مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (35) العدد (1) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (35) No. (1) 2013

مساهمة في تحسين ثباتية فيتامين C في المستحضرات الجلدية

الدكتورة لمى الهوشي*
نتلي موسى**

(تاريخ الإيداع 28 / 11 / 2012. قُبِل للنشر في 5 / 3 /2013)

□ ملخّص □

يهدف هذا البحث إلى دراسة الثباتية الكيميائية للفيتامين C أو الـ **A**scorbic **A**cid (AA) في مستحضراته الجلدية (محلول مائي، كريمات م/ز، كريمات ز/م) بتركيز 2%. تمت الدراسة بشروط مسرعة حيث خزنت المستحضرات بدرجتي حرارة 37° و45°م لمدة 28 يوماً، وحللت العينات أسبوعياً بهدف تحديد تركيز AA غير المتخرب وذلك بوساطة مقياس الطيف الضوئي (Spectrophotometer). تم حساب العمر على الرف لكل صيغة وفق طريقة الـ Q_{10} وقُيِّمت النتائج إحصائياً بوساطة اختبار t-student.

دُرس تأثير كل من نسبة الطور المائي ومكونات الطورين المائي والزيتي على ثباتية الـ AA فتبين أن خفض نسبة الماء ضمن الصيغة وإضافة مواد معينة (أملاح معدنية، سوربيتول، إيتانول) إلى الطور المائي يحسن من ثباتية الـ AA. كما تبين أن اتباع تقنية الـ (solubilisation) يطيل العمر على الرف للـ AA في كريم ز/م. تحسَّنت ثباتية الـ AA في كريم م/ز عند استبدال الفازلين باللانولين وعند استبدال أبيض البال بشمع النحل. لم تتأثر ثباتية الـ AA عند كل من: استبدال زيت الزيتون بزيت البارافين، استبدال أبيض البال بالغول السيتيلي واستبدال شمع النحل بالغول السيتيلي وعند التبديل بنسب كل من أبيض البال وشمع النحل. بعد تحليل العوامل المدروسة والمؤثرة في ثباتية الـ AA حضِّرت صيغة محسنة (كريم م/ز) ضمن شروط تزيد الثباتية فنتجت لدينا الصيغة ذات العمر على الرف الأطول للـ AA حيث وصل إلى 208 أيام تقريباً.

الكلمات المفتاحية: حمض الأسكوربيك، الثباتية المسرعة، العمر على الرف، طريقة الـ Q_{10}.

* مدرسة- قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.
** طالبة دراسات عليا (ماجستير)- قسم الصيدلانيات والتكنولوجيا الصيدلية- كلية الصيدلة- جامعة تشرين- اللاذقية- سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (35) العدد (1) 2013
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (35) No. (1) 2013

Contribution to improve the stability of vitamin C in dermal preparations

Dr. Lama Al haushey*
Nathalie Moussa**

(Received 28 / 11 / 2012. Accepted 5 / 3 / 2013)

□ ABSTRACT □

The aim of this study was to determine the chemical stability of **A**scorbic **A**cid (AA) (2%) in its dermal preparations (aqueous solution, w\o and o\w creams).

Stability studies were performed at different accelerated conditions, i.e. 37˚C, 45˚C for 28 days and the samples were analyzed every week to predict the shelf life of AA in each formulation by the Q_{10} method. The stability data were analyzed statistically using t-student test. The effect of aqueous phase ratio and aqueous and oily phases compositions on the stability of AA were studied. We found that the stability of AA was improved by: reduction of water percentage in the formulation, addition of certain components to the aqueous phase (i.e. mineral salts, sorbitol, ethanol…) and presence of vaseline and spermaceti compared with lanolin and beeswax respectively. We also found that the solubilisation of AA in the oily phase prolonged the shelf life of AA in o\w creams. We analyzed all factors affecting the stability of AA and an o\w emulsion was formulated under some factors that improved the stability. The shelf life of AA in this optimized formulation reached 208 days.

Keywords : Ascorbic acid, Accelerated stability, Shelf life, Q_{10} Method.

*Assistant Professor, Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.
**Postgraduate Student, Pharmaceutics and Pharmaceutical Technology Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria.

مقدمة

زاد اهتمام الكثير من الناس بحماية بشرتهم من الشيخوخة المسببة بالضوء Photoaging وإبقائها بحالة نضرة وصحية. من بين المواد الفعالة التي تؤثر على نضارة وسلامة الجلد وتحميه من التجاعيد نجد الـ **A**scorbic **A**cid (AA) أو فيتامين C. كثر الاهتمام كذلك بالمستحضرات الجلدية الحاوية على AA كونه يعمل موضعياً بوصفه مضاد أكسدة يزيل الجذور الحرة free radicals بوصفه عاملاً مساعداً في اصطناع الكولاجين مما يزيد من مرونة الجلد [1,2,3,4,5,6,7,8].

يتأكسد حمض الأسكوربيك بسرعة إلى حمض دي هيدرو أسكوربيك عديم الفعالية Dehydroascorbic acid وهذا ما يجعل المستحضرات الجلدية الحاوية AA ضعيفة الثباتية حيث تكفي بضعة أيام فقط ليتخرب محلول AA (5%) ويتحول إلى الشكل المؤكسد بشكل كامل [9].

تتركز جهود الأبحاث حول تطوير مستحضرات جلدية موضعية تحوي AA تحقق ثباتية جيدة له بحيث يمكن استخدامها بفعالية وأمان مما يحتم إجراء دراسات ثباتية كيميائية وفيزيائية لضمان انتقاء الصيغة الأكثر ثباتاً وفعالية [10]. لإجراء هذه الدراسات تُعرَّض الصيغ المحضرة لشروط قاسية مثل الحرارة العالية [5]، وتتم مراقبة التخرب الكيميائي مع الزمن لتوقع العمر على الرف للمنتج بالنسبة لمكون معين كما تتم دراسة الحركية الكيميائية لهذا المكون [10].

في هذا البحث ستتم دراسة الثباتية الكيميائية لـ 21 مستحضراً جلدياً حاوياً على AA (محلول مائي، كريم ز/م، كريم م/ز) تم تعبئتها بعبوات محكمة الإغلاق وتخزينها بدرجتي حرارة 37° و45°م في محمّات مغلقة [11] لمدة شهر كامل [12,13] وذلك بإجراء تحليل كيميائي للـ AA (قياس كمي) بشكل دوري كل 7 أيام باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer [14,15].

