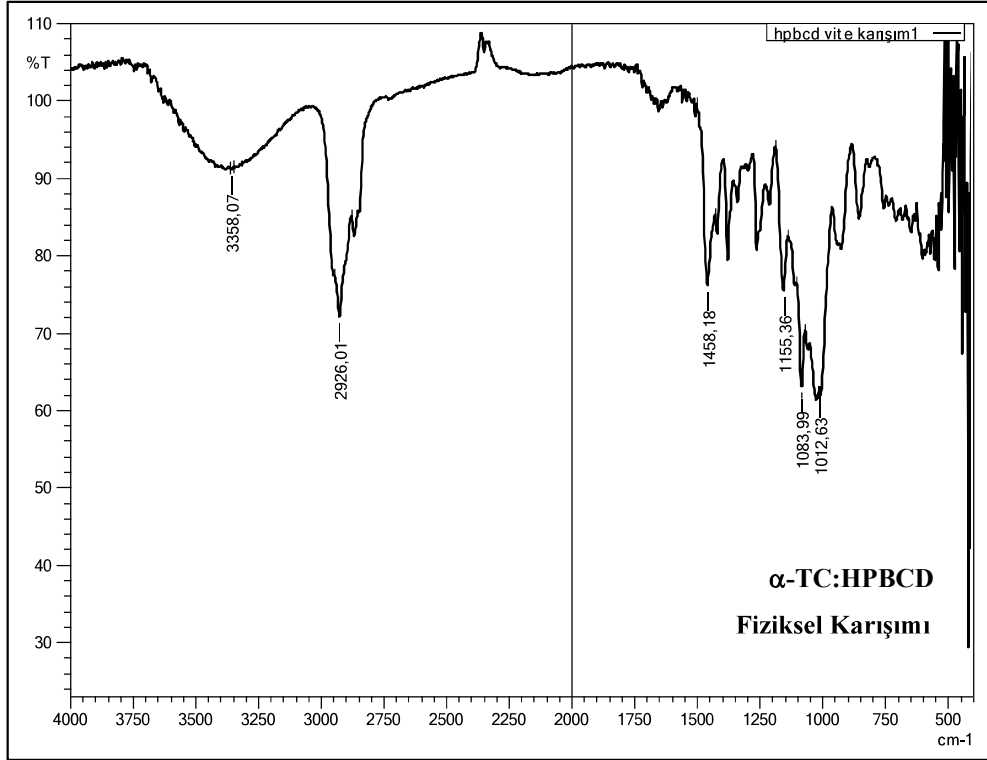
**Şekil 5.12.** Saf  $\alpha$ -TC, saf HPBCD,  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksi ve  $\alpha$ -TC:HPBCD fiziksel karışımının DSC termogramları



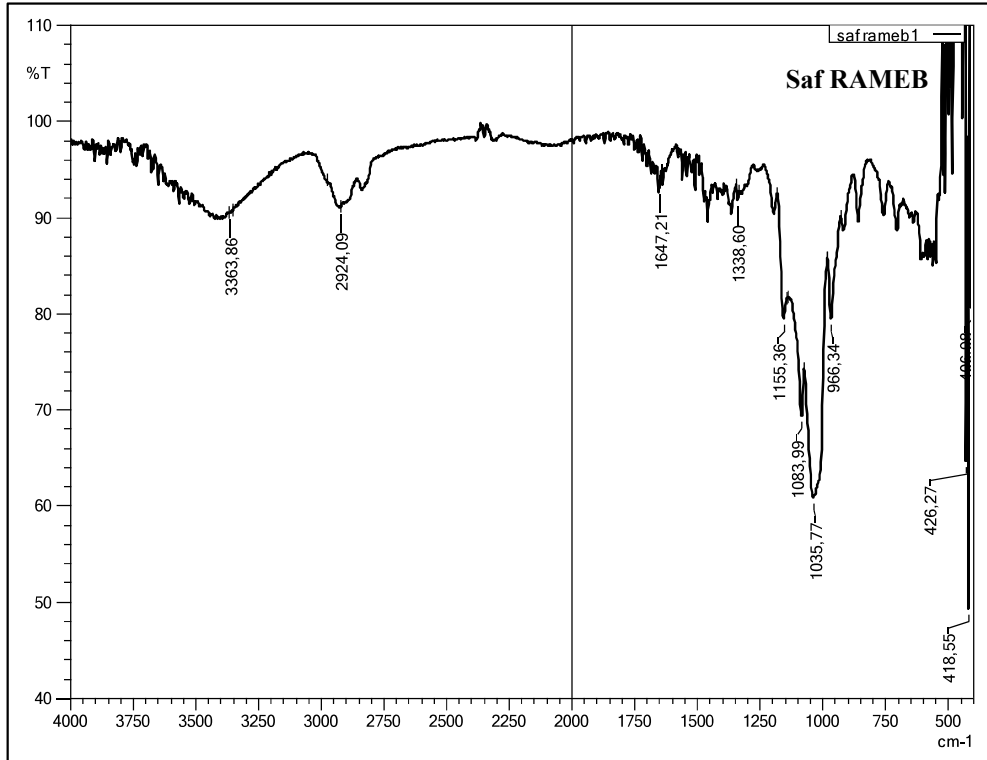
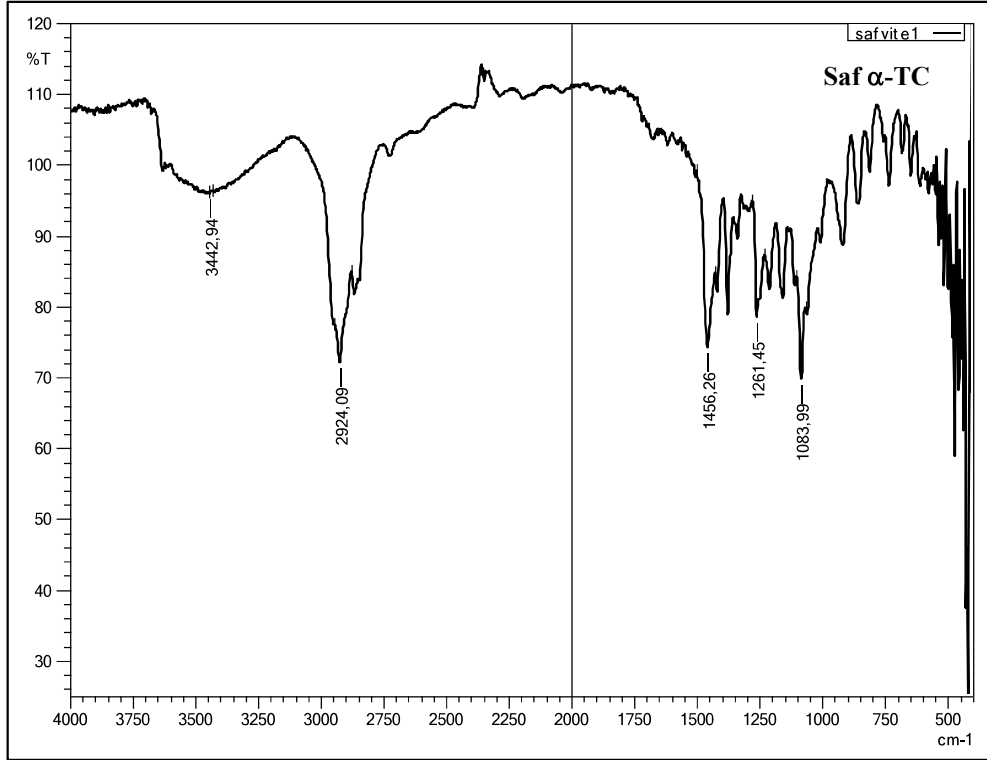
Şekil 5.13. Saf  $\alpha$ -TC, saf RAMEB,  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksi ve  $\alpha$ -TC:RAMEB fiziksel karışımının DSC termogramları



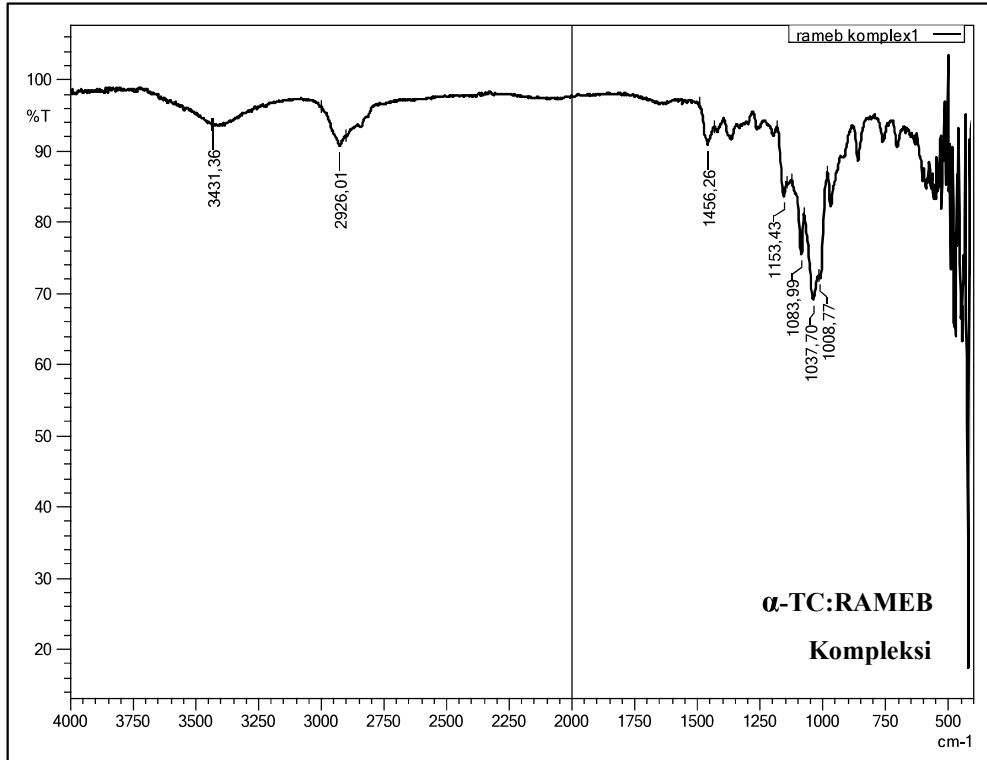
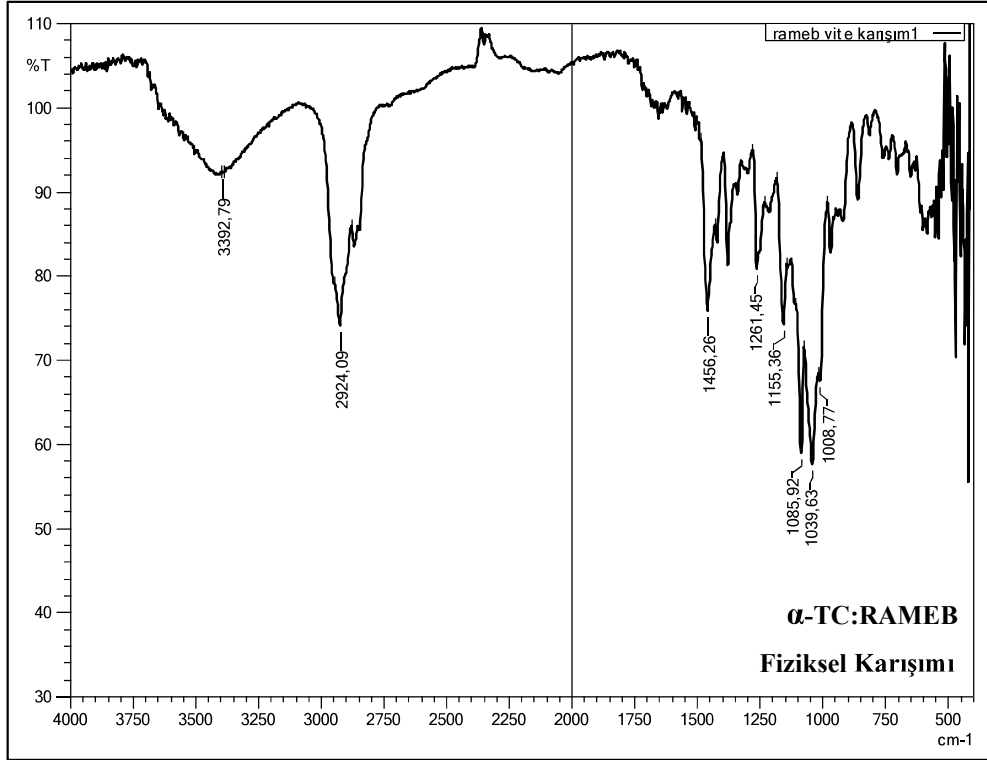
**Şekil 5.14.** Saf  $\alpha$ -TC ve saf HPBCD'nin FT-IR analiz spektrumları



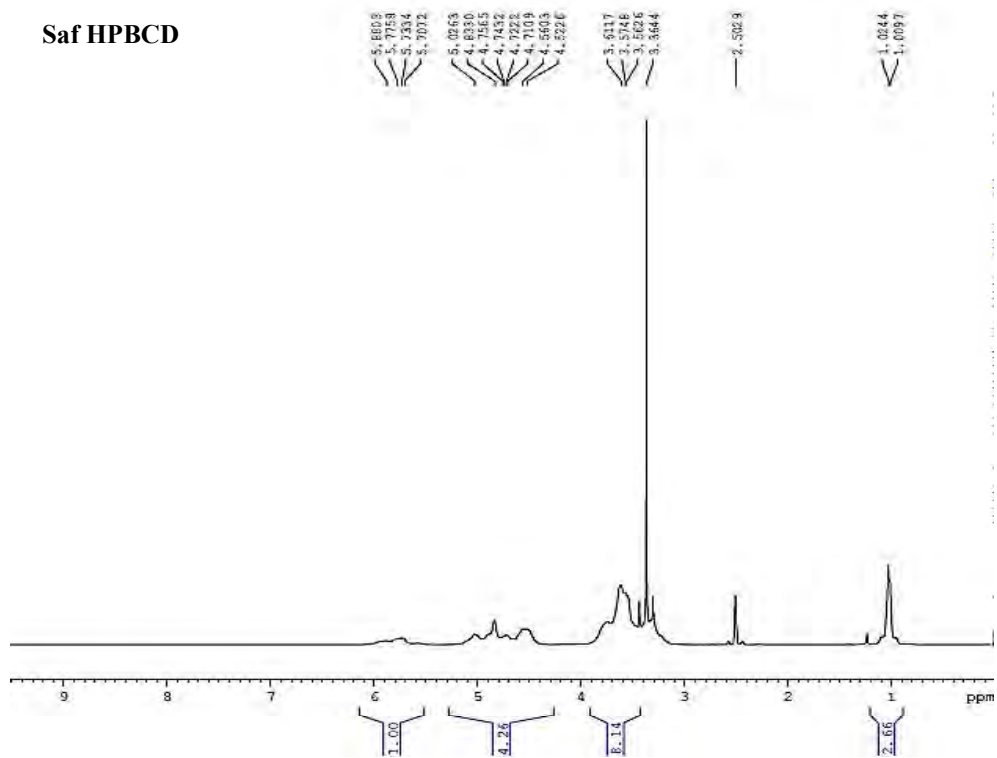
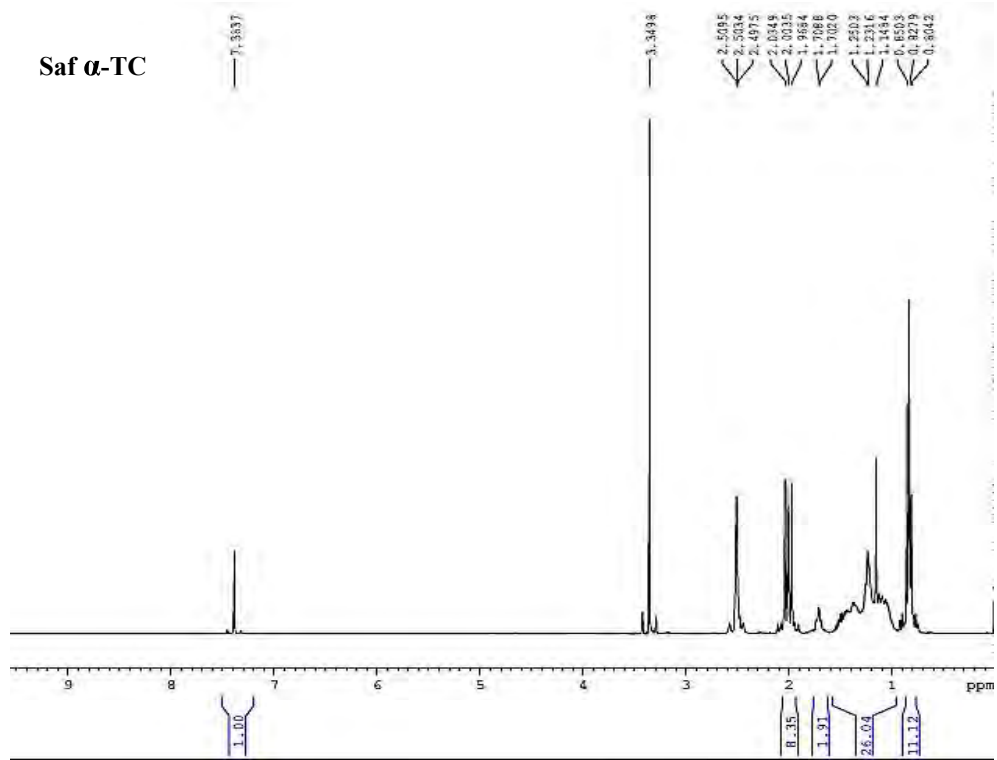
Şekil 5.15.  $\alpha$ -TC:HPBCD fiziksel karışımının ve  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinin FT-IR analiz spektrumları



