

## Hidroksizinin Tablet Formülasyonunda Analizi için Yeni Bir RP-HPLC Tekniği

### A Novel RP-HPLC Technique for the Analysis of Hydroxyzine in Tablet Formulation

İkbal Demet NANE <sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup> Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Teknik Bilimler Meslek Yüksekokulu, Kozmetik Teknolojileri Programı, Isparta, Türkiye



#### Ö Z

Alerji ilaçları, alerjik reaksiyonları hafifletmek ve semptomları kontrol altına almak için kullanılan farmasötik ürünlerdir. Günümüzde alerji ilaçlarının önemi, artan alerjik hastalık prevalansı ve semptomların etkili bir şekilde yönetilmesinin gerekliliği nedeniyle giderek artmaktadır. Bu çalışmada alerjik bir ilaç olan hidroksizinin tayin edilmesinde yeni bir metot önerilmiştir. Bu çalışmanın amacı, tablet formundaki piperazin türevi ilaç etken maddesi hidroksizini analiz etmek için bir RP-HPLC metodu geliştirmek ve doğrulamaktır. Optimum sıvı kromatografik ayırma koşullarını belirlemek için mobil faz pH'ı ile alıkonma süresi arasındaki korelasyona dayanan sistematik bir yaklaşım kullanılmıştır. Hidroksizinin tayini, Xbridge C18 kolonunda (3 µm, 150 x 4,6 mm, I.D.), pH 6'ya ayarlanmış %45 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımında sağlanmıştır. Çalışma 0,8 mL/dakika akış hızında, 37 °C kolon sıcaklığı ve 230 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Hidroksizin, metot validasyonu, piperazin, RP-HPLC

Alınış / Received: 06.05.2023 Kabul / Accepted: 22.06.2023 Online Yayınlanma / Published Online: 15.08.2023



## ABSTRACT

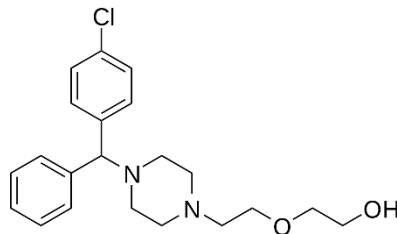
Allergy medications are pharmaceutical products used to alleviate allergic reactions and control symptoms. The importance of allergy medications in today's world is increasingly recognized due to the rising prevalence of allergic diseases and the necessity for effective symptom management. In this study, a new method is proposed for the determination of hydroxyzine, an antiallergic drug. The aim of this research was to develop and validate an RP-HPLC method to analyze the piperazine-derived drug active ingredient hydroxyzine in tablet form. A systematic approach based on the correlation between mobile phase pH and retention time was used to determine the optimum liquid chromatographic separation conditions. The determination of hydroxyzine was achieved on an Xbridge C18 column (3 µm, 150 x 4.6 mm, I.D.) in an acetonitrile-water binary mixture containing 45% (v/v) acetonitrile adjusted to pH 6. The run was performed at a flow rate of 0.8 mL/min, column temperature of 37 °C and wavelength of 230 nm.

**Keywords:** Hydroxyzine, method validation, piperazine, RP-HPLC



## 1. Giriş

Alerji maruziyetleri, hafif lokalize reaksiyonlardan hayatı tehdit eden anafilaksiye kadar değişmektedir. Yaş, cinsiyet, alerjinin türü gibi klinik faktörlerin bir araya gelmesiyle alerji büyük oranda tedavi edilebilmektedir [1]. Histamin, ani alerjik reaksiyonların önemli bir aracısıdır. Biyolojik bir amin olan histamin; vücuttaki etkisini 4 reseptöre (H1, H2, H3 ve H4) bağlanarak gösterir [2]. H1 reseptörleri alerji ve iltihaplanmalar ile ilgili bir bölgedir. Bu reseptör grubu sinirler, solunum epitel, hepatik hücreler, düz kas hücreleri, dendritik hücreler ve lenfositler dahil olmak üzere birçok doku ve hücre ile ifade edilir [3-4]. Histamin solunum yolundaki düz kasın kasılmasını sağlar, geçirgenliği artırır ve H1 reseptörünü aktive eder. Bu nedenle, eritem, kaşıntı ve ödem gibi deride gözlenen semptomlar da dahil olmak üzere hemen hemen tüm ani aşırı duyarlılık reaksiyonları, H1'in aktivasyonu ile ortaya çıkabilir [5-6]. Antihistaminikler ise histaminlerin dokularda bağlandıkları reseptörlere onlardan önce bağlanarak vücutta oluşabilecek semptomları önlemeye yardımcı olur. Bu çalışmada analizi yapılan hidroksizin; 2-[2-[4-[(4-klorofenil)-fenilmetil]piperazin-1-il]etoksietanol, kaşıntı, mide bulantısı, anksiyete ve gerginlik semptomları için kullanılan, çoklu farmakolojik etkilere sahip en sık reçete edilen antihistaminiklerden biridir. Aynı zamanda bu ilaç antihistaminik etkisi güçlü bir H1 reseptör antagonisti ve piperazin türevidir [7].