سيتم تحديد حركية تخرب الـ AA في مختلف الصيغ ثم حساب العمر على الرف للـ AA في كل صيغة وفق طريقة الـ (Q_{10}). إن العمر على الرف للمنتج هو الفترة الزمنية التي يبقى فيها 90% من التركيز الأولي للدواء ثابتاً [16,17]. إن الـ (Q_{10}) هو النسبة بين ثابتتي سرعة تفاعل مختلفتين عندما ترتفع درجة الحرارة 10°م [18]، وطريقة الـ (Q_{10}) هي طريقة تقريبية لتوقع العمر على الرف للدواء وتحتاج إلى بعض البيانات الخاصة بالثباتية وذلك بتسريع تخرب الدواء باستخدام درجتي حرارة على الأقل. إن طريقة الـ (Q_{10}) مستقلة عن رتبة التفاعل [10,12]، وترتكز على حساب العمر على الرف للدواء عند درجة حرارة معينة وعلى حساب كل من طاقة التنشيط (Ea) وQ_{10} من أجل حساب العمر على الرف عند درجة الحرارة المطلوبة [12].

بحصولنا على المعلومات المختلفة سنقوم بدراسة تأثير العوامل المختلفة – سواء كانت من مكونات الطور المائي للمستحلب أم من مكونات الطور الزيتي – رياضياً على ثباتية الـ AA في مستحضراته الجلدية.

في نهاية البحث سنقوم بتحليل تأثير العوامل المؤثرة على ثباتية AA وتحضير صيغة محسنة (الصيغة 22) يكون الهدف منها تحقيق أفضل ثباتية لـ AA وذلك بحذف المكونات المنقصة للثباتية وترك بعض العوامل التي تحقق ثباتية أفضل.

أهمية البحث وأهدافه :

إن فيتامين (C) مادة دوائية هامة واسعة التطبيق موضعياً على الجلد وتوجد أشكال صيدلانية عديدة للفيتامين C فهو فعال بوصفه مضاد أكسدة وكمحفز لاصطناع الكولاجين (يفيد في تقليل التجاعيد) بوصفه مثبطاً لأنزيم

التيروزيناز (يفيد في تقليل التصبغات). إن فيتامين C سريع التخرب ضمن مستحضراته الجلدية مما يفقدها فعاليتها على الرغم من غلاء ثمنها ومن ثمَّ فإن زيادة ثباتية الفيتامين C ضمن مستحضراته الجلدية يعتبر تحدياً كبيراً. إن زيادة هذه الثباتية تضمن وصول فيتامين C بشكله الفعال إلى مكان تطبيقه للحصول على الفوائد المرجوة منه.

تكمن أهمية هذا البحث (المجرى في كلية الصيدلة– جامعة تشرين) في تحضير مستحضر جلدي من فيتامين C بصياغة جيدة تضمن ثباتيته بنسبة تحقق الغرض المرجو من استخدام المستحضر ولفترة تضمن المحافظة على فعالية الفيتامين C طيلة فترة الاستخدام حيث إن فيتامين C واسع الاستخدام كما أن مستحضراته الموجودة بالسوق باهظة الثمن ولاتحقق الثباتية والفعالية المطلوبتين.

يهدف هذا البحث إلى تحضير عدة صيغ لمستحضرات جلدية للـ AA (محلول مائي، كريمات ز/م، كريمات م/ز) ودراسة تأثير بعض العوامل كنسبة الطور المائي ومكوناته ومكونات الطور الزيتي ونسبتها على ثباتية الـ AA لنصل في النهاية إلى صيغة محسنة تضمن ثباتية الـ AA في مستحضره مما يزيد من فعاليته.

المواد والأجهزة المستخدمة في البحث :

المواد :

- أسكوربيك أسيد extra pure (Loba chemie,India)
- ماء مقطر، كلور الكالسيوم $CaCl_2$، كلور المغنزيوم $MgCl_2$، سوربيتول، إيتانول 95%، فازلين، لانولين، أبيض البال، شمع النحل، زيت بارافين، غول سيتيلي، بروبلين غليكول، سبان60، سبان80، توين80، بوراكس، زيت الزيتون، ماءات الكالسيوم، حمض الزيت وهذه المواد كلها من درجة النقاوة المخبرية.

الأجهزة

- مقياس الـ Spectrophotometer (PG instruments,T60U spectrometer, England)؛
- مازج ميكانيكي (Heidolph,RZR 2021,Germany)؛
- مثفلة (Kendro, Lobofuge 200,USA)؛
- حمام مائي (Memmert, K.F.T LAB. EQUIPMENT,Germany)؛
- محم (Memmert, Carbolite 533 6RB, Germany)؛
- ميزان حساس (Precisa, XB 220A, Switzerland)؛
- جهاز الـ pH meter (HANNA, PH 211 microprocessor PH meter, USA).

الطرائق :

تحضير الأشكال الصيدلانية :

تم تحضير محلول مائي حاوٍ على الـ AA فقط (2%، w\v) ومحلول مائي حاوٍ على الـ AA (2%، w\v) وعلى مواد إضافية (سوربيتول، إيتانول، $CaCl_2$، $MgCl_2$) وذلك بحل المواد المختلفة في الماء المقطر.

الجدول (1): كريمات م/ ز الحاوية على AA والمحضرة وفق صيغ مختلفة

المكونات/ (غ) / رقم الصيغة	أسكوربيك أسيد	سوربيتول	كلور كالسيوم	كلور مغنزيوم	إيثانول 95%	سبان 80	فازلين	لانولين	شمع النحل	أبيض البال	غول سيتيلي	زيت البارافين	زيت الزيتون	بوراكس	ماءات الكالسيوم/ حمض الزيت	ماء	نسبة الطور المائي %
3	2	–	–	–	–	6	40	–	4	–	–	15	–	–	–	33	35
4	2	1.125	0.175	0.7	1	6	40	–	4	–	–	15	–	–	–	30	35
5	2	1.5	0.1	0.4	1	6	40	–	4	–	15	15	–	–	–	15	20
6	2	1.975	0.125	0.5	5	–	–	6	–	14	–	55	–	0.4	–	15	25
7	2	1.975	0.125	0.5	5	–	6	–	–	14	–	55	–	0.4	–	15	25
8	2	1.25	0.15	0.6	6	–	–	–	6	14	–	50	–	0.4	–	20	30
9	2	1.25	0.15	0.6	6	–	–	–	14	6	–	50	–	0.4	–	20	30
10	2	1.125	0.175	0.7	1	1	–	3	–	10	–	50	–	0.4	–	30	35
11	2	1.125	0.175	0.7	1	1	–	3	10	–	–	50	–	0.4	–	30	35
12	2	3.9	0.195	0.78	5	–	–	8	–	–	–	20	32	–	/0.045 0.5	27.5	40
13	2	3.9	0.195	0.78	5	–	–	8	–	–	–	32	20	–	/0.045 0.5	27.5	40
14	2	1.125	0.175	0.7	1	1	3	–	–	10	–	50	–	0.4	–	30	35
15	2	1.25	0.15	0.6	6	–	–	–	8.5	16.5	–	50	–	0.4	–	15	25
16	2	1.975	0.125	0.5	5	–	8.5	–	–	16.5	–	55	–	0.4	–	20	30
17	2	1.5	0.1	0.4	1	6	40	–	4	15	–	15	–	–	–	15	20
18	2	1.5	0.1	0.4	1	6	43	–	16	–	–	15	–	–	–	15	20

حُضِّرت كريمات ز/م أو م/ز وذلك بصهر مكونات الطور الزيتي حسب تتالي درجات الانصهار حتى الدرجة 75°م وتسخين الطور المائي إلى الدرجة 75°م ومن ثم إضافة الطور الداخلي إلى الخارجي مع التحريك واستمرار التحريك حتى يبرد المستحضر إلى درجة حرارة الغرفة.