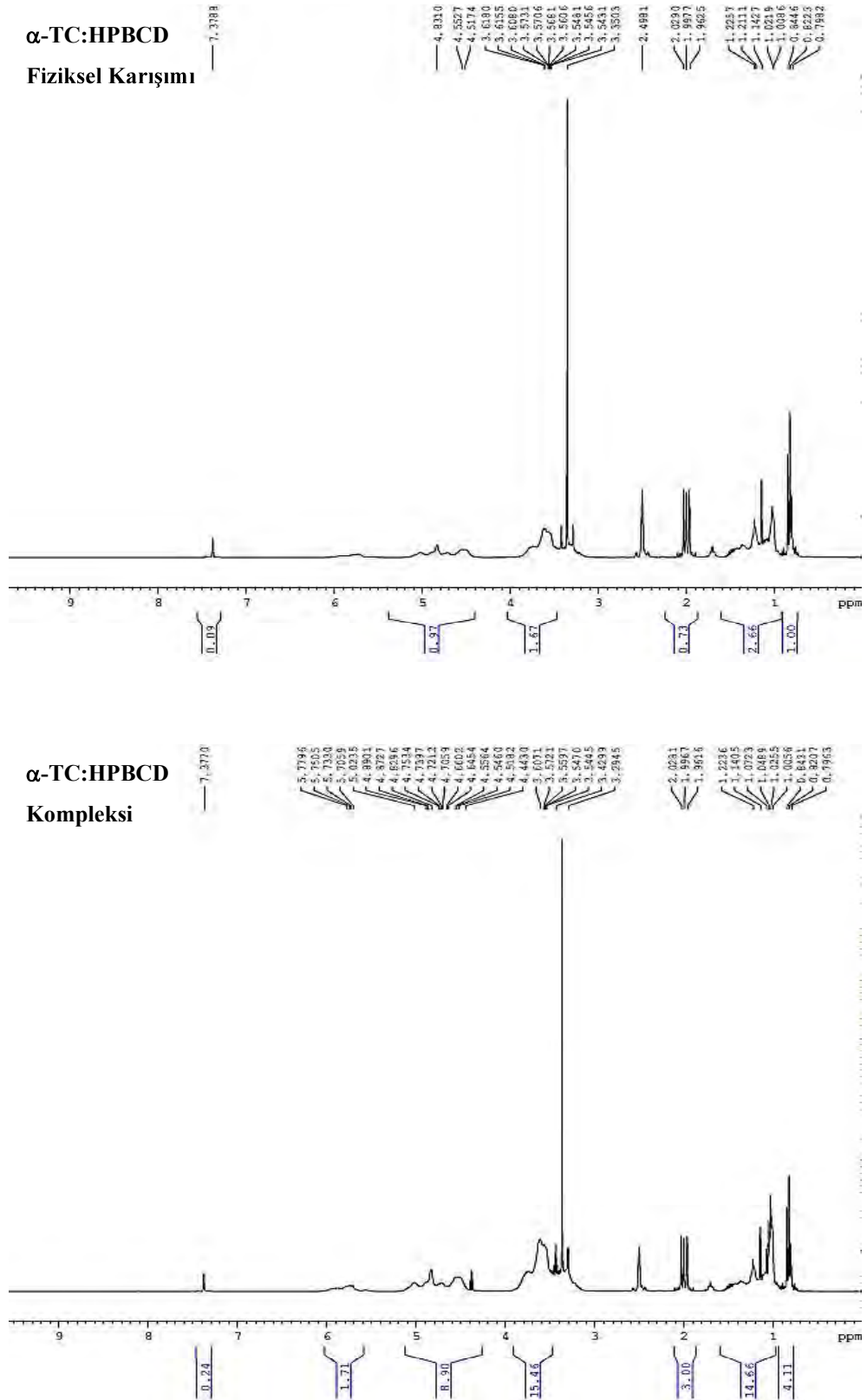
Şekil 5.16. Saf  $\alpha$ -TC ve saf RAMEB'in FT-IR analiz spektrumları



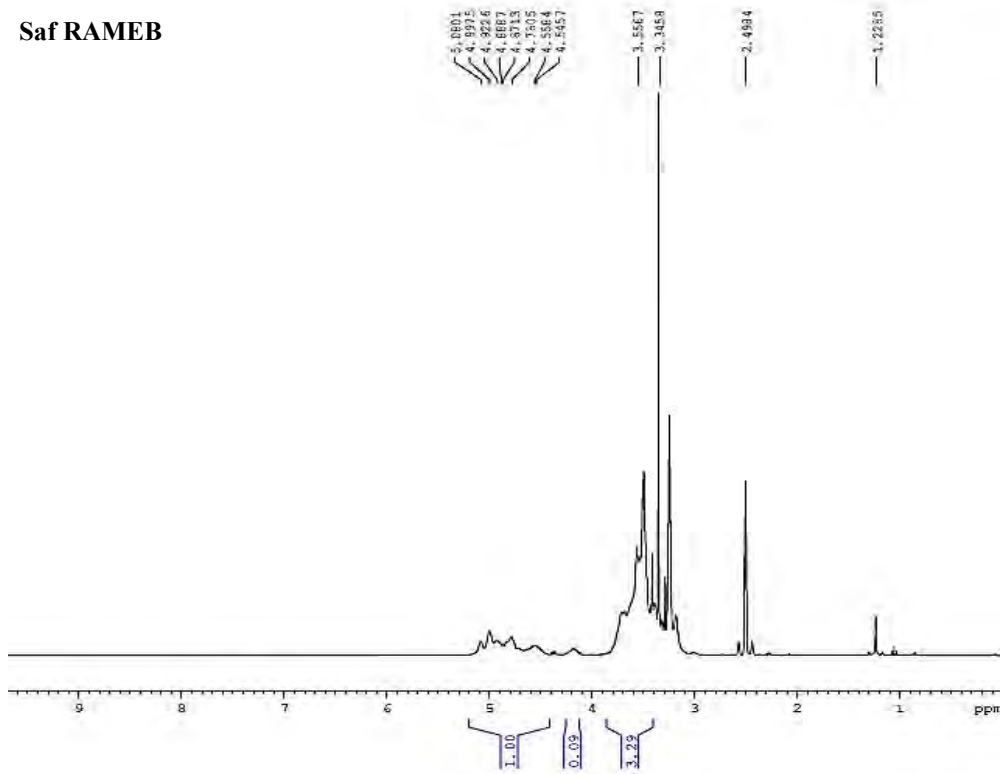
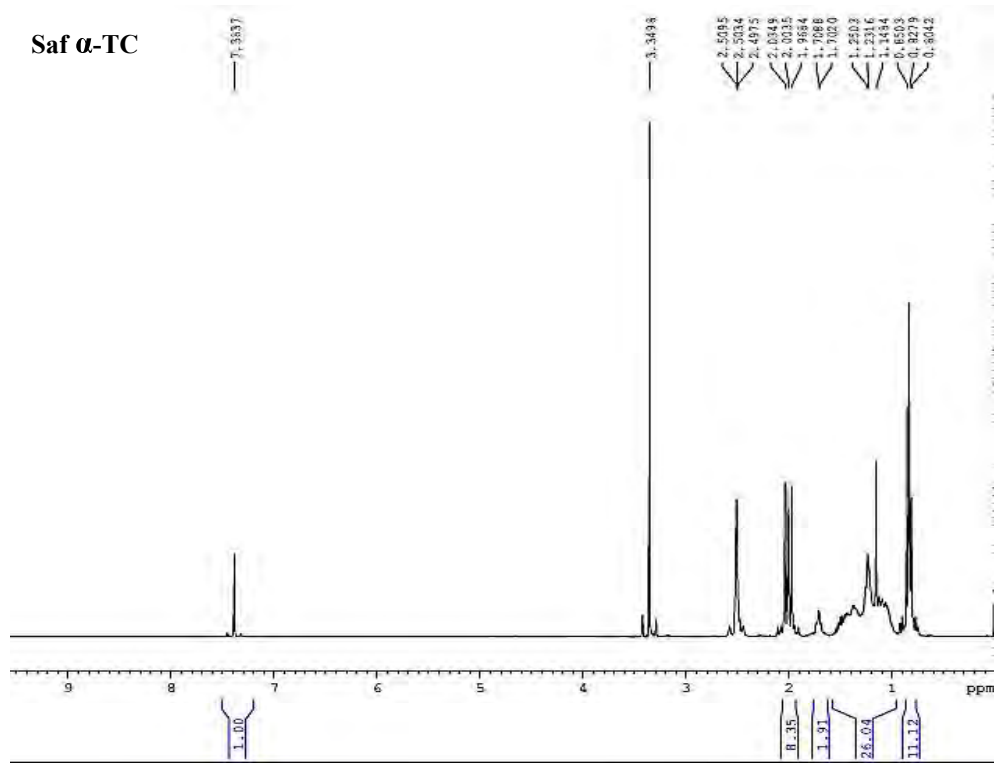
Şekil 5.17.  $\alpha$ -TC:RAMEB fiziksel karışımının ve  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinin FT-IR analiz spektrumları



**Şekil 5.18.** Saf  $\alpha$ -TC ve saf HPBCD'nin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları

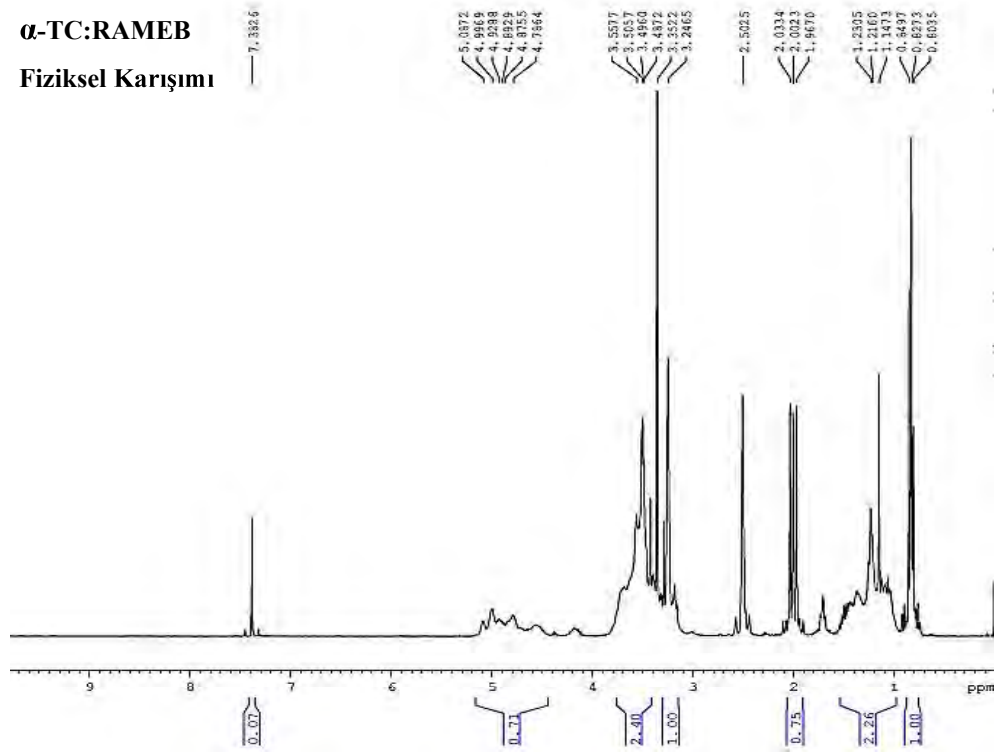


Şekil 5.19.  $\alpha$ -TC:HPBCD fiziksel karışımının ve  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinin  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları

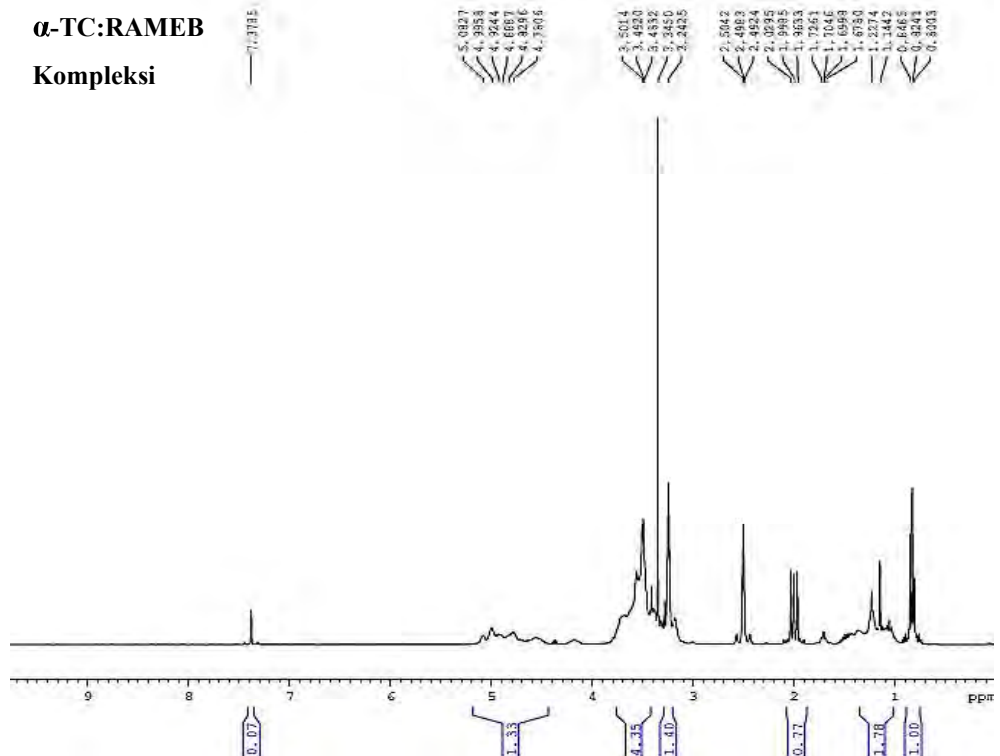


Şekil 5.20. Saf  $\alpha$ -TC ve saf RAMEB'in  $^1\text{H}$ -NMR analiz spektrumları