يبين الجدولان (1 و2) صيغ كريمات م/ز وكريمات ز/م على الترتيب حيث تختلف هذه الصيغ عن بعضها إما بنسبة الطور المائي ضمن الكريم أو بمكونات الطورين المائي والزيتي.

الجدول (2): كريمات ز/م المحضرة وفق صياغات مختلفة

المكونات /(غ) رقم الصيغة	أسكوربيك أسيد	سوربيتول	كلور الكالسيوم	كلور المغنزيوم	إيثانول 95%	سبان 60	توين 60	بروبلين غليكول	فازلين	غول سيتيلي	ماء
19	2	1	0.25	1	2	–	5	12	25	25	26.75
20	2	1	0.25	1	2	5	5	12	22	23	26.75
21	2	5	1	1.5	10	5	5	12	22	23	13.5

بروتوكول دراسة الثباتية :

كيفية تخزين العينات :

تم تحضير 21 صيغة مختلفة تحوي 2% أسكوربيك أسيد والأشكال الصيدلانية المحضرة هي: محلول مائي، كريم م/ز، كريم ز/م (الجدولان 1 و2). حضِّرت 3 طبخات من كل صيغة للتأكد من تكرارية النتائج.

بعد التحضير: خُزِّنت الصيغ المحضرة في عبوات زجاجية سعة 250 مل نظيفة، محكمة الإغلاق ومقاومة للحرارة بحيث قسمنا كل طبخة إلى قسمين: قسم خُزِّن في درجة حرارة 37°م والآخر عند 45°م لمدة 28 يوما ً. تمت تغطية كل العبوات بورق ألمنيوم لحمايتها من تأثير الضوء. أُجري سحب عينات بشكل دوري (كل أسبوع) من هذه العبوات بهدف قياس AA كمياً بوساطة مقياس الـ Spectrophotometer.

معالجة العينات لتحديد تركيز AA :

لقياس كمية الأسكوربيك أسيد الفعالة والمتبقية في كل صيغة من الجدولين (1 و2) أُخذ مقدار 5غ من كل كريم ضمن أنبوب اختبار، أضيف 5 مل ماء مقطر ثم ثفل بالمثفلة بسرعة 5300 دورة/ دقيقة لمدة 20 دقيقة.

بعد التثفيل أخذ 2 مل من الطبقة المائية الموجودة في أسفل أنبوب الاختبار والتي تحوي الأسكوربيك أسيد ومددت بالماء المقطر. قيست امتصاصيات الأسكوربيك أسيد باستخدام مقياس الـ Spectrophotometer عند طول موجة 265 نانومتر وحصلنا على التراكيز الموافقة بتطبيق المعادلة:

$$Y = 0.320X - 0.018 \qquad (1)$$

الدراسة الرياضية للثباتية :

بعد الحصول كل أسبوع على تركيز الأسكوربيك أسيد في كل صيغة من الصيغ خلال 28 يوماً، قمنا بدراسة حركية تخرب الـ AA ضمن كل صيغة عند درجتي حرارة التخزين 37° و45°م بهدف التأكد من رتبة تخرب الأسكوربيك أسيد في كل صيغة حيث تم رسم الخطوط البيانية وفق الرتبتين (0،1). تم الاكتفاء بهاتين الرتبتين وذلك لأنه من المعروف أن معظم تفاعلات التخرب الصيدلانية تتبع هاتين الرتبتين وأن AA يتخرب في مستحضراته الصيدلانية والغذائية بحركية من الرتبة الأولى أو الأولى الكاذبة [13,19].

اعتمدت طريقة الـ Q_{10} لحساب العمر على الرف لـ AA في كل صيغة وهذا يقتضي تحديد رتبة تخرب الـ AA عند درجة حرارة واحدة على الأقل (وهي الدرجة 37°م في بحثنا) وذلك لحساب العمر على الرف للصيغة عند درجة الحرارة هذه ويكفي معرفة ثابتة سرعة التفاعل عند درجة حرارة أخرى (45°م) ثم الاستفادة من ثابتتي سرعة التفاعل عند درجتي الحرارة المذكورتين لحساب طاقة التنشيط Ea (وفق علاقة أرينيوس) ومنها حساب الـ Q_{10}. أخيراً يتم حساب

العمر على الرف لـ AA في كل صيغة عند درجة حرارة الغرفة بالاستفادة من عمره التخزيني عند الدرجة 37°م ومن الـ Q_{10} المحسوبين سابقاً.

طريقة الـ Q_{10} [12,20] :

تم حساب العمر على الرف للـ AA في كل صيغة (عند الدرجة 37°م مثلاً) باستخدام العلاقة:

$$\text{Shelf life} = t_{90(T1)} = 0.105/\ k \qquad (2)$$

حيث إن k هي ثابتة سرعة التفاعل (من الرتبة الأولى) عند الدرجة °37.

ثم تم حساب طاقة تنشيط تفاعل تخرب الأسكوربيك أسيد من العلاقة التالية المستنتجة من علاقة أرينيوس عند درجتي حرارة مختلفتين:

$$\ln\ k_2 \backslash k_1 = Ea/R\ (T_2 - T_1 \backslash T_2 T_1) \qquad (3)$$

حيث: k_1 هي ثابتة سرعة التفاعل عند الدرجة T_1، k_2 هي ثابتة سرعة التفاعل عند الدرجة T_2، T_1 هي درجة حرارة التخزين الأولى أي 310 كالفن وT_2هي درجة حرارة التخزين الثانية أي 318 كالفن.

تم حساب قيمة الـ Q_{10} من العلاقة:

$$Q_{10} = e^{[Ea\ .10\ /\ R(T+10)T]} \qquad (4)$$

$$Q_{\Delta T} = Q_{10}^{\Delta T/10} \qquad (5)$$

حُسب العمر على الرف للصيغة X عند درجة حرارة الغرفة من العلاقة:

$$t_{90(T2)} = t_{90(T1)} / Q_{10}^{\Delta T/10} \qquad (6)$$

حيث $t_{90(T2)}$ هو العمر على الرف عند الدرجة 25°م و$t_{90(T1)}$ هو العمر على الرف عند الدرجة 37°م.

التحليل الإحصائي :

تم التحليل الإحصائي باستخدام اختبار ستيودنت Student test عبر برنامج Excel 2007 وقد تم اعتبار أن النتائج ذات دلالة إحصائية إذا كانت $P-\text{value} \leq 0.05$.

النتائج والمناقشة :

حساب العمر على الرف بطريقة Q_{10} :

سنورد مثالاً على طريقة حساب العمر على الرف لإحدى الصيغ المحضرة وذلك باتباع طريقة الـ Q_{10} ولتكن هذه الصيغة هي الصيغة رقم (5) من الجدول (1).

حساب العمر على الرف للصيغة (5) :

تم تحضير 3 طبخات من الكريم م/ز المحضر وفق الصيغة (5). قِيست امتصاصية AA في العينات المسحوبة دورياً عند طول الموجة 265 نانومتر وحُسب التركيز الموافق بتطبيق المعادلة (1). يبيِّن الجدول (3) مثالاً عن تغيرات تركيز الـ AA مع الزمن عند التخزين بدرجة حرارة 37°م.

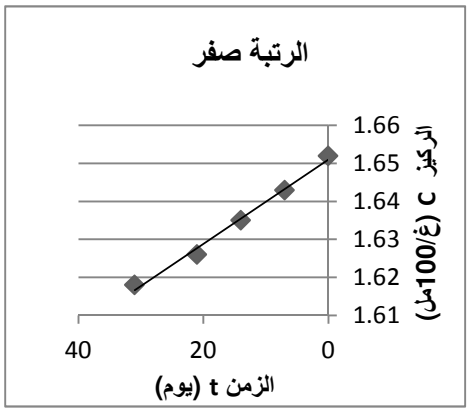
	الزمن (يوم)	الامتصاصية	التركيز (C) (غ/100مل)	ln C
طبخة (1)	0	0.511	1.652	0.501987
	7	0.507	1.643	0.496524
	14	0.505	1.635	0.491643
	21	0.502	1.626	0.486123
	28	0.499	1.618	0.481191
طبخة (2)	0	0.69	2.214	0.794801
	7	0.685	2.199	0.788003
	14	0.682	2.188	0.782988
	21	0.678	2.177	0.777948
	28	0.674	2.164	0.771958
طبخة (3)	0	0.588	1.895	0.639219
	7	0.584	1.884	0.633397
	14	0.582	1.875	0.628609
	21	0.578	1.865	0.623261
	28	0.575	1.856	0.618424

الجدول (3): تغيرات تراكيز AA في كريم الصيغة 5 مع الزمن عند درجة الحرارة 37°م

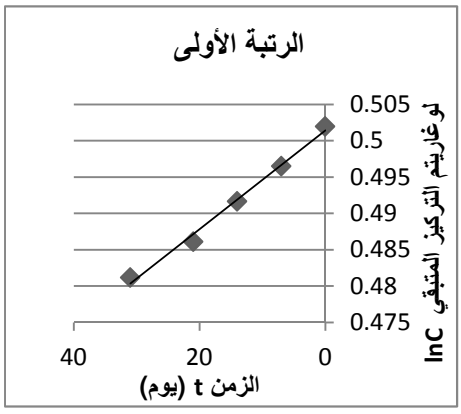
برسم الخطوط البيانية وفق الرتب (0 و1) عند درجة الحرارة: 37°م (الشكلان 1 و2) وذلك للطبخة (1) من الصيغة رقم (5) تم تحديد رتبة تخرب الـ AA وذلك لأننا نحتاج إلى تحديد رتبة التفاعل عند درجة حرارة واحدة على الأقل لحساب العمر على الرف وفق طريقة الـ Q_{10}.

الطبخة (1)

عند الدرجة 37°م

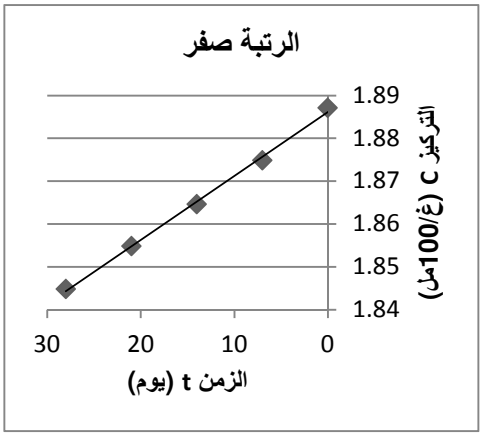


الشكل (1): الخط البياني لتركيز AA بدلالة الزمن (رتبة صفر)

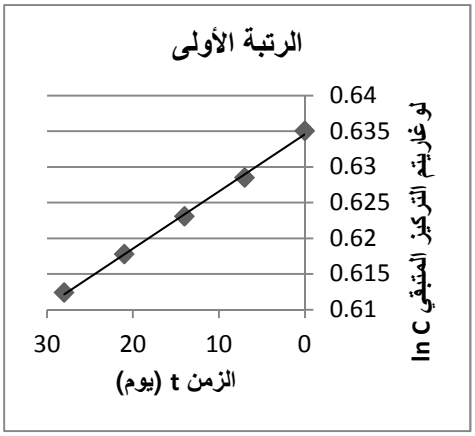


الشكل (2): الخط البياني للوغاريتم التركيز المتبقي من AA بدلالة الزمن (رتبة أولى)

عند الدرجة 45°م



الشكل (3): الخط البياني لتركيز AA بدلالة الزمن (رتبة صفر)



الشكل (4): الخط البياني للوغاريتم التركيز المتبقي من الـ AA بدلالة الزمن (رتبة أولى)

طُبِّق رسم الأشكال لباقي الطبخات وعند درجتي الحرارة 37°م و45°م ووضعت كل معاملات التحديد الناتجة من رسم هذه الخطوط البيانية في الجدول رقم (4):

الجدول (4): قيم معاملات التحديد r^2 للمعادلات التي تبين حركية تخرب AA في كريم م/ز المحضر وفق الصيغة (5) عند درجتي الحرارة 37°م و45°م

	عند الدرجة 37°م	عند الدرجة 45°م
طبخة (1)	عند الرتبة صفر: r^2=0.991	عند الرتبة صفر: r^2=0.997
	عند الرتبة الأولى: r^2=0.992	عند الرتبة الأولى: r^2=0.998
طبخة (2)	عند الرتبة صفر: r^2=0.996	عند الرتبة صفر: r^2=0.997
	عند الرتبة الأولى: r^2=0.997	عند الرتبة الأولى: r^2=0.998
طبخة (3)	عند الرتبة صفر: r^2=0.998	عند الرتبة صفر: r^2=0.965
	عند الرتبة الأولى: r^2=0.999	عند الرتبة الأولى: r^2=0.967

من الجدول (5), نلاحظ أن r^2 تأخذ القيمة الأكبر عند رسم الخطوط البيانية وفق الرتبة الأولى (عند درجتي الحرارة المدروستين) مما أكد لنا هذه الرتبة في تخرب الـ AA وهذا ما أفادنا في حساب طاقة التنشيط عند تطبيق علاقة أرينيوس [20,21].