**$\alpha$ -TC:RAMEB  
Fiziksel Karışımı**



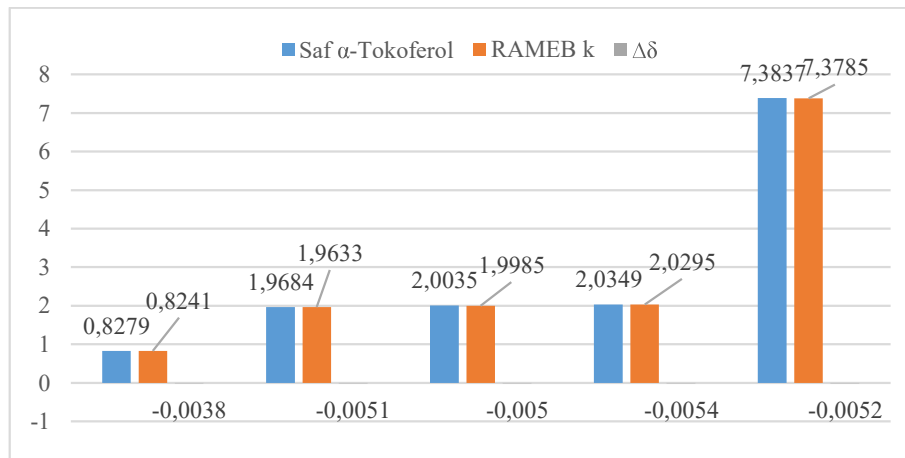
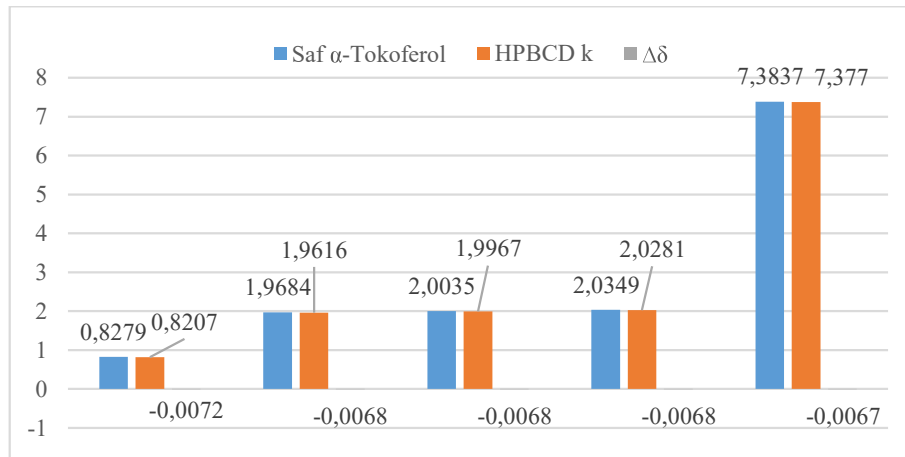
**$\alpha$ -TC:RAMEB  
Kompleksi**



**Şekil 5.21.**  $\alpha$ -TC:RAMEB fiziksel karışımının ve  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinin  $^1\text{H-NMR}$  analiz spektrumları

**Tablo 5.7.** Kompleksleşme sonrası saf  $\alpha$ -TC'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerleri

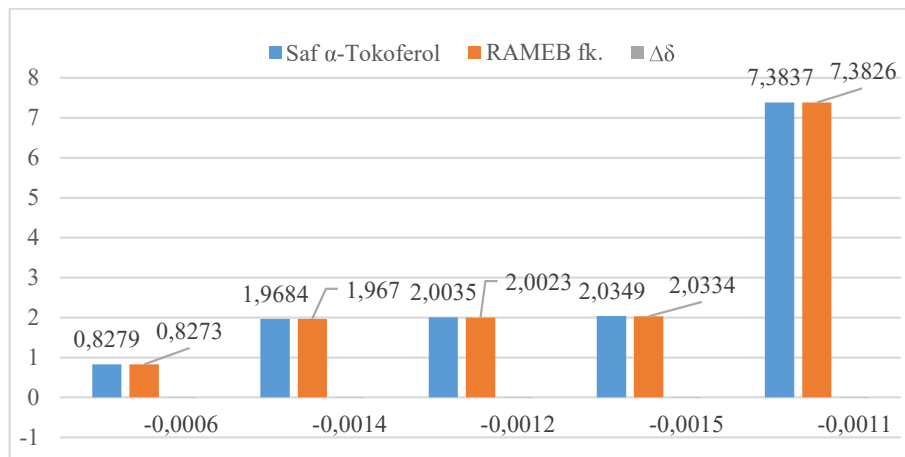
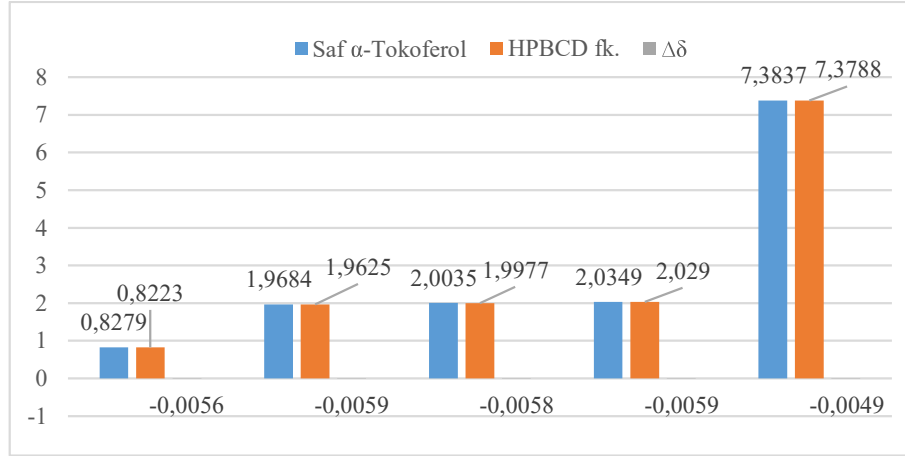
	Saf $\alpha$ -TC $\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:HPBCD Kompleks $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:RAMEB Kompleks $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
1	0,8279	0,8207	-0,0072	0,8241	-0,0038
2	1,9684	1,9616	-0,0068	1,9633	-0,0051
3	2,0035	1,9967	-0,0068	1,9985	-0,005
4	2,0349	2,0281	-0,0068	2,0295	-0,0054
5	7,3837	7,377	-0,0067	7,3785	-0,0052



**Şekil 5.22.** Kompleksleşme sonrası saf  $\alpha$ -TC'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafik

**Tablo 5.8.** Fiziksel karışımdan sonra saf  $\alpha$ -TC'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerleri

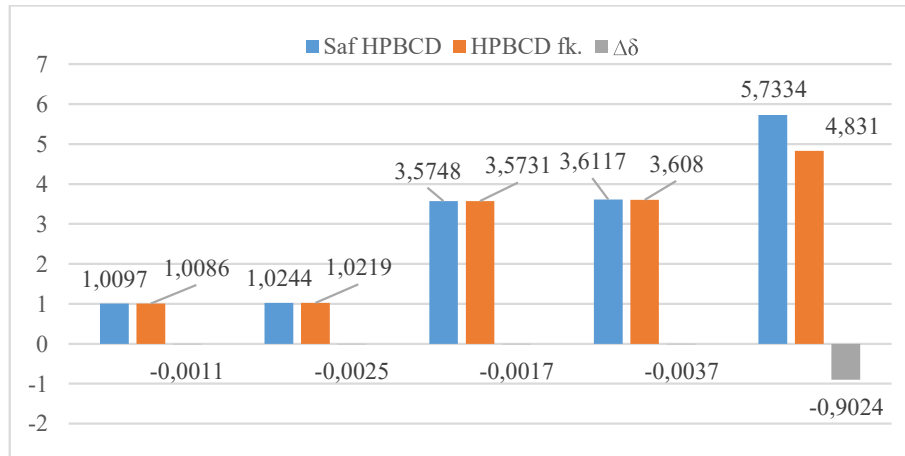
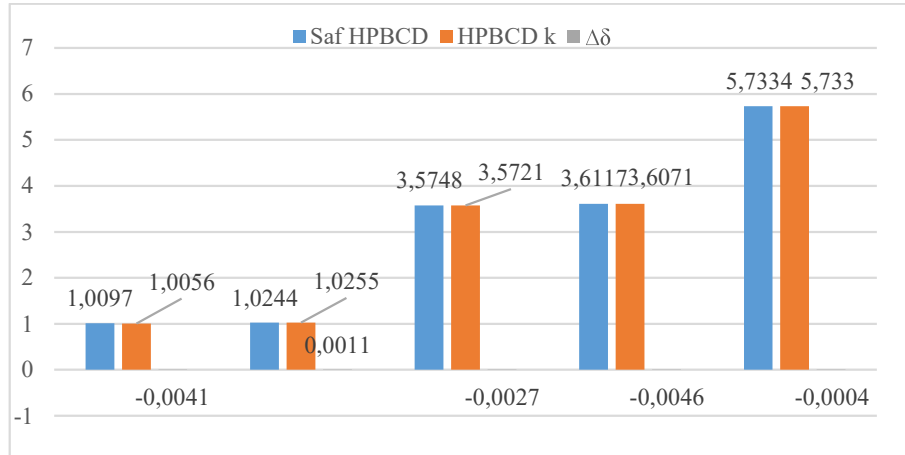
	Saf $\alpha$ -TC $\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:HPBCD Fiziksel Karışım $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:RAMEB Fiziksel Karışım $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
1	0,8279	0,8223	-0,0056	0,8273	-0,0006
2	1,9684	1,9625	-0,0059	1,967	-0,0014
3	2,0035	1,9977	-0,0058	2,0023	-0,0012
4	2,0349	2,029	-0,0059	2,0334	-0,0015
5	7,3837	7,3788	-0,0049	7,3826	-0,0011



**Şekil 5.23.** Fiziksel karışımdan sonra saf  $\alpha$ -TC'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafikler

**Tablo 5.9.** Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf HPBCD'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerleri

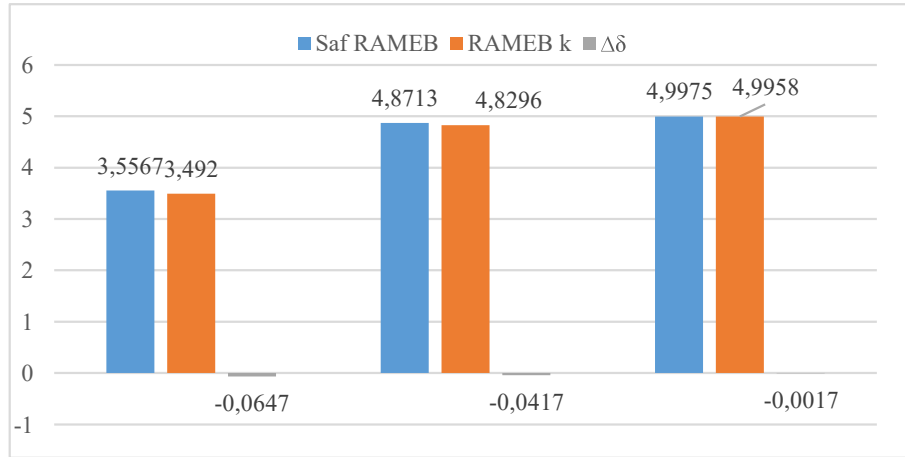
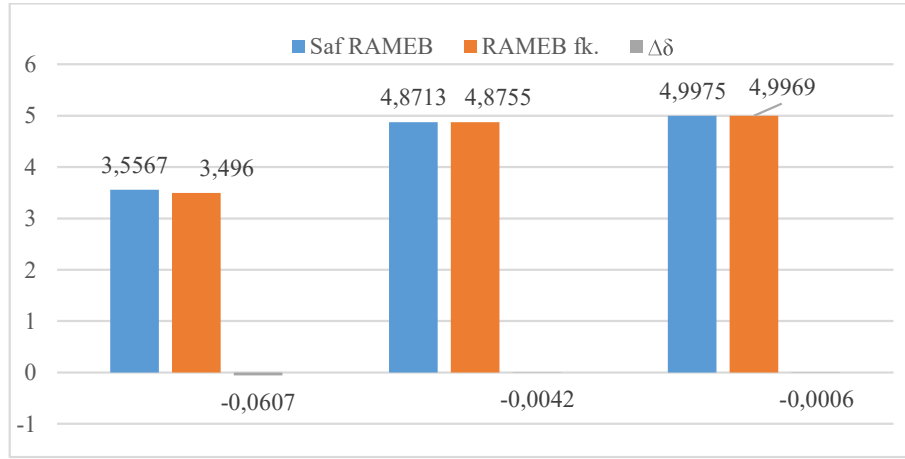
	Saf HPBCD $\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:HPBCD Kompleks $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:HPBCD Fiziksel Karışım $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
1	1,0097	1,0056	-0,0041	1,0086	-0,0011
2	1,0244	1,0255	+0,0011	1,0219	-0,0025
3	3,5748	3,5721	-0,0027	3,5731	-0,0017
4	3,6117	3,6071	-0,0046	3,6080	-0,0037
5	5,7334	5,7330	-0,0004	4,8310	-0,9024



**Şekil 5.24.** Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf HPBCD'nin protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafikler

**Tablo 5.10.** Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf RAMEB'in protonlarındaki kimyasal kayma değerleri

	Saf RAMEB $\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:RAMEB Kompleks $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)	$\alpha$ -TC:RAMEB Fiziksel Karışım $\delta$ (ppm)	$\Delta\delta$ (ppm)
1	3,5567	3,4920	-0,0647	3,4960	-0,0607
2	4,8713	4,8296	-0,0417	4,8755	-0,0042
3	4,9975	4,9958	-0,0017	4,9969	-0,0006



**Şekil 5.25.** Kompleksleşme ve fiziksel karışım sonrası saf RAMEB'in protonlarındaki kimyasal kayma değerlerine ait grafikler

### 5.3.2.6. Enkapsülasyon etkinliği

Hazırlanan komplekslerin EE Bölüm 4.3.3.6.'da açıklanan çalışmayla ve Eşitlik 4.5 kullanılarak hesaplanmış ve sonuçları % olarak **Tablo 5.11.**'da verilmiştir.