حساب العمر على الرف للطبخة (1):

بالعودة إلى منحني لوغاريتم التركيز المتبقي من الـ AA (lnC) بدلالة الزمن t عند الدرجة 37°م للطبخة (1) نجد:

$$K_1 = -(y_2 - y_1 / x_2 - x_1)$$

$$K_1 = -(0.491643 - 0.496524)/14 - 7$$

$$= 0.00488/7$$

$$= 0.000697\ day^{-1}$$

$$Shelf\ life[\ t_{90(T1)}\ ] = 0.105/k_1$$

$$=0.105/0.000697$$

$$=150\ days$$

حيث $t_{90(T1)}$ هو العمر على الرف عند الدرجة 37°م.

ومن منحني لوغاريتم التركيز المتبقي ln C بدلالة الزمن t عند الدرجة 45°م للطبخة (1):

$$K_2 = -(y_2-y_1/x_2-x_1)$$

$$K_2 = -(\ 0.623047-0.628502)/14-7$$

$$= 0.000779\ day^{-1}$$

وبتطبيق معادلة أرينيوس (معادلة رقم 3) كان لدينا:

$$\ln\ 0.000779/0.000697 = Ea[318-310]/\ 195878.48$$

$$Ea = 2723.339\ cal/mol$$

حُسبت قيمة Q_{10} من تطبيق المعادلة رقم (4) فكان لدينا:

$$Q_{10} = 1.148163$$

بتطبيق المعادلة رقم (5) نتج لدينا:

$$Q_{\square T} = 1.148163^{\ -1.2}$$

ومنه حصلنا على $t_{90(T2)}$ (العمر على الرف عند الدرجة 25°م) بتطبيق المعادلة رقم (6):

$$t_{90(T2)} = 177.8118\ days$$

يبين الجدول رقم (5) قيم العمر على الرف لـ AA في الطبخات الثلاث للكريم المحضر وفق الصيغة رقم (5) والمحسوبة الطريقة السابقة نفسها :

الجدول (5) : العمر على الرف لـ AA في كريم الصيغة (5)

رقم الطبخة	العمر على الرف (يوم)	المتوسط الحسابي± SD (يوم)
(1)	177.8118	176.929 ±1.061
(2)	177.2251	
(3)	175.7528	

على غرار المثال السابق تم حساب العمر على الرف لكل الصيغ المحضرة (جدول رقم 6):

الجدول (6): العمر على الرف لـ AA في كل الصيغ المحضرة

رقم الصيغة	العمر على الرف (يوم) (متوسط ± SD)	رقم الصيغة	العمر على الرف (يوم) (متوسط ± SD)
1	15	12	1.69±125.437
2	9.73±85.472	13	2.04±126.632
3	2.20±69.449	14	2.63± 128.963
4	1.17±127.705	15	6.86±155.150
5	1.06±176.929	16	5.11±188.546
6	4.55±126.493	17	1.11± 183.784
7	2.68±178.326	18	0.92± 176.854
8	2.94±143.151	19	2.54±130.179
9	3.29±142.579	20	3.68±163.685
10	3.65±120.062	21	2.16± 175.086
11	6.25±107.047		

دراسة رياضية لتأثير العوامل المختلفة على ثباتية AA

1) تأثير الطور المائي :

تم دراسة تأثير نسبة الماء ومكوناته (كحول، بروبيلين غليكول، أملاح....) على ثباتية AA فكانت لدينا النتائج التالية:

A. تأثير نسبة الطور المائي :

تم دراسة تأثير نسبة الطور المائي على ثباتية AA في كريمات م/ز حيث تم تقليل نسبة الطور المائي على حساب الماء من (35% إلى 20%) كما في الصيغتين (4 و5) ومن (30% إلى 25%) كما في الصيغتين (8 و15) ومن (30% إلى 25%) كما في الصيغتين (16 و7).

نلاحظ من الجدول (6) أن تقليل الماء يؤدي إلى زيادة العمر على الرف حيث زاد العمر على الرف من 127 يوماً (صيغة 4) إلى 176 يوماً (صيغة 5) ($P < 0.05$) ومن 143 يوماً (صيغة 8) إلى 155 يوماً (صيغة 15) ($P < 0.05$) ومن 178 يوماً (صيغة 7) إلى 188 يوماً (صيغة 16) ($P < 0.05$) ويفسر ذلك بنقص كمية الماء في الصيغة [9,21].

B. تأثير مكونات الطور المائي :

تم تغيير مكونات أو نسبة مكونات الطور المائي سواء في كريمات ز/م أم في كريمات م/ز ودُرس تأثير كل تغيير على العمر على الرف لـ AA في الصيغة الموافقة فمثلاً:

- يحوي الطور المائي للصيغة (2) (وهي صيغة لمحلول مائي) على مجموعة من المواد المضافة (أملاح معدنية، سوربيتول، إيتانول) وهي نفس المواد التي نجدها في الطور المائي للصيغة المرجعية التي انطلقنا منها (صيغة 1) بينما لا يحوي الطور المائي للصيغة (3) وهي صيغة لكريم م/ز على هذه المواد المضافة. تمت المقارنة هنا (بين الصيغتين 2 و3) بين محلول مائي ذي إضافات وبين كريم م/ز لايحوي طوره المائي أية إضافات للحكم إن كانت الإضافات إلى الطور المائي أو الاستحلاب ضمن زيت هي من تحقق الثباتية الأفضل لـ AA (كانت المقارنة ضمن شروط بحثنا).

- تمت إضافة نفس المواد المضافة (في الصيغة 2 وهي صيغة محلول مائي) إلى الطور المائي للصيغة (4) وهي صيغة لكريم م/ز وتمت مقارنة هذه الصيغة الأخيرة (صيغة 4) مع الصيغة (3) (وهي صيغة كريم م/ز لا يحوي طوره المائي على هذه الإضافات).
- تمت زيادة نسبة كل مادة من المواد المضافة إلى الطور المائي في الصيغة (21) وهي صيغة لكريم ز/م بالمقارنة مع نسبتها في الصيغة (20) وهي صيغة لكريم ز/م أيضاً حيث إن نسبة $MgCl_2$ =1% في الصيغة (20) وقد زيدت إلى 1.5% في الصيغة (21) ونسبة $CaCl_2$ =0.25% في الصيغة (20) وأصبحت 1% في الصيغة (21) ونسبة السوربيتول 1% في الصيغة (20) بينما وصلت إلى 5% في الصيغة (21) وأخيراً تمت زيادة نسبة الإيتانول من 2% في الصيغة (20) إلى 10% في الصيغة (21).