**Tablo 5.11.**  $\alpha$ -TC: HPBCD ve  $\alpha$ -TC: RAMEB komplekslerine ait enkapsülasyon etkinliği (ort  $\pm$  SH, n=3)

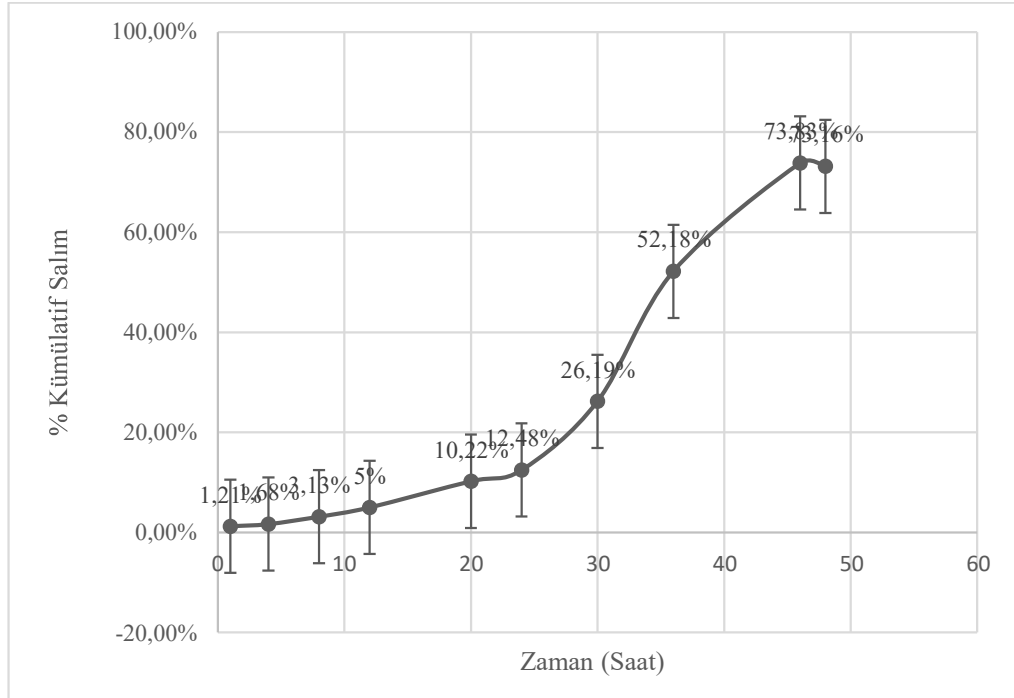
Kompleks	Formülasyondaki $\alpha$ -TC miktarı ( $\mu$ g)	Enkapsüle edilen $\alpha$ -TC miktarı ( $\mu$ g)	% EE
$\alpha$ -TC:HPBCD	690,99 $\pm$ 7,60	539,63 $\pm$ 38,45	<b>78,11 <math>\pm</math> 4,61</b>
$\alpha$ -TC:RAMEB	724,93 $\pm$ 16,47	607,57 $\pm$ 11,30	<b>83,83 <math>\pm</math> 0,47</b>

### 5.3.2.7. Çözünme hızı çalışmaları ve çözünme profillerinin benzerliği

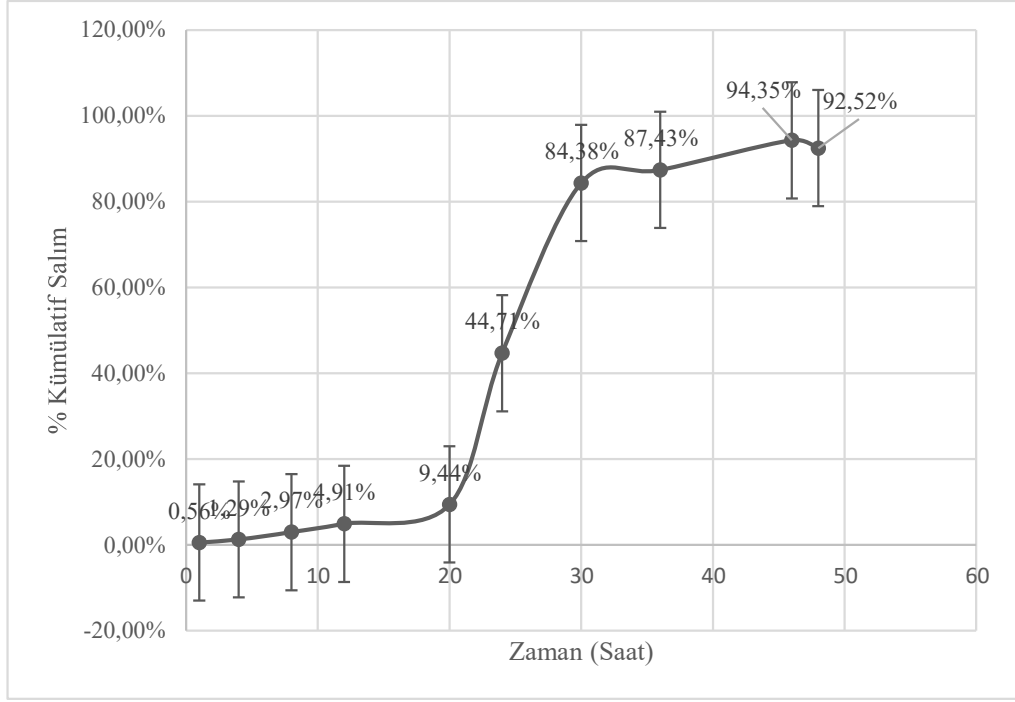
Saf  $\alpha$ -TC ve hazırlanan kompleksler üzerinde Bölüm 4.3.3.7.'de açıklandığı şekilde diyaliz membran yöntemi ile *in vitro* çözünme hızı çalışmaları gerçekleştirilerek, zamana karşılık % kümülatif salınan  $\alpha$ -TC sonuçları **Tablo 5.12.** ve **Şekil 5.26-5.28.**'da verilmiştir.

**Tablo 5.12.**  $\alpha$ -TC'nin diyaliz membrandan % kümülatif salım değerleri (ort  $\pm$  SH, n=6)

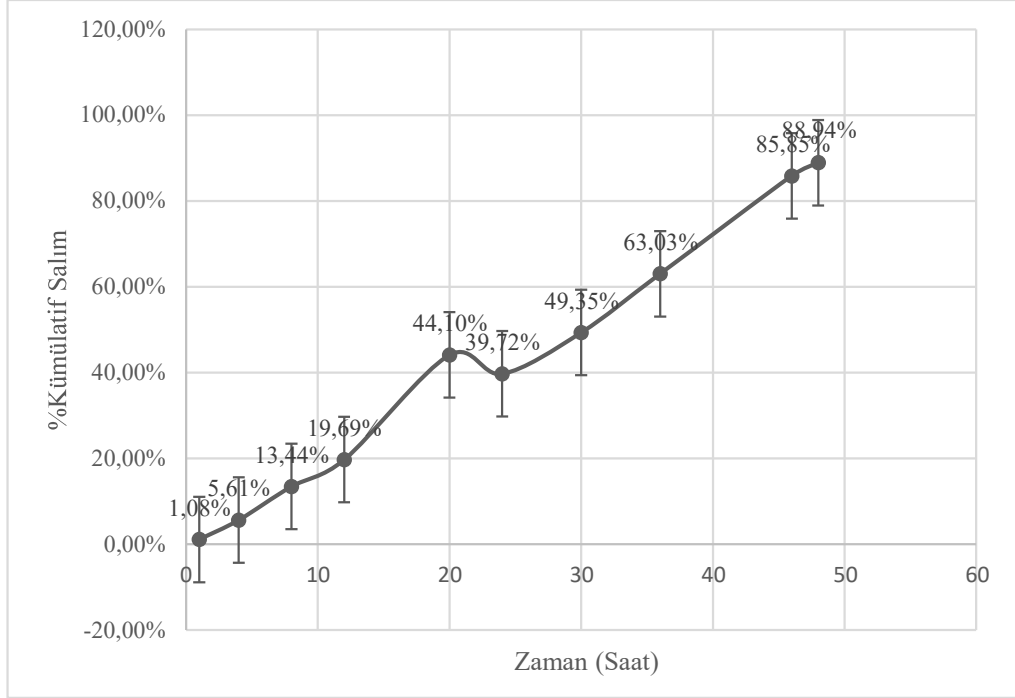
Zaman (Saat)	% Kümülatif salın $\alpha$ -TC miktarı		
	Saf $\alpha$ -TC	$\alpha$ -TC:HPBCD Kompleks	$\alpha$ -TC:RAMEB Kompleks
1.	1,21 $\pm$ 0,24	0,56 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,25
4.	1,68 $\pm$ 0,32	1,29 $\pm$ 0,43	5,61 $\pm$ 1,87
8.	3,13 $\pm$ 0,83	2,97 $\pm$ 1,14	13,44 $\pm$ 3,57
12.	5,00 $\pm$ 0,99	4,91 $\pm$ 1,85	19,69 $\pm$ 4,88
20.	10,22 $\pm$ 2,22	12,73 $\pm$ 3,55	44,10 $\pm$ 12,10
24.	12,48 $\pm$ 3,37	44,70 $\pm$ 21,49	39,72 $\pm$ 8,20
30.	26,19 $\pm$ 5,41	84,38 $\pm$ 28,46	49,35 $\pm$ 8,75
36.	52,18 $\pm$ 22,52	87,42 $\pm$ 27,79	63,03 $\pm$ 4,57
46.	73,83 $\pm$ 18,40	94,35 $\pm$ 27,68	85,85 $\pm$ 5,94
48.	73,17 $\pm$ 18,42	92,52 $\pm$ 25,90	88,94 $\pm$ 7,00



**Şekil 5.26.** Saf  $\alpha$ -TC'nin zamana karşı % kümülatif salım grafiği (ort  $\pm$  SH, n=6)



Şekil 5.27.  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinden saf  $\alpha$ -TC'nin zamana karşı % kümülatif salım grafiği  
(*ort*  $\pm$  *SH*, *n*=6)



Şekil 5.28.  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinden saf  $\alpha$ -TC'nin zamana karşı % kümülatif salım grafiği  
(*ort*  $\pm$  *SH*, *n*=6)

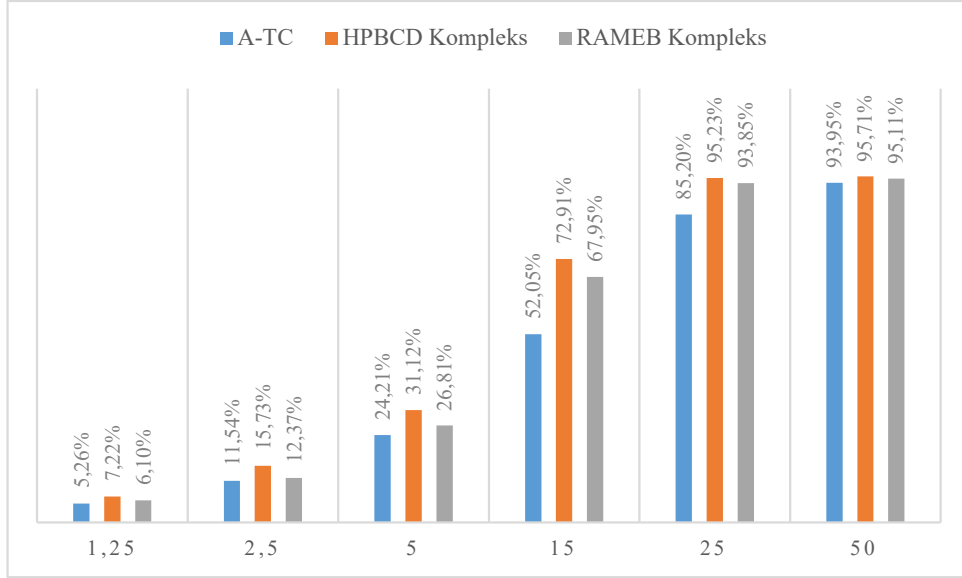
Kompleksleşme sonrasında saf etkin maddenin çözünme hızı davranışında bir değişim olup olmadığını tespit etmek için, saf  $\alpha$ -TC'nin salım profili ile kompleks içerisindeki  $\alpha$ -TC'nin salım profilleri istatistiksel olarak f2 ile değerlendirilerek,  $\alpha$ -TC ile  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksine ait f2 değeri 29,71,  $\alpha$ -TC ile  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksine ait f2 değeri 37,09 bulunmuştur.

### 5.3.2.8. Antioksidan aktivite

CD kompleksleri ve saf  $\alpha$ -TC'nin antioksidan aktiviteleri, DPPH radikaline yönelik süpürücü aktivitenin tespiti ile UV spektrofotometrede belirlenmiştir (Kumari vd., 2010). Bölüm 4.3.3.8.'de anlatıldığı şekilde çalışılarak UV-spektrofotometre ile elde edilen absorbanslar ve Eşitlik 4.7. kullanılarak DPPH absorbansındaki azalmaya bağlı olarak antioksidan aktiviteler % olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar **Tablo 5.13.** ve **Şekil 5.29.**'de verilmiştir.

**Tablo 5.13.**  $\alpha$ -TC ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin antioksidan aktivite sonuçları (Ort  $\pm$  SH, n=6)

C ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Antioksidan Aktivite (%)		
	$\alpha$ -TC	$\alpha$ -TC:HPBCD Kompleks	$\alpha$ -TC:RAMEB Kompleks
1,25	5,26 $\pm$ 0,21	7,22 $\pm$ 0,36	6,1 $\pm$ 0,19
2,5	11,54 $\pm$ 0,47	15,73 $\pm$ 0,32	12,37 $\pm$ 0,29
5	24,21 $\pm$ 0,38	31,12 $\pm$ 0,20	26,81 $\pm$ 0,11
15	52,05 $\pm$ 0,45	72,91 $\pm$ 0,79	67,95 $\pm$ 0,4
25	85,20 $\pm$ 0,38	95,23 $\pm$ 0,12	93,85 $\pm$ 0,44
50	93,95 $\pm$ 0,09	95,71 $\pm$ 0,07	95,11 $\pm$ 0,23



*Şekil 5.29.  $\alpha$ -TC ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerine ait antioksidan aktivite sonuçlarının karşılaştırmalı grafiği*

### **5.3.2.9. Kararlılık çalışmaları**

Bölüm 4.3.3.9.'da anlatıldığı şekilde  $\alpha$ -TC ve kompleksler ile bilinen konsantrasyonda çözeltiler hazırlanarak 4 farklı ortamda (2-8°C buzdolabı, 25°C karanlık, 25°C gün ışığı, 40°C etüv) kararlılık çalışmaları yürütülmüştür. 12. Gün, 20. Gün, 1. Ay sonunda bu ortamlardaki çözelti örnekleri HPLC ile analiz edilerek  $\alpha$ -TC konsantrasyonları ve % geri kalan  $\alpha$ -TC miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar **Tablo 5.14.-5.15.**'de verilmiştir.