بالمقارنة بين الصيغة (2) ذات العمر على الرف المساوي لـ85 يوماً تقريباً والصيغة (3) ذات العمر على الرف المساوي 69 يوماً تقريباً نجد أن الصيغة (2) أكثر ثباتاً من الصيغة (3) ($P < 0.05$) ويُفسَّر هذا بوجود السوربيتول الذي يسهم بخفض النشاط المائي في الصيغة، كما تذكر إحدى الدراسات أنه كسكر مرجع يتأكسد أولاً ويؤخر بدء أكسدة الـ AA [22]، فضلاً عن إلى وجود الإيتانول الذي يسهم في تثبيت الشحنة السالبة لشاردة الأسكوربات ويُبطِّئ عملية الـ decarboxylation ووفقاً لذلك فإن إضافة عديدات الأغوال (polyols) تبطئ عملية نزع الكربوكسيل لشاردة الأسكوربات غير الثابتة ومن ثمَّ تحسين ثباتية الـ AA في المحاليل المائية[22]. إن وجود كلور الكالسيوم وكلور المغنزيوم يزيد من ثباتية الـ AA بسبب خفضهما للنشاط المائي وهذا ما تؤكده أبحاث ودراسات عديدة[9,22]، كما تزداد القوة الشاردية ضمن الطور المائي بوساطة شوارد الـMg^{2+} والـ Ca^{2+} فتحيط هذه الشوارد بذرة الأكسجين المشحونة سلباً في شاردة الأسكوربات مشكلةً مايدعى بالدرع الشاردية ionic shielding والتي تعوق أكسدة الـAA ومن ثمّ زيادة ثباتيته [23].

ومن هنا يمكننا القول إنَّ صياغة الـ AA ضمن كريم م/ز لاتعتبر طريقة أفضل لتحسين ثباتيته في كل الظروف وإنما يعتمد هذا على مكونات الطور المائي أيضاً حيث وجدنا أن ثباتيته في محلول مائي حاوٍ على سكر مرجع وأملاح مثبتة وإيتانول أفضل من ثباتيته في كريم م/ز لايحتوي فيه الطور المائي على هذه الإضافات حيث توجد دراسات عديدة [22] تبين تحسن ثباتية الـ AA في كريمات م/ز.

كذلك نجد الأمر نفسه والتفسير نفسه في الصيغتين (3 و4) حيث زاد العمر على الرف لـ AA من 69 يوماً إلى 127 يوماً تقريباً ($P < 0.05$) عند وضع الإضافات السابقة في الطور المائي.

بالمقارنة بين العمر على الرف لـAA في الصيغتين (21 و20) نجد أن العمر على الرف للصيغة (21) يساوي تقريباً 175 يوماً وهي أطول من العمر على الرف للـ AA في الصيغة (20) وهو 163 يوماً بفارق إحصائي هام حيث ($P < 0.05$) والصيغتان هما صيغ لكريم ز/م ولكن استخدمنا في الصيغة (21) كميات أعلى من الأملاح والسكر المرجع (سوربيتول) والإيتانول مما جعلنا نستنتج أنه بزيادة نسبة المواد المضافة (ضمن الحدود المستخدمة في دراستنا) أمكننا زيادة العمر على الرف لـ AA عبر تقليل النشاط المائي.

ومما سبق نستنتج أن كل عامل يسبب خفض النشاط المائي أو الفعالية المائية يمكن أن يزيد ثباتية AA في صيغه سواء أكانت على شكل محاليل أم كريمات.

2) تأثير مكونات الطور الزيتي :

تمت دراسة تأثير مكونات الطور الزيتي ونسبة هذه المكونات على ثباتية الـ AA في الصيغ المحضرة حيث تمت المقارنة بين مكونين مختلفين في كل مرة مع تثبيت المكونات الأخرى مثل دراسة تأثير الفازلين واللانولين أو تأثير أبيض البال وشمع النحل كما دُرس دور العوامل الاستحلابية: التوين 80 والسبان 60 وتأثير أنواع الزيوت وبعض العوامل الأخرى.

A. تأثير الفازلين واللانولين :

تم التبديل بين الفازلين واللانولين مع إبقاء نسبتهما الكلية ثابتة في الصيغة حيث:

- تحتوي الصيغة (6) وهي صيغة كريم م/ز على 6% لانولين ولا تحوي الفازلين بينما تحوي الصيغة (7) وهي أيضاً صيغة لكريم م/ز على 6% فازلين ولاتحوي اللانولين.
- تحتوي الصيغة (10) وهي صيغة كريم م/ز على لانولين بنسبة 3% ولاتحتوي على الفازلين بينما تحتوي الصيغة (14) وهي صيغة كريم م/ز أيضاً على 3% فازلين ولا تحتوي لانولين.

من تغيير مكونات الطور الزيتي السابقة وجدنا أنه:

- بالمقارنة بين العمر على الرف للصيغة (6) والذي يساوي تقريباً 126 يوماً والعمر على الرف للصيغة (7) البالغ 178 يوماً تقريباً ($P < 0.05$) وبالمقارنة بين الصيغة (14) ذات العمر على الرف المساوي 128 يوماً تقريباً والصيغة (10) ذات العمر على الرف المساوي 120 يوماً تقريباً ($P < 0.05$) وجدنا أن وجود الفازلين في كريم م/ز للـ AA أفضل من وجود اللانولين بالنسبة لثباتية الـ AA. ويرجح هذا النقص في الثباتية والمرافق لوجود اللانولين إلى احتواء هذا الأخير على بيروكسيدات peroxides والتي تؤدي إلى أكسدة الـ AA ومن ثمَّ تخربه وفقدانه فعاليته حيث يمكن أن تصل قيمة البيروكسيد peroxide value في اللانولين إلى الـ 20 [24] وهي قيمة عالية نسبياً (حيث تعبر قيمة البيروكسيد عن كمية المواد المؤكسدة الموجودة في مادة ما ومن ثمَّ فإن وجود مثل هذه المواد في سواغ لصيغة تحوي الـ AA سيؤدي إلى إنقاص العمر على الرف للصيغة).

B. تأثير أبيض البال وشمع النحل :

تحتوي الصيغة (10) وهي صيغة كريم م/ز 10% أبيض البال ولا تحتوي أي نسبة من شمع النحل بينما تحوي الصيغة (11) وهي أيضاً صيغة كريم م/ز على 10% شمع نحل ولا تحتوي أبيض البال.

تحتوي الصيغة (17) وهي صيغة كريم م/ز على 15% أبيض البال و4% شمع النحل بينما لا تحتوي الصيغة (18) وهي صيغة كريم م/ز على أبيض البال وتحتوي 16% شمع النحل.

بالمقارنة بين الصيغتين (10) ذات العمر على الرف 120 يوماً تقريباً والصيغة (11) ذات العمر على الرف المساوي إلى 107 يوماً تقريباً ($P < 0.05$) وبين الصيغتين (17 و18) والتي ينقص فيهما العمر على الرف من 183 يوماً إلى 176 يوماً على الترتيب ($P < 0.05$) نجد أن:

وجود أبيض البال في الصيغة أفضل من وجود شمع النحل بالنسبة لثباتية الـ AA ويفسر ذلك بكون قيمة البيروكسيد في أبيض البال peroxide value ≥ 0.5 بينما قيمتها في شمع النحل peroxide value ≥ 8 [24] ومن ثمَّ إمكانية احتواء شمع النحل على مواد مؤكسدة (مخربة لـ AA) أكثر لذلك ينقص العمر على الرف لـ AA في الصيغتين (11 و18) الحاويتين على شمع النحل بالمقارنة مع الصيغتين (10 و17).

C. تأثير العوامل الاستحلابية السبان والتوين :

تحتوي الصيغتان (19 و20) (وهما صيغتان لكريمات ز/م) على التوين 80 (5%) كعامل استحلابي ز/م. تم اتباع تقنية الـ (solubilisation) بوساطة العوامل الفعالة سطحياً وذلك لحبس AA ضمن الطور الزيتي وذلك بمساعدته على الانحلال بوساطة Span 60 (5%) حيث إنه عند التحضير تم إضافة الـ AA إلى الطور الزيتي وحبسه فيه بوساطة السبان 60.

بالمقارنة بين الصيغة (19) ذات العمر على الرف 130 يوماً تقريباً والصيغة (20) ذات العمر على الرف 163 يوماً تقريباً ($P < 0.05$) وجدنا أن إضافة الـ AA إلى الطور الزيتي (عبر حلِّه بوساطة السبان 60) تؤدي إلى تحسين ثباتية الـ AA في كريم ز/م حيث إنه يمكن للمواد المتشردة (مثل الأسكوربيك أسيد) أن تنتقل عبر الطور الزيتي وتمتزج هناك مع مسيلات العوامل الفعالة على السطح الكارهة للماء أو المحبة للماء وتعبر الطور الزيتي وهذا ما يقلل من تماس AA مع الماء ومن ثمَّ زيادة ثباتيته [25].

D. تأثير أنواع الزيوت :

تم التبديل بين نسبة كل من زيت الزيتون (زيت نباتي) وزيت البارافين (زيت معدني) في كريم م/ز لدراسة تأثير هذا التبديل على ثباتية الـAA في الكريم المدروس حيث تمت إضافة زيت الزيتون بنسبة 32% وزيت البارافين بنسبة 20% في الصيغة (12) وهي صيغة كريم م/ز بينما تم التبديل في النسبتين السابقتين بين الزيتين في الصيغة (13) وهي صيغة كريم م/ز أيضاً.

لم نلاحظ وجود فروق إحصائية هامة بين كل من العمر على الرف للصيغة (12) البالغ 125 يوماً تقريباً والعمر على الرف للصيغة (13) والبالغ 126 يوماً تقريباً ($P > 0.05$) ومن ثمَّ لايعتبر التبديل بنسب زيت البارافين وزيت الزيتون أمراً هاماً يؤثر على ثباتية الـ AA في كريم م/ز وفق شروط بحثنا.

E. تأثير عوامل أخرى :

- لا توجد فروق إحصائية هامة ($P > 0.05$) بين كل من العمر على الرف لـ AA في صيغة الكريم (4) والعمر على الرف له في الصيغة (14) ومن ثمَّ لايعتبر استبدال زيت البارافين بالفازلين أمراً هاماً يؤثر على ثباتية الـ AA في كريم م/ز؛
- لا توجد فروق إحصائية هامة ($P > 0.05$) بين كل من العمر على الرف للصيغة (5) والعمر على الرف للصيغة (18) ومن ثمَّ لايعتبر استبدال شمع النحل بالغول السيتيلي أمراً هاماً يؤثر على ثباتية الـ AA في كريم م/ز؛
- لا توجد فروق إحصائية هامة ($P > 0.05$) بين كل من العمر على الرف للصيغة (8) والعمر على الرف للصيغة (9) ومن ثمَّ لايعتبر التبديل بنسب كل من أبيض البال وشمع النحل أمراً هاماً يؤثر على ثباتية الـ AA في كريم م/ز ولكن تبيَّن لنا أن وجود أبيض البال بحد أدنى (6% من كامل الصيغة) كافٍ لتحقيق ثباتية الـ AA (ضمن شروط دراستنا).

يلخص الجدول التالي رقم (7) تأثير العوامل المختلفة على ثباتية الـ AA:

الجدول (7): تاثير العوامل المختلفة على ثباتية الـ AA

العامل	ثباتية الـ AA	
خفض نسبة الطور المائي (على حساب الماء)	↑	خفض النشاط المائي
وضع الإضافات (أملاح معدنية، سوربيتول، إيتانول)	↑	
وجود الفازلين	↑	
وجود اللانولين	↓	
وجود أبيض البال	↑	
وجود شمع النحل	↓	
Solubilisation	↑	
استبدال زيت الزيتون بزيت البارافين	–	
استبدال زيت البارافين بالفازلين	–	
استبدال شمع النحل بالغول السيتيلي	–	
التبديل بنسب أبيض البال وشمع النحل	–	

ملاحظة: ↑ يعني زيادة، ↓ يعني نقصان، – يعني لا تأثير

بدراسة وتحليل شاملين للجدول السابق قمنا بتجميع بعضٍ من العوامل المحسنة لثباتية الـ AA وحضَّرنا كريم م/ز وهو يحتوي على AA ضمن شروط مثلى (المحافظة على بعض المواد التي تزيد ثباتية الـ AA) ومن ثمَّ حُضِّرت الصيغة رقم (22) والتي يبين الجدول رقم (8) مكوناتها حيث تم:

- إضافة 1.5% سوربيتول، 0.1% $CaCl_2$، 0.4% $MgCl_2$ وإيتانول إلى الطور المائي مع خفض نسبة الماء في هذه الصيغة إلى 7% ضمن طور مائي نسبته الكلية ضمن الكريم 20%؛
- تمت إضافة البروبيلين غليكول وهو عديد كحول يسهم في زيادة ثباتية الـ AA كونه يخفض النشاط المائي في الصيغة؛
- تمت إضافة الفازلين بنسبة 40% دون إضافة اللانولين.

الجدول (8): الصيغة المحسنة لكريم م/ز الحاوي على AA (صيغة رقم 22)

المكونات	(غ)
فازلين	40
بارافين سائل	15
شمع نحل	9
غول سيتيلي	5
أبيض بال	5
بروبلين غليكول	5
سبان 80	6
سوربيتول	1.5
$CaCl_2$	0.1
$MgCl_2$	0.4
إيتانول	4

AA	2
ماء	7
Shelf life (يوم) (متوسط ± SD)	208.100 ± 2.82

تم تحضير 3 طبخات من الصيغة (22) واتبع البروتوكول السابق نفسه في تخزين العينات وتحضيرها ثم تم حساب العمر على الرف لهذه الصيغة وفق طريقة الـ Q_{10} المشروحة سابقاً فوجدنا أن العمر على الرف يساوي 208 أيام تقريباً وهو العمر على الرف الأطول الذي حصلنا عليه خلال البحث وعليه تعتبر هذه الصيغة صيغة محسنة وهي الأفضل في بحثنا.