**Tablo 5.14.** Kararlılık çalışma ortamlarında bozunmadan kalan toplam mg  $\alpha$ -TC miktarları (ort  $\pm$  SH, n=3)

Kod	Saklama Ortamı	Toplam $\alpha$ -TC miktarı (mg)			
		Başlangıç	12. Gün	20. Gün	30. Gün
$\alpha$ -TC	2-8°C Buzdolabı	33,62 $\pm$ 0,16	33,96 $\pm$ 0,41	32,09 $\pm$ 0,10	31,42 $\pm$ 0,70
	Gün Işığı		3,22 $\pm$ 0,03	3,14 $\pm$ 0,15	3,11 $\pm$ 0,02
	25° C Karanlık		32,58 $\pm$ 0,05	31,63 $\pm$ 0,16	31,13 $\pm$ 0,50
	40° C Etüv		31,68 $\pm$ 0,38	31,41 $\pm$ 0,04	31,32 $\pm$ 0,28
$\alpha$ -TC:HPBCD Kompleks	2-8°C Buzdolabı	48,75 $\pm$ 0,80	47,24 $\pm$ 0,45	46,83 $\pm$ 0,05	46,73 $\pm$ 0,37
	Gün Işığı		4,22 $\pm$ 0,14	4,28 $\pm$ 0,02	4,07 $\pm$ 0,13
	25° C Karanlık		47,19 $\pm$ 0,29	46,00 $\pm$ 0,42	46,00 $\pm$ 0,05
	40° C Etüv		46,50 $\pm$ 0,13	45,67 $\pm$ 0,55	45,54 $\pm$ 0,18
$\alpha$ -TC:RAMEB Kompleks	2-8°C Buzdolabı	38,59 $\pm$ 1,09	40,15 $\pm$ 0,12	39,24 $\pm$ 0,45	38,72 $\pm$ 0,84
	Gün Işığı		3,64 $\pm$ 0,14	3,29 $\pm$ 0,50	3,22 $\pm$ 0,17
	25° C Karanlık		39,48 $\pm$ 0,42	37,89 $\pm$ 0,11	37,77 $\pm$ 0,29
	40° C Etüv		37,74 $\pm$ 0,19	37,74 $\pm$ 0,21	37,41 $\pm$ 0,43

**Tablo 5.15.** Kararlılık çalışma ortamlarında bozunmadan kalan %  $\alpha$ -TC miktarları (ort  $\pm$  SH, n=3)

Kod	Saklama Ortamı	% $\alpha$ -TC			
		Başlangıç	12. Gün	20. Gün	30. Gün
$\alpha$ -TC	2-8°C Buzdolabı	100	101,09 $\pm$ 1,21	95,47 $\pm$ 0,28	93,46 $\pm$ 2,09
	Gün Işığı		9,57 $\pm$ 0,08	9,34 $\pm$ 0,43	9,25 $\pm$ 0,07
	25° C Karanlık		96,92 $\pm$ 0,14	94,10 $\pm$ 0,49	92,60 $\pm$ 1,50
	40° C Etüv		94,23 $\pm$ 1,14	93,44 $\pm$ 0,12	91,10 $\pm$ 0,84
$\alpha$ -TC:HPBCD Kompleks	2-8°C Buzdolabı	100	96,90 $\pm$ 0,93	96,06 $\pm$ 0,12	95,86 $\pm$ 0,75
	Gün Işığı		8,65 $\pm$ 0,29	8,68 $\pm$ 0,03	8,36 $\pm$ 0,26
	25° C Karanlık		96,81 $\pm$ 0,59	94,37 $\pm$ 0,87	94,37 $\pm$ 0,11
	40° C Etüv		95,40 $\pm$ 0,26	93,70 $\pm$ 1,13	93,42 $\pm$ 0,36
$\alpha$ -TC:RAMEB Kompleks	2-8°C Buzdolabı	100	104,05 $\pm$ 0,32	101,69 $\pm$ 1,16	100,33 $\pm$ 2,16
	Gün Işığı		9,43 $\pm$ 0,36	8,53 $\pm$ 1,29	8,36 $\pm$ 0,45
	25° C Karanlık		102,31 $\pm$ 1,08	98,18 $\pm$ 0,27	97,87 $\pm$ 0,75
	40° C Etüv		97,81 $\pm$ 0,48	97,79 $\pm$ 0,56	96,93 $\pm$ 1,10

## 6. TARTIŞMA

Bu bölümde  $\alpha$ -TC ile  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB inklüzyon komplekslerinin hazırlanması sırasında yapılan çalışmalar ve hazırlanan kompleksler üzerinde yapılan çalışmaların bulguları tartışılacaktır.

### 6.1. Analitik Yöntem Validasyonu Çalışmaları

Araştırmanın çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında UV spektrofotometri,  $\alpha$ -TC:CD kompleksleri ile yapılan kantitatif analizler için HPLC yöntemi kullanıldığından, her iki yöntem için de validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. HPLC, yüksek duyarlılığa sahip olması, hızlı sonuç vermesi, kolay uygulanabilir olması nedenleriyle tercih edilmiştir (Eser ve Dinçel, 2018).

HPLC yönteminde uygun pik morfolojisi ve alıkonma zamanının elde edildiği şartlarda, metanol:asetonitril (95:5, *h/h*) mobil fazı ile çalışılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C, mobil faz akış hızı 1 mL.dk<sup>-1</sup> ve enjeksiyon hacmi kolonun çalışma koşullarına bağlı olarak 20 µL olarak belirlenmiştir. 292 nm dalga boyunda, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm C18 kolon ile çalışılmıştır (Başyigit vd., 2018). HPLC yönteminin validasyon çalışmalarında doğrusallık, doğruluk, kesinlik, hassasiyet, seçicilik ve kararlılık parametreleri incelenerek, ICH kriterlerine göre değerlendirilmiş ve yöntemin güvenli olduğu kanıtlanmıştır (ICH Q2B, 1996).

15-90 µg.mL<sup>-1</sup> konsantrasyon aralığındaki doğrusallık çalışmalarından elde edilen regresyon eğrisinin korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,9999 bulunmuş ve yöntemin doğrusallığı kanıtlanmıştır (**Şekil. 5.1**). Üç farklı konsantrasyon (15, 45, 90 µg.mL<sup>-1</sup>) ile yapılan doğruluk çalışmalarında, tüm konsantrasyonlarda elde edilen geri kazanım sonuçlarının ±%2 sınırları içerisinde olduğu ve yöntemin doğruluk kriterlerine uygunluğu gösterilmiştir (**Tablo 5.1**).

Üç farklı konsantrasyonda (15, 45, 90 µg.mL<sup>-1</sup>) ve üç farklı günde yapılan kesinlik çalışmalarında gün-içi RSD değerleri sırasıyla 1,21, 1,36, 0,28'dir. Günler-arası RSD değerleri ise sırasıyla 1,38, 4,79, 5,73'dür. Tekrarlanabilirlik (gün-içi) değerleri ≤2, tekrar elde edilebilirlik (günler-arası) değerleri ise ≤6 olarak bulunmuştur (**Tablo 5.2**).

Analitik yöntemin güvenilirliği için yöntemin duyarlılığını gösteren saptama ve tayin sınırlarının (LOD ve LOQ) çalışma aralığının en düşük konsantrasyonunun altında

olması istenmektedir. LOD ve LOQ değerleri eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır (Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2). Elde edilen LOD değeri  $1,54 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , LOQ değeri ise  $4,68 \mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Duyarlılık verilerinin doğrusallığın gösterildiği  $15-90 \mu\text{g.mL}^{-1}$  aralığının altında olması nedeniyle yöntemin duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Çalışılan yöntemin doğru ve güvenilir sonuç verebilmesi için çalışılan ortamın etkin maddeye seçici olması yani alıkonma zamanına girişim yapmaması gerekmektedir (Ongar, 2019). Seçicilik çalışmaları sırasında, mobil faz, çözünme hızı çalışma ortamı,  $\alpha$ -TC'un mobil faz içerisindeki çözeltisi ve  $\alpha$ -TC'un çözünme hızı ortamındaki çözeltisi HPLC ile aynı şartlarda analiz edilmiştir. Analizlerden elde edilen kromatogramlar dikkatle incelendiğinde  $\alpha$ -TC'nin alıkonma zamanında, mobil fazın ve çözünme hızı çalışma ortamının herhangi bir girişim yapmadığı gözlenmiştir (**Şekil 5.2**). Bu durum kullanılan yöntemin,  $\alpha$ -TC'nin mobil faz ve çözünme hızı ortamlarındaki analizlerinde seçici ve kullanılmasının uygun olduğunu göstermektedir.

Analizlerden doğru sonuç alınabilmesi için etkin maddenin çözüldüğü ortam ve çalışma şartlarında kararlılığının değişmemesi gerekmektedir (Ongar, 2019). Kararlılık parametresinin incelenmesi amacıyla  $\alpha$ -TC'un çözünme hızı çalışmasının yapıldığı pH 7,4 etanol:fosfat tamponu (76:24, *h/h*)'ndaki  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyonda hazırlanan çözeltileri,  $37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de çözünme hızının takip edildiği süre (48 saat) bekletilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (1,2,4,8,12,24. saat) HPLC ile ölçülen konsantrasyonlarda başlangıçtaki konsantrasyonun ( $50,81 \pm 0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) 48. saat sonunda değişmediği ( $50,73 \pm 1,16 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) görülerek  $\alpha$ -TC'un çözünme ortamında ve çalışma sıcaklığında kararlı olduğu tespit edilmiştir (**Tablo 5.3**).

Çözünürlük faz diyagramı çalışmalarında kullanılan UV spektrofotometri yönteminde  $20-120 \mu\text{g.mL}^{-1}$  konsantrasyon aralığındaki doğrusallık çalışmalarından elde edilen regresyon eğrisinin korelasyon katsayısı ( $R^2$ ) 0,9993 bulunmuş ve yöntemin doğrusallığı kanıtlanmıştır (**Şekil 5.3**). Üç farklı konsantrasyon ( $20, 60, 120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ile yapılan doğruluk çalışmalarında, tüm konsantrasyonlarda elde edilen geri kazanım sonuçlarının  $\pm\%2$  sınırları içerisinde olduğu ve yöntemin doğruluk kriterlerine uygunluğu gösterilmiştir (**Tablo 5.4**). Üç farklı konsantrasyonda ( $20, 60, 120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ve üç farklı günde yapılan kesinlik çalışmalarında  $20, 60, 120 \mu\text{g.mL}^{-1}$  için gün-içi RSD değerleri sırasıyla 2,63, 3,01, 0,83'tür. Günler-arası RSD değerleri ise sırasıyla 5,31, 3,83, 5,6'dır.

Tekrarlanabilirlik (gün-içi) değerleri  $\leq 3$ , tekrar elde edilebilirlik (günler-arası) değerleri ise  $\leq 6$  olarak bulunmuştur (**Tablo 5.5**). Analitik yöntemin güvenilirliği için yöntemin hassasiyetini gösteren saptama ve tayin sınırlarının (LOD ve LOQ) çalışma aralığının en düşük konsantrasyonunun altında olması istenmektedir. LOD ve LOQ değerleri eşitlikler yardımıyla hesaplanmıştır (Eşitlik 4.1 ve Eşitlik 4.2). Elde edilen LOD değeri  $1,47 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , LOQ değeri ise  $4,44 \mu\text{g.mL}^{-1}$  olarak bulunmuştur. Hassasiyet verilerinin doğrusallığın gösterildiği  $20-120 \mu\text{g.mL}^{-1}$  aralığının altında olması nedeniyle yöntemin duyarlı olduğu gösterilmiştir.

UV spektrofotometre ile yürütülen seçicilik çalışmalarında,  $\alpha$ -TC, HPBCD, RAMEB'in tek başına ve  $\alpha$ -TC ile HPBCD'in,  $\alpha$ -TC ile RAMEB'in bir arada bulunduğu çözeltilerin UV spektrofotometre ile spektrumları alınmıştır.  $\alpha$ -TC içeren örneklerde  $292 \text{ nm}$ 'de  $\alpha$ -TC'nin maksimum absorbans piki gözlenirken, saf HPBCD, saf RAMEB örneklerinde  $292 \text{ nm}$ 'de herhangi bir pik gözlenmemiştir. Elde edilen spektrumlar, kullanılan yöntemin  $\alpha$ -TC için seçici olduğunu göstermektedir (**Şekil 5.4**).

Etanol:su (2:1, *h/h*) çözücü sisteminde yapılan analizlerde UV spektrofotometri yöntemi kullanıldığı için  $\alpha$ -TC'un bu ortamdaki kararlılığı araştırılmıştır. Etkin maddenin etanol:su (2:1, *h/h*) ortamında kararlı olduğunu göstermek amacıyla, bu çözücü ile 2 farklı konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler 8 gün boyunca oda sıcaklığında takip edilmiş ve belirli zaman aralıklarında (3.gün, 5.gün, 8.gün) örnekler alınarak UV spektrofotometre ile %  $\alpha$ -TC kayıp miktarları tespit edilmiştir. Çalışmalar her iki konsantrasyon için de üçer kez tekrarlanmıştır. İlk konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerde başlangıçta %100 kabul edilen  $\alpha$ -TC miktarları, 3. gün sonunda  $96,10 \pm 0,91$  (ort $\pm$ SH), 5. gün sonunda  $93,08 \pm 0,73$  (ort $\pm$ SH) ve 8. gün sonunda  $89,67 \pm 0,78$  (ort $\pm$ SH)'e düşmüştür. Bu konsantrasyona göre %  $\alpha$ -TC kayıp miktarları 3 günde %3,90, 5 günde %6,92 ve 8 günde %10,33'tür. İkinci konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerde ise başlangıçta %100 kabul edilen %  $\alpha$ -TC miktarları, 3. gün sonunda  $96,31 \pm 0,94$  (ort $\pm$ SH), 5. gün sonunda  $92,92 \pm 1,20$  (ort $\pm$ SH) ve 8. gün sonunda  $89,62 \pm 1,63$  (ort $\pm$ SH)'e düşmüştür. Bu konsantrasyona göre %  $\alpha$ -TC kayıp miktarları 3 günde %3,69, 5 günde %7,08 ve 8 günde %10,38'dir. Her iki konsantrasyonda da oda sıcaklığındaki etanol:su (2:1, *h/h*) ortamında  $\alpha$ -TC miktarında azalmalar meydana geldiğinden, etkin

maddenin bu ortam ve sıcaklıkta kararlı olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle çözünürlük faz çalışmaları ve kompleks hazırlamadaki çalkalama sürelerinin en az % $\alpha$ -TC kaybının görüldüğü 3 gün olmasına karar verilmiştir.

## 6.2. Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

$\alpha$ -TC'nin pratik olarak suda çözünmediği, ısı, ışık, nem gibi stres koşullarında kararlılığının düşük olduğu, kararlılığı arttırmak için yapılan ester formlarının ise  $\alpha$ -TC'e göre antioksidan aktivitesinin daha düşük olduğu literatürde gösterilmiştir (Fiume, 2002). Bunun üzerine  $\alpha$ -TC formülasyonlarında, çözünürlük ve kararlılık üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle  $\alpha$ -TC ile birlikte CD'lerin kullanımının uygun olacağı düşünülmüştür. Çalışmada da bu amaçlarla HPBCD ve RAMEB ile kompleksler hazırlanmıştır. RAMEB metil türevi, HPBCD ise hidrosialkali türevi bir CD'dir. Her ikisinin de sudaki çözünürlükleri doğal  $\beta$ -CD'lere göre çok daha iyidir (Taneri 2004). Çalışmada tercih edilmelerinin bir sebebi budur.

### 6.2.1. Çözünürlük faz çalışmaları

Artan konsantrasyonlarda (0-30 mM) CD içeren etanol:su (2:1, *h/h*) ortamında denge süresince (3 gün) yatay olarak çalkalanan aşırı doymuş  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB karışımları filtre edildikten sonra UV spektrofotometri ile analiz edilmiştir. Analiz sonuçlarına göre çözünen  $\alpha$ -TC konsantrasyonları (mM) hesaplanarak her bir CD konsantrasyonuna (mM) karşı sırasıyla grafiğe geçirilmiş ve çözünürlük faz diyagramları elde edilmiştir (**Şekil 5.8.-5.9**). Hem  $\alpha$ -TC:HPBCD hem de  $\alpha$ -TC:RAMEB'e ait çözünürlük faz diyagramları **Şekil 5.10**'daki Higuchi'nin çözünürlük faz diyagramı ile karşılaştırıldığında 1:1 molar oranda kompleks oluşturan  $A_L$  tipinde olduğu gözlenmiştir (Loftsson vd., 2005; Higuchi ve Connors, 1965). Doğal CD'lerin genel olarak B tipi faz diyagramı oluşturmalarına karşılık, HPBCD ve RAMEB gibi CD türevlerinin doğal CD'lerden farklı olarak A tipi faz diyagramı oluşturdıkları literatürde belirtilmektedir (Loftsson ve Brewster, 2010). Çözünürlük faz diyagramı sonuçlarına ve Eşitlik 4.3'e göre hesaplanan Kc değerleri  $\alpha$ -TC:HPBCD için 82,31 M<sup>-1</sup>,  $\alpha$ -TC:RAMEB için 40,32 M<sup>-1</sup> dir. Literatüre göre optimum Kc değerlerinin 100-1000 M<sup>-1</sup> aralığında olduğu bilindiğinden hazırlanan komplekslerdeki etkileşmenin çok yüksek olmadığı belirlenmiştir (Corciova vd., 2015).

CD komplekslerinin hazırlanma aşamalarında ise, etanol:su (2:1, *h/h*) çözücü sistemi içerisinde hazırlanan  $\alpha$ -TC çözeltisi üzerine eklenen 1:1 molar orandaki HPBCD ve RAMEB ile berrak çözeltiler elde edilmiştir. Elde edilen çözeltiler denge süresi (3 gün) boyunca yatay çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Kompleks eldesi sırasında  $\alpha$ -TC'nin sıcaklığa karşı dayanıksız olması sebebiyle  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de dondurma ve liyofilizatörde kurutma yöntemleri kullanılmıştır. Tüm işlemler sonucunda kompleksler kuru toz halde elde edilmiştir. Elde edilen kompleksler üzerinde çözünürlük çalışmaları, morfolojik analiz, termal analiz, FT-IR ve  $^1\text{H-NMR}$  analizi, enkapsülasyon etkinliği, çözünme hızı çalışmaları, antioksidan aktivite tayini ve kararlılık çalışmaları yapılmıştır.

### **6.3. İnküzyon Kompleksleri Üzerinde Yapılan Çalışmalar**

#### **6.3.1. Çözünürlük çalışmaları**

HPBCD ve RAMEB ile kompleks oluşumunun  $\alpha$ -TC'nin sudaki çözünürlüğünü değiştirip değiştirmediğini anlamak için yapılan çalışmalarda, hem saf etkin maddeye hem de komplekslere ait bir çözünürlük oranı tespit edilememiştir. Böylece kompleksleşmenin  $\alpha$ -TC'nin sudaki çözünürlüğü üzerinde bir etki yaratmadığına karar verilmiştir. SLS yüzey aktif bir maddesinin %1'lik sulu çözeltisi ile aynı çalışmalar tekrarlandığında saf  $\alpha$ -TC ve komplekslerdeki  $\alpha$ -TC'nin bir miktar çözüldükleri gözlenmiştir. Saf  $\alpha$ -TC,  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB'deki  $\alpha$ -TC'nin %1'lik SLS varlığında sudaki çözünürlüğü sırasıyla  $7,74 \pm 3,08$  (ort $\pm$ SH)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $18,49 \pm 4,28$  (ort $\pm$ SH)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ,  $23,99 \pm 7,41$  (ort $\pm$ SH)  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  şeklindedir (**Tablo 5.6**). SLS,  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksindeki  $\alpha$ -TC'nin çözünürlüğünü saf etkin maddeye göre yaklaşık 2,5 kat,  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksindeki  $\alpha$ -TC'nin çözünürlüğünü ise yaklaşık 3 kat arttırmıştır. Bu durumda  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinin %1 SLS varlığında sudaki çözünürlüğü,  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinin sudaki çözünürlüğünden daha yüksektir ve kompleks oluşumu, SLS bulunan sulu ortamda  $\alpha$ -TC'nin çözünürlüğünü arttırmıştır denebilir.

#### **6.3.2. Morfolojik analiz**

Elektro-optik prensipler çerçevesinde tasarlanmış olan SEM, yüksek enerjili elektronların malzeme ile etkileşerek örnek yüzeyinden görüntü alınmasını sağlayan

sistemlerdir (http-2). SEM’de görüntü oluşumu temel olarak; elektron demetinin incelenen örneğin yüzeyi ile yaptığı fiziksel etkileşmelerin sonucunda ortaya çıkan sinyallerin toplanması ve incelenmesi prensibine dayanmaktadır (http-3).

SEM’de yalnızca katı maddeler ile çalışılabildiği için viskoz yapıdaki  $\alpha$ -TC’nin SEM görüntüsü alınamamıştır. Saf HPBCD, saf RAMEB ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin SEM görüntüleri **Şekil 5.11**’deki gibidir.

Kompleksleşme öncesi görüntülerde saf HPBCD ve saf RAMEB molekülleri düzenli ve homojen dağılmışlardır, ayrıca moleküller pürüzsüz bir küre şekline sahiplerdir. Elde edilen bu görüntüler literatür ile uyumludur (Ibrahim ve Bowra, 2019; Sobrinho vd., 2011). Kompleksler, dondurularak kurutma yöntemi ile hazırlandıkları için enkapsüle olan ürün içinde oluşan buz, partiküllerin çökmesini ve büzülmesini önlemiştir (Ibrahim ve Bowra, 2019). Kompleksleşme sonrasında partikül morfolojisi tamamen değişmiş ve partikül büyümesi ortaya çıkmıştır. Bu yapısal değişimler  $\alpha$ -TC’nin HPBCD ve RAMEB ile etkileşerek kompleks oluşturduğunu göstermektedir (Menezes vd., 2012). Elde edilen sonuçlarda,  $\alpha$ -TC:RAMEB’de  $\alpha$ -TC:HPBCD’e göre hazırlama sonrası şekilsel açıdan daha birbirine benzer iyi dağılım gösteren ürün izlenmiştir.

### **6.3.3. Termal analiz**

Saf bileşenlerin ( $\alpha$ -TC, HPBCD, RAMEB), fiziksel karışımlarının ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin karakterizasyon çalışmaları için termal analiz yöntemi olarak DSC seçilmiştir. DSC, CD türevlerinin yapısı ve  $\alpha$ -TC’nin fiziksel durumu hakkında bilgi vermektedir. Ayrıca oluşan yapının yalnızca bir fiziksel karışım ya da inklüzyon kompleksi olduğu DSC analizleri ile anlaşılabilir (Li vd., 2013).

Saf bileşenlerin ( $\alpha$ -TC, HPBCD, RAMEB), fiziksel karışımlarının ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin DSC termogramları **Şekil 5.12.-5.13.**’de verilmiştir.  $\alpha$ -TC’nin DSC termogramında tek bir keskin pik gözlenirken, CD komplekslerinde daha geniş endotermik bantlar gözlenmiştir. Bu durum literatür ile uyumludur ve  $\alpha$ -TC’nin CD boşluğuna yerleşmiş olabileceği ile ilgili fikir vermektedir (Nicolescu, Aramă ve Monciu, 2010). Çünkü komplekslerde CD’lerin karakteristik piklerinin azalması ve  $\alpha$ -TC’nin CD’lerin boşluğunda tutunmasından dolayı keskin endotermik pikinin kaybolması kompleksleşmenin kanıtı olarak görülmektedir (Darwish vd., 2014; Yurtdaş vd., 2011).

Fakat, etkin madde ve CD'lerin fiziksel karışımı sonrasında bileşenlere ait iki adet endotermik pik gözlenmesi gerekirken gözlenmemiştir (Ficarra vd., 2002).

#### 6.3.4. FT-IR analizi

FT-IR, ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen kimyasal bir yöntemdir (Kılıç ve Karahan, 2010). Maddeyi oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri ile örneğin parmak izini göstermektedir (Büyüksırt ve Kuleasan, 2014).

Saf bileşenlerin ( $\alpha$ -TC, HPBCD, RAMEB), fiziksel karışımlarının ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin FT-IR analiz spektrumları **Şekil 5.14.- 5.17.**'de verilmiştir.  $\alpha$ -TC'nin FT-IR analizinde gözlenen, 1084  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $-\text{C}_6\text{H}_5$  düzlem bükülmesi, 1261  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $-\text{CH}_2$ , 1456  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $-\text{C}_6\text{H}_5$  iskeleti ve 1460  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $-\text{CH}_2$  asimetric gerilimi, 2924  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $-\text{CH}_2$  asimetric ve simetric gerilme titreşimleri, 3443  $\text{cm}^{-1}$ 'deki  $-\text{OH}$  gerilim bandına ait karakteristik piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (**Şekil 5.14**) (Silva vd., 2009).

Saf HPBCD'nin FT-IR analizinde, 1152  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-O titreşimi, 1647  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H gerilme titreşimi, 2922  $\text{cm}^{-1}$ 'de C-H gerilme titreşimi, 3302  $\text{cm}^{-1}$ 'de O-H gerilme titreşimlerinde gözlenen karakteristik pikler literatür ile uyumludur (**Şekil 5.14**) (Yuan vd., 2015).  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinde  $\alpha$ -TC'ye ait karakteristik piklerden 1084, 1261 ve 3443  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pikler kaybolmuş, 1456  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik ise yer değiştirmiştir.

Literatüre göre saf RAMEB'in spektrumları 3300-3500  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{OH}$  gerilme titreşimleri nedeniyle yoğun bantlarla karakterize edilirken, 2800-3300  $\text{cm}^{-1}$ 'de  $-\text{CH}$  ve  $-\text{CH}_2$  titreşimleri görülmektedir (Nicolescu, Aramă ve Monciu, 2010). Elde edilen FT-IR spektrumları bu literatüre uyumlu olmakla birlikte 407, 419, 426, 966, 1036, 1084, 1155, 1339, 1647, 2924, 3364  $\text{cm}^{-1}$ 'de de karakterize pikler görülmüştür (**Şekil 5.16**). Kompleks oluşumu ve fiziksel karışım sonrasında 407, 419, 426  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülen pikler görülmemiştir.  $\alpha$ -TC:RAMEB fiziksel karışımında  $\alpha$ -TC'ye ait karakteristik piklerden 1261  $\text{cm}^{-1}$ 'deki pik görülürken  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinde bu pik kaybolmuş ve ayrıca 1460 ve 2924  $\text{cm}^{-1}$ 'deki piklerde yer değiştirmiştir (**Şekil 5.17**).

$\alpha$ -TC ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin FT-IR spektrumları incelendiğinde, saf etkin maddedeki karakteristik piklerinde kompleks oluşumu ile birlikte değişiklikler

gözlenmiştir. Saf maddenin karakteristik bantlarındaki değişiklikler, kompleksin farklı spektroskopik bantlara sahip yeni bir bileşik olarak varlığını doğrulamaktadır (Ficarra vd., 2002; Demirel vd., 2011).

### 6.3.5. 1H-NMR analizi

İnklüzyon kompleksi oluşurken misafir molekül ve CD'nin kavitesi arasında kalıcı bir bağ kurulmaz. Oluşan etkileşimler Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşimler ve hidrojen bağları gibi kovalent olmayan etkileşimlerdir (Akçakoca ve Atav, 2006). 1H- NMR analizi, oluşan komplekslerin tayini için kullanılan basit ve güvenilir bir yöntemdir. Eğer misafir molekül ve CD arasında bir kompleks kurulmuşsa 1H-NMR spektrumundaki kimyasal kaymalar ( $\delta$ ) değişecektir. CD'lerde konik yapının iç yüzeyinde bulunan H3 ve H5 protonlarındaki kimyasal kayma inklüzyon kompleksi oluşumunu işaret etmektedir (Deng, vd., 2016).

Saf  $\alpha$ -TC, saf HPBCD, saf RAMEB,  $\alpha$ -TC:CD kompleksleri ve fiziksel karışımlarının 1H-NMR analizi spektrumları **Şekil 5.18-5.21**'deki gibidir. Protonlardaki kimyasal kaymalar ( $\Delta\delta$ ) Eşitlik 4.4.'e göre değerlendirilerek **Tablo 5.7-5.10**'daki sonuçlar elde edilmiştir.

Literatürlere göre  $\beta$ -CD ve türevlerinin H3 ve H5 protonlarının karakteristik pikleri 3-4 ppm arasında görülmektedir (Deng vd., 2016; Zao vd., 2016). Elde edilen spektrumlarda HPBCD'nin H3 ve H5 protonlarının karakteristik pikleri sırasıyla 3,6117 ve 3,5748 ppm'de olup literatür ile uyumludur. Kompleksleşme sonrası bu pikler 3,6071 ve 3,5721 ppm'dedir. Kimyasal kaymalar ( $\Delta\delta$ ) H3 protonu için -0,0046 ve H5 protonu için -0,0027'dir.  $\alpha$ -TC- HPBCD fiziksel karışımı sonrasında, karakteristik pikler 3,6080 ve 3,5731 ppm'dedir. Kimyasal kaymalar ise ( $\Delta\delta$ ) H3 protonu için -0,0037 ve H5 protonu için -0,0017'dir.

RAMEB'in 3-4 ppm arasında tek bir karakteristik piki vardır. Elde edilen spektrumda bu pik 3,5567 ppm'dedir. Kompleksleşme sonrasında aynı pik 3,4920 ppm'de, fiziksel karışım sonrasında ise 3,4960 ppm'dedir. Kimyasal kaymaları ( $\Delta\delta$ ) sırasıyla -0,0647 ve -0,0607'dir.

Elde edilen tüm sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, kompleksleşme sonucunda oluşan kimyasal kaymaların, fiziksel karışım sonucunda oluşan kimyasal kaymalardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Kullanılan CD'lerin kompleksleşme sonrası  $\alpha$ -TC

protonlarında ortaya çıkardıkları kayma değerleri kıyaslandığında HPBCD'nin RAMEB'e göre daha fazla kayma değeri oluşturduğu izlenmektedir. Buna karşılık  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleks oluşumu sonrası saf RAMEB protonlarında görülen kimyasal kayma değerleri,  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleks oluşumu sonrası saf HPBCD protonlarında görülen kimyasal kayma değerlerinden çok daha yüksektir. Literatürde de belirtildiği gibi yukarı veya aşağı yönde kimyasal kaymaların olması kompleks oluşumunun bir göstergesidir (Legendre vd., 1995). RAMEB'in proton piklerinde meydana gelen kayma değerlerinin HPBCD'den daha yüksek olması nedeniyle bu komplekste daha kuvvetli etkileşim olduğu düşünülmüştür (Bilensoy, 2007).

### 6.3.6. Enkapsülasyon etkinliği

1:1 molar oranlarda hazırlanan  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB komplekslerindeki  $\alpha$ -TC miktarları HPLC ile tayin edilmiş ve hesaplanan % EE değerleri **Tablo 5.11.**'de verilmiştir. HPBCD'nin % EE (%78,11 $\pm$ 4,61; ort $\pm$ SH), RAMEB'in % EE (%83,83 $\pm$ 0,47; ort $\pm$ SH) ile karşılaştırıldığında RAMEB'in HPBCD'ye göre  $\alpha$ -TC'yi daha fazla enkapsüle ettiği belirlenmiştir.