الاستنتاجات والتوصيات :

الاستنتاجات :

تم دراسة العوامل المختلفة (نسبة الطور المائي ومكونات الطورين المائي والزيتي ونسبها) على ثباتية الـ AA في مستحضراته الجلدية ووجدنا أن:

- إنقاص الماء في الطور المائي يؤدي إلى إطالة العمر على الرف للـ AA؛
- إضافة مواد معينة (سوربيتول، إيتانول، بروبلين غليكول، أملاح معدنية) إلى الطور المائي يؤدي إلى زيادة العمر على الرف للـ AA؛
- بعض التغييرات في الطور الزيتي تؤثر على ثباتية الـ AA حيث إن:

- وجود الفازلين في صيغة الـ AA أفضل من اللانولين والذي خفض العمر على الرف لـ AA في كريم م/ز؛
- وجود أبيض البال في الصيغة أفضل من وجود شمع النحل بالنسبة لثباتية الـ AA في كريم م/ز؛
- إضافة الـ AA إلى الطور الزيتي بحله بوساطة السبان 60 عبر الـ (solubilisation) أدت إلى تحسين ثباتية الـ AA في كريم ز/م.

استطعنا الوصول إلى صيغة مثالية (محضرة مع الاحتفاظ ببعض العوامل التي تزيد الثباتية) يحقق فيها الـ AA ثباتية عظمى وفضلى ضمن شروط دراستنا حيث وصل العمر على الرف له فيها إلى 208 أيام تقريباً.

التوصيات:

1. متابعة دراسة عوامل أخرى مثل تأثير تركيز الـ AA في المستحضر على ثباتيته؛
2. دراسة متممة لتأثير الـ (solubilisation) على ثباتية الـ AA والعمل على زيادة الثباتية بإضافة مضادات أكسدة؛
3. متابعة دراسة تحرر الـ AA من هذه الصيغ حيث من المهم أن تترافق الثباتية مع تحرر مثالي عند التطبيق.

المراجع :

1. SILVA, G. M.; CAMPOS, P. M. *Study of the rheologic behaviour and HPLC determination of a skin care formulation containing Ascorbic Acid or Magnesium Ascorbyl Phosphate*. Cosmetic Science For The New Century Berlin, 21(b), 2000, 11-14.
2. NUSGENS, B.V. *Topically applied Vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and II, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase in the human dermis*. J Invest Dermatol, 116(6), 2001, 853-859.
3. JENTZSCH, A.; STREICHER, H.; ENGELHART, K. *The synergistic antioxidative effect of ascorbyl phosphate and alphatocopheryl acetate.* Cosmet Toiletries, 116(6), 2001,55-64.
4. PINNEL, S.R. *Topical L-ascorbic acid: percutaneous absorption studies.* Dermatol Surg, 27(2), 2001, 137-142.
5. GASPER, L.R.; CAMPOS, P.M. *Rheological behavior and the SPF of sunscreens*. Int J Pharm, 250(1), 2003, 35-44.
6. CAMPOS, P.M.; GONCALVES, G.M.S.; GASPER, L.R. *In vitro antioxidant activity and in vivo efficacy of topical formulations containing vitamin c and its derivatives studied by non-invasive methods*. Skin Res Technol, 14(3), 2008, 376-380.
7. YILMAZ, S.; SADIKOGLU, M. SAGLIKOGHE, G.; et al. *Determination of Ascorbic Acid in Tablet Dosage Forms and some fruit juices by DPV*. Int J Electrochem Sci, 3, 2008, 1534-1542.
8. CAMPOS, F.M.; ROBEIRO, S.M.R. et al. *Optimization of methodology to analyze ascorbic acid and dehydroascorbic acid in vegetables*. Quim Nova, 32(1), 2009, 87-91.
9. PARR, J. et al. *Stabilized Ascorbic compositions*. Patent Application Publication US, 0034548A, 2002, 1-3.
10. SILVA, G. M.; CAMPOS, P. M. *Histopathological studies of ascorbic acid and magnesium ascorbyl phosphate in a skin care formulation*. Int J Cosmet Sc, 22(3), 2000, 169-179.
11. ICH Harmonized tripartite guidelines for stability testing of new drug substances and products- Q1A (R2), 4 version, 2003.
12. SHAHEEN, M.S. *Accelerated study of Metronidazole Infusion 100 ml. The Journal of Teachers Association RMC*, 18(2), 2005, 118-121.
13. GONCALVES, G.M.S.; CAMPOS, P.M. *Shelf life and rheology of emulsions containing vitamin c and its derivatives*. Revista de Cienciac Farmaceuticas Basica e Aplicada, 30(2), 2009, 89-94.
14. Arayne, M.S.; Sultana, N.; Bibi, Z. *Rapid and Specific Spectrophotometric and RP-HPLC Methods for the Determination of Ascorbic Acid in Fruits Juices and in Human Plasma*. J. Chem. Soc. Pak, Vol. 31, No.3, 2009.
15. Selimovic, A.; Salkic, M.; Selimovic. A. *Direct spectrophotometric determination of L-Ascorbic Acid in pharmaceutical preparations using Sodium oxalate as a stabilizer*. International of basic and applied sciences IJBAS-IJENS. 2011, Vol: 11No; 02.
16. U.S. Food and Drug Administration (FDA), Stability testing of new substances and products, ICH Q1A, FDA, Washington, DC, 2001.
17. World Health Oganization Guidelines for stability testing of pharmaceutical products containing established drug substances in conventional dosage forms. WHO Technical Report Servies, 1996, No. 863. WHO, Geneva.

18. Ansel, H.C; Allen, Jr. L.V; Popovich. N.G. *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*. 7th Ed., Lippincott Williams & Wilkuns, U.S.A, 1999, 102-167.
19. CONNORS, k.A; AMIDON, G.L; STELLA, V.J. *Chemical stability of pharmaceuticals*. 2nd. Ed., John Wiley &Sons, Canada, 1986, 3-31,208-220.
20. SINKO,P.j. *Martin's physical pharmacy and pharmaceutical sciences*. 6th. ed., Wolters Kluwer, Lippincott Williams &Wilkins, U.S.A, 2011, 318-354.
21. AULTON,M.E. *The Design And Manufacture Of Medicines*. 3rd. ed., Churchill Livingstone Elsevier, U.S.A, 650-665.
22. RAMIREZ, J.S. et al. *Stabilized Ascorbic composition*. Patent Application Publication US, 0077220A1, 2007, 1-7.
23. Suk Lee, J.; Woong Han, J.; Hoon Han, S. *The Stabilization of L- ascorbic acid in aqueos solution and water-in-oil-in water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration*. J. Cosmet. Sci., 55, 2004, 1-12.
24. Handbook of *pharmaceutical excipients*. 5th.ed., Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, London-Chicago, 2006.
25. AKHTAR. N; AHMAD, M. et al. *Formulation and characterization of multiple emulsion containing 1% L- Ascorbic Acid.* Chemical Society of Ethiopia. 24(1), 2010, 1-10.