### 6.3.7. Çözünme hızı çalışmaları

$\alpha$ -TC,  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB komplekslerinin çözünme hızı çalışmaları, diyaliz membran ile pH 7.4, 37°C'deki etanol:fosfat tamponu içerisinde 48 saat boyunca belirli saatlerde örnekler alınarak yapılmıştır. HPLC ile yapılan analiz sonuçlarına göre hesaplanan % kümülatif salınan  $\alpha$ -TC miktarları karşılaştırıldığında, 48 saat sonunda alınan örneklerden % kümülatif salınan  $\alpha$ -TC miktarı, saf  $\alpha$ -TC için %73,17 $\pm$ 18,42 (ort $\pm$ SH),  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksi için %92,52 $\pm$ 25,90 (ort $\pm$ SH),  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksi için %88,94 $\pm$ 7,00 (ort $\pm$ SH) şeklindedir. Tüm örnek alma zamanlarındaki % kümülatif salınan  $\alpha$ -TC miktarları birlikte değerlendirildiğinde her iki komplekste de kompleks oluşumunun  $\alpha$ -TC'nin çözünme hızında artışa neden olduğu görülmektedir (**Tablo 5.12**).

Saf etkin madde ile komplekslerin çözünme profillerinin benzerliği istatistiksel olarak f2 ile değerlendirildiğinde,  $\alpha$ -TC ile  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksine ait f2 değeri 29,71,  $\alpha$ -TC ile  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksine ait f2 değeri 37,09 bulunmuştur. f2 iki

çözünme profili arasında % çözünme benzerliğinin bir ölçüsüdür. İki profil arasında benzerlikten söz edebilmek için  $f_2$  değerinin 50'den büyük olması yeterli görülmektedir (Singireddy ve Subramanian, 2013). Yapılan değerlendirmeye göre, çalışma sonucunda hazırlanan komplekslerin çözünme hızı profillerinin saf  $\alpha$ -TC'nin çözünme profiline benzemediği ( $f_2 < 50$ ) tespit edilerek, her iki CD ile kompleksleşmenin etkin maddenin çözünme davranışında değişime yol açtığı belirlenmiştir.

### 6.3.8. Antioksidan aktivite

Kompleksleşme sonrasında  $\alpha$ -TC'nin antioksidan aktivitesindeki değişimin tespiti için, DPPH testi ile farklı konsantrasyonlarda  $\alpha$ -TC içeren saf  $\alpha$ -TC,  $\alpha$ -TC:HPBCD ve  $\alpha$ -TC:RAMEB örneklerinin 517 nm'deki UV absorpsiyonları ve Eşitlik 4.7 kullanılarak DPPH absorpsiyonundaki azalmaya bağlı olarak % antioksidan aktiviteleri hesaplanmıştır. Sonuçların karşılaştırmalı olarak verildiği **Tablo 5.13** ve **Şekil 5.29** incelendiğinde kompleksleşme sonrası her iki CD'de de tüm konsantrasyonlarda % antioksidan aktivitelerin arttığı gözlenmiştir. Örnek olarak, 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 'de  $\alpha$ -TC'nin antioksidan aktivitesi  $52,05 \pm 0,45$  (ort $\pm$ SH) iken,  $\alpha$ -TC:HPBCD'nin  $72,91 \pm 0,79$  (ort $\pm$ SH),  $\alpha$ -TC:RAMEB'nin  $67,95 \pm 0,4$  (ort $\pm$ SH)'dür. Benzer olarak, 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 'de  $\alpha$ -TC'nin antioksidan aktivitesi  $85,20 \pm 0,38$  (ort $\pm$ SH) iken,  $\alpha$ -TC:HPBCD'nin  $95,23 \pm 0,12$  (ort $\pm$ SH),  $\alpha$ -TC:RAMEB'nin  $93,85 \pm 0,44$  (ort $\pm$ SH)'dür. Çalışılan tüm konsantrasyonlarda komplekslerin % antioksidan aktivite değerleri birbiri ile kıyaslandığında  $\alpha$ -TC:HPBCD'nin antioksidan aktiviteyi  $\alpha$ -TC:RAMEB'den daha fazla arttırdığı görülmüştür. Sonuç olarak kompleks oluşumunun,  $\alpha$ -TC'nin % antioksidan aktivite artışında etkili olduğu ve bu etkinin  $\alpha$ -TC:HPBCD'de daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

### 6.3.9. Kararlılık çalışmaları

$\alpha$ -TC ısıya, ışığa ve oksijene karşı dayanıksızdır (Özer, 2015). Çalışmada  $\alpha$ -TC'nin kararlılığını arttırmak amacıyla  $\alpha$ -TC:CD kompleksleri hazırlanmıştır. Kompleks oluşumunun  $\alpha$ -TC'nin kararlılığına etkisini araştırmak amacıyla  $\alpha$ -TC ve  $\alpha$ -TC:CD komplekslerinin bilinen konsantrasyondaki çözeltileri ile 4 farklı ortamda (2-8°C buzdolabı, 25°C karanlık, 25°C gün ışığı, 40°C etüv) kararlılık çalışmaları yapılmıştır.

Başlangıç, 12. Gün, 20. Gün ve 1. ay sonunda, HPLC analizi ile elde edilen  $\alpha$ -TC konsantrasyonları ve % geri kalan  $\alpha$ -TC miktarları **Tablo 5.14.-5.15.**'deki gibidir. **Tablo 5.14.-5.15.**'e bakıldığında  $\alpha$ -TC'nin literatürle uyumlu olarak 25°C gün ışığında, konsantrasyonu ve % geri kalan miktarı diğer ortamlarda saklanan çözeltilerden daha düşüktür. Diğer ortamlarda saklanan çözeltiler,  $\alpha$ -TC konsantrasyonu ve % geri kalan  $\alpha$ -TC miktarı en yüksek olandan en düşüğe doğru beklendiği üzere, 2-8°C buzdolabı, 25°C karanlık ve 40°C etüv şeklindedir. Başlangıçtan 30. güne kadar bu ortamdaki çözeltilerin konsantrasyonu ve % geri kalan miktarları daima azalmıştır.

$\alpha$ -TC:CD komplekslerinin 25°C gün ışığı ortamına ait sonuçlara bakıldığında % geri kalan  $\alpha$ -TC miktarının saf  $\alpha$ -TC'ye benzer olarak çok düşük değerlerde olduğu görülerek, kompleks oluşumunun saf etkin maddenin 25°C gün ışığındaki kararlılığını arttırmadığı tespit edilmiştir.

Her iki komplekse ait sonuçların tamamında % geri kalan  $\alpha$ -TC miktarları saf  $\alpha$ -TC'ye ait sonuçlardan daha yüksektir. Bu bulgular kompleksleşmenin  $\alpha$ -TC kararlılığı üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Kompleksler birbiri ile karşılaştırıldığında ise  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksine ait % geri kalan  $\alpha$ -TC miktarına ait sonuçların tüm ortamlarda ve tüm zamanlarda  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksine ait sonuçlardan daha yüksek olduğu görülmektedir. Örnek olarak, 2-8°C buzdolabında 30. günde saf  $\alpha$ -TC'nin bozunmadan kalan miktarı %93,46 iken,  $\alpha$ -TC:HPBCD'nin %95,86,  $\alpha$ -TC:RAMEB'nin %100,33'dür. Benzer olarak; 40°C etüvde 30. günde saf  $\alpha$ -TC'nin bozunmadan kalan miktarı %91,10 iken,  $\alpha$ -TC:HPBCD'nin %93,42,  $\alpha$ -TC:RAMEB'nin %96,93'dür; 25°C karanlıkta 30. günde saf  $\alpha$ -TC'nin bozunmadan kalan miktarı %92,60 iken,  $\alpha$ -TC:HPBCD'nin %94,37,  $\alpha$ -TC:RAMEB'nin %97,87'dir. Bu bulgular ışığında,  $\alpha$ -TC'nin 2-8°C buzdolabı, 25°C karanlık ve 40°C etüv ortamlarında kararlılığının korunmasında, RAMEB'in HPBCD'den daha etkili olduğu söylenebilir.

## 7.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın tamamından elde edilen verilere göre aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır:

- HPLC yöntem validasyonunda, ICH kılavuzlarında yer alan analitik validasyon kriterlerinden doğrusalılık, doğruluk, kesinlik, duyarlılık, seçicilik ve kararlılık parametreleri incelendiğinde elde edilen sonuçların uygunluk göstermesi ile yöntemin çalışmada güvenli olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir.
- HPBCD ve RAMEB ile yapılan çözünürlük faz çalışmaları ile  $A_L$  tipi faz diyagramlarına uygunluk gösterdikleri belirlenerek, sitokiyometrik hesaplamalar ile etkin madde ve CD'lerin kompleksleşebilecekleri molar oranlar 1:1 olarak bulunmuştur.
- $\alpha$ -TC:CD kompleksleri liyofilizasyon yöntemi ile katı formda başarı ile hazırlanarak, DSC, SEM, FT-IR,  $^1H$ -NMR karakterizasyon çalışmalarında inklüzyon komplekslerinin oluştuğu gösterilmiştir.
- Komplekslerin enkapsülasyon etkinliğine bakıldığında RAMEB'in HPBCD'ye göre  $\alpha$ -TC'yi daha fazla enkapsüle ettiği belirlenmiştir.
- %1 SLS içeren sulu ortamda  $\alpha$ -TC'nin çözünürlüğünün kompleks oluşumuyla birlikte arttığı ve  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinin sudaki çözünürlüğünün  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinden daha fazla olduğu saptanmıştır.
- CD'ler ile kompleks oluşumunun,  $\alpha$ -TC'nin çözünme hızını arttırdığı ve çözünme profilini değiştirdiği tespit edilmiştir.
- Kompleksleşmenin antioksidan aktiviteyi arttırdığı,  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinin  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinden daha yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.
- CD kompleksleriyle hazırlanan sulu çözeltilerin 1 ay boyunca yapılan kararlılık çalışmalarında, 25 °C gün ışığında kompleks oluşumuyla birlikte kararlılığın artmadığı, -8 °C buzdolabı, 25 °C karanlık, 40 °C etüv saklama koşullarında ise kararlılığın arttığı saptanmıştır.  $\alpha$ -TC:RAMEB kompleksinin bu saklama koşullarında  $\alpha$ -TC:HPBCD kompleksinden daha kararlı olduğu görülmüştür.

Çalışmanın devamında  $\alpha$ -TC'nin kompleks oluşumu ile antibakteriyel aktivitesinin nasıl değiştiği incelenebilir.  $\alpha$ -TC: CD kompleksleri bir kozmetik formülasyon içerisinde

sunulabilir. Hazırlanan kozmetik formülasyonun viskozitesi, homojenitesi, kararlılığı, antioksidan ve antibakteriyel aktivitesi çalışmalar ile tayin edilebilir.

## KAYNAKÇA

1. Akçakoca, P., & Atav, R. (2006). Siklodekstrinlerin İnküzyon Kompleksleri. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 94-99.
2. Aktürk, A. Ş. (2017). Deride Antioksidan Mekanizmalar. *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 2(1), 7-13.
3. Akyürek, E. (2010).  $\beta$  -siklodekstrin İçeren Biyobozunur Hidrojellerin Sentezi ve İlaç Salım Özelliklerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul.
4. Al-Heibshy , F. N., Başaran, E., Arslan, R., Öztürk, N., Erol, K., & Demirel , M. (2020). Physicochemical Characterization and Pharmacokinetic Evaluation of Rosuvastatin Calcium Incorporated Solid Lipid Nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 578, 119106.
5. Al-Salih, D. A., Aziz, F. M., Mshimesh, B. A., & Jehad, M. T. (2013). Antibacterial Effects of Vitamin E: in Vitro Study. *Journal of Biotechnology Research Center*, 7(2), 17-23.
6. Altiner, A., Atalay, H., & Bilal, T. (2017). Bir Antioksidan Olarak E Vitamini. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 6(3), 149-157.
7. Amann, M., & Dressnandt, G. (1993). Solving problems with cyclodextrins in cosmetics. *Cosmetics and Toiletries*, 108(11), 90-95.
8. Arslan, M. (2012, Ocak). Manyetik  $\beta$  -siklodekstrin Nanopartiküllerin Sentezi ve Bazı Kiral Karboksilik Asitlere Karşı Ekstraksiyon Özelliklerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Konya.
9. Avcı, A., & Dönmez, S. (2010). Siklodekstrinler ve Gıda Endüstrisinde Kullanımı. *Gıda*, 35(4), 305-312.
10. Aytaç, Z., & Uyar, T. (2016). Antioxidant Activity and Photostability of  $\alpha$ -tocopherol/ $\beta$ -cyclodextrin Inclusion Complex Encapsulated Electrospun Polycaprolactone Nanofibers. *European Polymer Journal*, 79, 140-149.
11. Başyigit, Z., Kut, D., Yenilmez, E., Eyüpoğlu, Ş., Hocaoglu , E., & Yazan , Y. (2018). Kozmetik Tekstiller Olarak Vitamin E Aktarılmış Kumaşların Formülasyon ve Karakterizasyonu. *Tekstil ve Konfeksiyon*, 28(2), 162-169.
12. Baumann, L. S., & Spencer, J. (1999). The Effects of Topical Vitamin E on the Cosmetic Appearance of Scars. *Dermatologic Surgery* (25), 311-315.

13. Bilensoy, E., Doğan, L., Şen, M., & Hıncal, A. (2007). Complexation Behaviour of Antiestrogen Drug Tamoxifen Citrate with Natural and Modified B-Cyclodextrins. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 651-655.
14. Bilensoy, E., Gürkaynak, O., Doğan, L., & Hıncal, A. (2008, Ocak). Safety and efficacy of amphiphilic  $\beta$ -cyclodextrin nanoparticles for paclitaxel delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 347(1-2), 163-167.
15. Buschmann, H. J., & Schollmeyer, E. (2002). Applications of cyclodextrins in cosmetic products: A review. *Journal of Cosmetic Science*, 53, 185-191.
16. Büyüksırt, T., & Kuleasan, H. (2014). Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi ve Gıda Analizlerinde Kullanımı. *Gıda*, 39(4), 235-241.
17. Carmona-Jiménez, Y., García-Moreno, M., Igartuburu, J., & Barroso, C. G. (2014). Simplification of The DPPH Assay For Estimating The Antioxidant Activity of Wine and Wine By-Products. *Food Chemistry*, 165, 198-204.
18. Centini, M., Maggiore, M., Casolaro, M., Andreassi, M., Facino, R. M., & Anselmi, C. (2007). Cyclodextrins as cosmetic delivery systems. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 109–112.
19. Corciova, A., Ciobanu, C., Poiata, A., Mircea, C., Nicolescu, A., Drobeta, M., Varganici, C.D., Pinteala, T., Marangoci, N. (2015). Antibacterial and Antioxidant Properties of Hesperidin: B-Cyclodextrin Complexes Obtained by Different Techniques. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 81, 71–84.
20. Craft, N. (2016). Tocopherols: Properties and Determination. B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Told (Ed.), *Encyclopedia of Food and Health* içinde (309-318).
21. Çayırılı, M., & Açıkgöz, G. (2013). Vitamin E ve Deri. *Türk Dermatoloji Dergisi* (6), 87-90.
22. Çetin, H. (2014). Karanfil Uçucu Yağının Siklodekstrinler İle Enkapsülasyonu. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara.
23. Darwish, M. K., Fouad, M. M., Zaazaa, H. E., Abdel-Razeq, S. A., & Nasr, Z. A. (2014). Optimization and Simultaneous Determination of Atorvastatin Calcium and Losartan Potassium in Pure and Bilayer Tablets. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 1756 –1768.

24. Das, S., Suresh, P. K., & Desmukh, R. (2009). Design of Eudragit RL 100 Nanoparticles by Nanoprecipitation Method For Ocular Drug Delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(2), 318-323.
25. Del Valle, M. (2004). Cyclodextrins and Their Uses: A Review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.
26. Demirel, M., Büyükköroğlu, G., Kalava, B. S., & Yazan, Y. (2006). Enhancement in Dissolution Pattern of Piribedil by Molecular Encapsulation with  $\beta$ -Cyclodextrin. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 28(2), 83-88.
27. Demirel, M., Yurtdaş, G., & Genç, L. (2011). Inclusion Complexes of Ketoconazole with Beta-Cyclodextrin, Physicochemical Characterization and In Vitro Dissolution Behaviour of Its Vaginal Suppositories. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 70, 437-445.
28. Deng, Y., Pang, Y., Guo, Y., Ren, Y., Wang, F., Liao, X., & Yang, B. (2016). Host-guest inclusion systems of daidzein with 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin (HP- $\beta$ -CD) and sulfobutyl ether- $\beta$ -cyclodextrin (SBE- $\beta$ -CD): Preparation, binding behaviors and water solubility. *Journal of Molecular Structure*, 1118, 307-315.
29. Desai, K., & Park, H. J. (2005). Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. *Drying Technology: An International Journal*, 23(7), 1361-1394.
30. Duchene, D., Wouessidjewe, D., & Poelman, M. (1999). Cyclodextrin in Cosmetics, In: Novel Cosmetic Delivery System. S. Magdassi, & E. Touitou,(Ed.). Marcel Dekker Inc., New York (275-278)
31. Eser, B., & Dinçel, A. S. (2018). Kromatografiye Giriş, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57.
32. Ficarra , R., Tommasini , S., Raneri , D., Calabro , M. L., Di Bella, M. R., Rustichelli, C., Gamberini, M.C., Ficarra, P. (2002). Study of Flavonoids/Beta Cyclodextrins Inclusion Complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray Investigation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 1005–1014.
33. Fiume, Z. (2002). Final Report on the Safety Assessment of TC and Tocopheryl Acetate, Tocopheryl Linoleate, Tocopheryl Linoleate/Oleate, Tocopheryl

- Nicotinate, Tocopheryl Succinate, Dioleoyl Tocopheryl Methylsilanol, Potassium Ascorbyl, Tocopheryl Phosphate, Tocophersolan. *International Journal of Toxicology*, 21(3), 51-116.
34. Folch, C., Guerrero, J., Speisky, H. C., Jullian, C., & Olea-Azar, C. (2014). NMR and Molecular Fluorescence Spectroscopic Study of The Structure and Thermodynamic Parameters of EGCG/ $\beta$ -Cyclodextrin Inclusion Complexes With Potential Antioxidant Activity. *Journal of Inclusion Phenomena*, 78(1-4 ), 287-298.
  35. Gianeti, M. D., Gaspar , L. R., de Camargo Júnior , F. B., & Campos, P. M. (2012). Benefits of Combinations of Vitamin A, C and E Derivatives in the Stability of Cosmetic Formulations. *Molecules* (17), 2219–2230.
  36. Gökmen, S., Palamutoğlu, R., & Sarıçoban, C. (2012). Gıda Endüstrisinde Enkapsülasyon Uygulamaları. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 7(1), 36-50.
  37. Gönülşen, İ. (2013). Portakal Yağı İçeren Mikro ve Moleküler Kapsüllerin Salım Davranışı. *Yüksek Lisans Tezi*. İzmir.
  38. Gupta, H., Aqil, M., Khar, R. K., Ali, A., Bhatnagar, A., & Mittal, G. (2010). Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. *Nanomedicine*, 6(2), 324-333.
  39. Gupta, S. K., Ramya, M. G., Akki, R., Kathirvel, S., & Naik, V. V. (2013). Development and Validation Of New RP-HPLC Methods For Stability Study Of Fat Soluble Vitamins. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 921-925.
  40. Güleç, K., & Demirel, M. (2016). Characterization and Antioxidant Activity of Quercetin/Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin Complexes. *Current Drug Delivery*, 13(3), 444-451.
  41. Hashidzume, A., Takashima, Y., Yamaguchi, H., & Hara, A. (2017). Cyclodextrin. *Comprehensive Supramolecular Chemistry II*, 1, 269-316.
  42. Hazekamp, A., & Verpoorte, R. (2006). Structure elucidation of the tetrahydrocannabinol complex with randomly methylated B-cyclodextrin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29, 340-347.
  43. Ibrahim, S., & Bowra, S. (2019). Improving Oxidative Stability of Polyphenolic Fraction of Apple Pomace by Encapsulation Using Naturally Occurring Polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 9, 83-108.

44. ICH Q2A-R2. (2005). *International Conference On Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text And Methodology.*
45. ICH Q2B. (1996). *International Conference On Harmonisation of Technical Requirements For Registration of Pharmaceuticals For Human Use, ICH Harmonised Tripartite Guideline: Guidance for industry, validation of analytical procedures, methodology.*
46. Kılıç Şen, T. (2000). Retinoik asitin topikal preparatlarının optimizasyonu ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi. *Doktora Tezi.*
47. Kılıç, G. B., & Karahan, A. G. (2010). Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması. *Gıda*, 35(6), 445-452.
48. Kırımlıoğlu, G. Y., & Demirel, M. (2011). Inclusion Complexes of Fluconazole with B-Cyclodextrin, Physicochemical Characterization and In Vitro Evaluation of Its Formulation. *Journal of Inclusion Phenomena*, 70(3), 429-435.
49. Konger, R. (2006). A New Wrinkle on Topical Vitamin E and Photo-inflammation: Mechanistic Studies of a Hydrophilic  $\gamma$ -Tocopherol Derivative Compared with  $\alpha$ -Tocopherol. *Journal of Investigative Dermatology*, 126, 1447–1449.
50. Kurkov, S., & Loftsson, T. (2013). Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* (453), 167-180.
51. Lautenschläger, H. (2011). Vitamine in der Kosmetik. *Veröffentlicht in Medical Beauty Forum*, 14-18
52. Legendre, J., Rault, I., Petit, A., Luijten, W., Demuyne, I., Horvath, S., Ginot, Y.M., Cuine, A. (1995). Effects of  $\beta$ -cyclodextrins on skin: implications for the transdermal delivery of piribedil and a novel cognition enhancing-drug, S-9977. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3, 311-322.
53. Leroy-Lechat, F., Wouessidjewel, D., Herrenknechtz, C., & Duchene, D. (1992). Preparation and Stability of Iodine/  $\alpha$ - CD Inclusion Complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18(17), 1853-1863.

54. Li , B., Koneckea, S., Harichb, K., Wegielc, L., Taylorc, L., & Edgara, K. J. (2013). Solid dispersion of quercetin in cellulose derivative matrices influences both solubility and stability. *Carbohydrate Polymers*, 92, 2033–2040.
55. Loftsson, T., & Brewster, M. E. (2010). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins: Basic Science and Product Development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 62(11), 1607-1621.
56. Loftsson, T., Jarho, P., Másson, M., & Järvinen, T. (2005). Cyclodextrins in drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2, 335-351.
57. Martin, J., Montana, E. J., & Asuero, A. (2018). Cyclodextrins: Past and Present (2018), P. Arora (Ed.) *Cyclodextrin A Versatile Ingredients* içinde (3-43).
58. Menezes, P. P., Serafini, M. R., Santana, B. V., Nunes, R. S., Quintans Jr, L. J., Silva, G. F., Medeiros, I. A., Marchioroa, M., Fraga, B. F., Santos M., Araújo, A. A. (2012). Solid-State Beta Cyclodextrin Complexes Containing Geraniol. *Thermochimica Acta*, 548, 45–50.
59. Mevlitoğlu, İ., Engin, B., & Kaplan, M. (2009). Yaşlanmayı Geciktiren Ürünler Ne Kadar Etkili? *Türkderm-Deri Hastalıkları ve Frengi Arşivi Dergisi* (43), 2-6.
60. Nicolescu, C., Arama, C., & Monciu, C. M. (2010). Preparation and Characterization of Inclusion Complexes Between Repaglinide and B-Cyclodextrin, HPBCD and RAMEB. *Farmacia*, 58(1), 78-88.
61. Numanoğlu, U. (2003). Siklodekstrinlerin Kozmetik Kullanımları Üzerine Çalışmalar. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara.
62. Numanoğlu, U., Kılıç Şen, T., Tarımcı, N., Kartal, M., Koo , O., & Önyüksel, H. (2007). Use of cyclodextrins as a cosmetic delivery system for fragrance materials: Linalool and Benzyl acetate. *US National Library of Medicine National Institutes of Health*, 34-42
63. Ongar, S. U. (2019). Moksifloksasin ve Siklodekstrin Komplekslerini İçeren Oftalmik İn Situ Jel Formülasyonlarının Hazırlanması ve İn Vitro Değerlendirilmesi. *Yüksek Lisans Tezi*. Eskişehir.
64. Özer, Ö. (2015). *Kozmetoloji*. İzmir: Ege Üniversitesi Basımevi.
65. Pessine, F., Calderini, A., & Alexandrino, G. (2012). Review: Cyclodextrin Inclusion Complexes Probed by NMR Techniques. D.H. Kim (Ed.). *Magnetic Resonance Spectroscopy* içinde (237-364). Brezilya.

66. Rajewski, R., & Stella, V. (1996). Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. 2. In Vivo Drug Delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(11), 1142-1169.
67. Scalia, S., Renda, A., Ruberto, G., Bonina, F., & Menegatti, E. (1995). Assay of vitamin A palmitate and vitamin E acetate in cosmetic creams and lotions by supercritical fluid extraction and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13(3), 273-277.
68. Scalia, S. (1999). Inclusion complexation of the sunscreen agent 2-ethylhexylpdimetilamino benzoate with hydroxypropyl-beta-cyclodextrin: effect on photostability. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 51(12), 1367-1374.
69. Shabir, G. (2003). Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. understanding the differences and similarities between validation requirements of the us food and drug administration. *Journal of Chromatography A*, 987(1-2), 57-66.
70. Shah, V. P., Tsong, Y., Sathe, P., & Liu, J.-P. (1998). In Vitro Dissolution Profile Comparison—Statistics and Analysis of the Similarity Factor, f<sub>2</sub>. *Pharmaceutical Research*, 15(6), 889-896.
71. Silva, S. D., Rosa, N. F., Boas, L. V., Bronze, M. R., & Ferreira, A. E. (2009). Rapid Determination of Alpha-Tocopherol in Vegetable Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Food Analytical Methods*, 2, 120-127.
72. Singireddy, A., & Subramanian, S. (2016). Cyclodextrin Nanosponges to Enhance The Dissolution Profile of Quercetin by Inclusion Complex Formation. *Particulate Science and Technology*, 34, 341-346.
73. Sobrinho, J., Soares, M. F., Labandeira, J., Alves, L., & Neto, P. (2011). Improving The Solubility of The Antichagasic Drug Benznidazole Through Formation of Inclusion Complexes with Cyclodextrins. *Química Nova*, 34(9), 1534-1538.
74. Submaraniam, P., Mohamad, S., & Alias, Y. (2010). Synthesis and Characterization of The Inclusion Complex of Dicationic Ionic Liquid and  $\beta$  Cycloodextrin. *International Journal of Molecular Sciences*, 3675-3685.
75. Szejtli, J. (2004). Past, present, and future of cyclodextrin. *Pure and Applied Chemistry*, 76(10), 1825-1845.

76. Tanaka, M., Matsuda, H., Sumiyoshi, H., Arima, H., Hirayama, F., Uekama, K., & Tsuchiya, S. (1996). 2-Hydroxypropylated Cyclodextrins As A Sustained-Release Carrier For Fragrance Materials. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 44(2), 416-420.
77. Tanaydin, V., Conings, J., Malyar, M., van der Hulst, R., & van der Lei, B. (tarih yok). The Role of Topical Vitamin E in Scar Management: A Systematic Review. *Aesthetic Surgery Journal*, 36(8), 959-965.
78. Taneri, F. (2004). Bazı Antimikrobiyal Maddelerin Siklodekstrin Komplekslerinin Hazırlanması ve Bunların Farmasötik Formülasyonlarda Kullanımı. *Doktora Tezi*. İzmir.
79. Tarımcı, N. (2005). Modern Kozmetik Taşıyıcı Sistemler. Y. Yazan (Ed.). *Kozmetik Bilimi içinde* (269-274). İstanbul.
80. Thiele, J. J., Hiesh, S. N., & Mudiyansele, S. E. (2005). Vitamin E: Critical Review of Its Current Use in Cosmetic and Clinical Dermatology. *Dermatologic Surgery* (31), 805-813.
81. Tomono, K., Goto, H., Suzuki, T., Ueda, H., Nagai, T., & Watanabe, J. (2002). Interaction of Iodine with 2-Hydroxypropyl- $\alpha$ -cyclodextrin and Its Bactericidal Activity. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 28(10), 1303-1309.
82. Türsen, Ü. (2006). Deri Yaşlanmasının Topikal Ajanlarla Önlenmesi. *Dermatose* (4).
83. Wu, T.-H., Yen, F.-L., Lin, L.-T., Tsai, T.-R., Lin, C.-C., & Cham, T.-M. (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 346(1-2), 160-168.
84. Yapar, E., & Tanrıverdi, S. T. (2016). Yaşlanma karşıtı kozmetik yaklaşımlar ve ürün bileşenleri. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(2), 99-109.
85. Yavuz, B. (2009). Siklodekstrinlerin Kompleksi Oluşturarak Ekzemestanın Çözünmesinin ve İn Vitro Geçirgenliğinin Arttırılması. *Yüksek Lisans Tezi*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
86. Ying, L. Q., & Misran, M. (2017). Rheological and physicochemical characterization of alpha-tocopherol loaded lipid nanoparticles in thermoresponsive gel for topical application. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences*, 13(3), 248-252.

87. Yuan, C., Liu, B., & Liu, H. (2015). Characterization of hydroxypropyl-B-cyclodextrins with different substitution patterns via FTIR, GC-MS, and TG-DTA. *Carbohydrate Polymers*, 118, 36-40.
88. Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Journal*, 12(3), 263-271.
89. Zhao , R., Sandström , C., Zhang , H., & Tan, T. (2016). NMR Study on the Inclusion Complexes of B-Cyclodextrin with Isoflavones. *Molecules*, 21(372).
90. Zheng, Y., Haworth, I. S., Zuo, Z., Chow, M. S., & Chow, A. H. (2005). Physicochemical and structural characterization of quercetin-beta-cyclodextrin complexes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(5), 1079-89.
91. <http-1:https://merlab.metu.edu.tr/tr/diferansiyel-taramali-kalorimetre-dsc> (Eriřim tarihi: 18.04.2020)
92. <http-2:http://nukbilimler.ankara.edu.tr/elektron-mikroskobu/> (Eriřim tarihi: 18.04.2020)
93. [http-3: https://www.taek.gov.tr/tr/](http-3:https://www.taek.gov.tr/tr/) (Eriřim tarihi: 18.04.2020)