**Şekil 1:** Hidroksizin kimyasal yapısı

Farmasötik bileşiklerin gerçek numunelerde saptanması ve izlenmesi çok önemlidir ve literatürde önerilen çeşitli yöntemler vardır. Hidroksizin gaz kromatografisi [8], ince tabaka kromatografisi [9], miseller sıvı kromatografisi [10], kapiller elektroforez [11], voltametik yöntem [12], sıvı kromatografik-

kütle spektrometresi (LC-MS) [13]; potansiyometri [14-15]; gravimetri [16], titrimetri [17-19] ve ters faz sıvı kromatografi (RP-HPLC) [20-21] gibi pek çok farklı yöntemle analizi gerçekleştirilmiştir. Ters faz sıvı kromatografi haricinde bildirilen yöntemlerin çoğu, analizden önce numune ön işlemi ve ilaç ekstraksiyonu gerektirmektedir. Bu çalışmada tercih edilen ters faz sıvı kromatografi ile özellikle molekül yapılarında, yüksek polar yüzey alanına sahip olma özelliği sağlayan (-OH, -NH<sub>2</sub>, COO<sup>-</sup> ve NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) grupları bulunduran analitlerin tayini yapılabilmektedir. Bu durum verimin maksimum, alıkonma süresinin minimumda olmasıyla ilişkilidir [22]. Çalışmada kullanılan hidroksizin, yapısında bulundurduğu fenil grupları ve piperazin halkasının konumundan dolayı RP-HPLC yöntemi ile tayin edilmiştir. Bu yöntem, hareketli fazın moleküler yapı ile etkileşerek hidroksizin gibi yeni nesil ilaçlar için seçici, düşük maliyetli, kararlı ve kullanımı kolay bir analiz sunmaktadır.

Bu çalışmada hidroksizinin kalitatif tayini için sabit kolon sıcaklığında, mobil faz pH'ına ve mobil fazdaki organik modifiyer konsantrasyonuna bağlı olarak kapasite faktörü (k) değerlerindeki değişim incelenerek optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Bileşiklerin tayini için mümkün olan en kısa sürede analiz yapılması amacıyla geliştirilen metot ile Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) parametrelerine göre valide edilmiş ve daha sonra ilaç formülasyonunda kantitatif tayin yapılmıştır [23]. Daha önce geliştirilen analitik yöntemlere göre, hidroksizin tayini için sağlam, hızlı, hassas, seçici, doğru ve kesin RP-HPLC yöntemleri geliştirilmiştir.

## 2. Materyal ve Metot

### Cihazlar

Bu çalışmada bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı (Shimadzu Teknoloji, Japonya) ile yapılmıştır. Kullanılan sistem UV dedektörü (SPD-20A), pompa (LC-20AD), kolon fırını (CTO-20A) ve degazer ünitesinden (DGU-20A3) oluşmaktadır. Kromatografik ayırma için hazırlanan mobil faz pH ölçümleri, Mettler Toledo pH/İyon analiz cihazı (Schwerzenbach, İsviçre) ve In Lab 413 Ag/AgCl pH elektrodu kullanılarak yapılmıştır. Ultra saf su ise, Direct-Q® 3 UV (Millipore, Bedford, MA, ABD) su arıtma sisteminden sağlanmıştır.

### Kimyasallar

Bu çalışmada hidroksizin, siklizin (iç standart) ve urasil Sigma-Aldrich'ten (ABD) temin edilmiştir. Mobil fazın hazırlanmasında organik çözücü olarak asetonitril, mobil fazda tampon bileşenleri olarak o-fosforik asit, sodyum hidroksit, amonyum bikarbonat ve amonyak, elektrot kalibrasyonu için referans standart potasyum hidrojen ftalat Merck firmasından (Darmstadt, Almanya) sağlanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm kimyasallar analitik saflıktadır.

### Kromatografik Koşullar

Bu çalışmada, hidroksizinin kromatografik tayini için mobil faz olarak farklı pH değerlerinde, %45 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımları hazırlanmıştır. Mobil faz pH'sının ayarlanmasında tampon olarak fosfat ve amonyak-amonyum klorür tamponu tercih edilmiş ve mobil fazlar içerisinde kullanılan o-fosforik asit ve amonyum klorür derişimi 30 mM'da sabit tutulmuştur. Her bir enjeksiyon 20 µL olacak şekilde sabit hacimde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma, Xbridge C18 kolonunda (3 µm, 150 x 4,6 mm) gerçekleştirilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 37 °C'ye ayarlanıp, akış hızı 0,8 mL/dak ve enjeksiyon hacmi 20 µL'de tutulmuştur. UV dedektörü 230 nm dalga boyuna ayarlanmıştır.

### Standart Maddelerin ve Kalibrasyon Çözeltilerinin Hazırlanması

Analiz edilen bileşiğin ve iç standardın (100 µg/mL) stok çözeltileri mobil fazda çözülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler, güneş ışığından korumak için +4°C'de, karanlıkta saklanmıştır. Lineer çalışma aralığı belirlenen hidroksizin için kalibrasyon çözeltileri optimum su-organik ikili karışımda 5-25 µg/mL, konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiği için iç standart metodu kullanılmıştır. Bunun için seçilen iç standart siklizin tüm çalışma boyunca 3 µg/mL derişimde sabit tutulmuştur.

### Tablet Çözeltilisinde Analiz

Hidroksizinin kantitatif tayini için tablet analizi yapılmıştır. Bu yöntemde on adet tablet (Atarax® 25 mg) ezilerek toz haline getirilmiş ve 1 tablete eşdeğer miktarda tartılmıştır. Ardından bir adet tablet

miktarındaki toz, balon jöjeye aktarılarak mobil faz ilave edilmiş ve hacim 100 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan örnek çözelti belirlenen ilaç etken maddelerinin çözülmesi için çözeltiler ultrasonik banyoda 20 dakika bekletilmiştir. Çözeltide herhangi çözünmeyen bir kısım kalmaması için süzme işlemi uygulanmıştır.

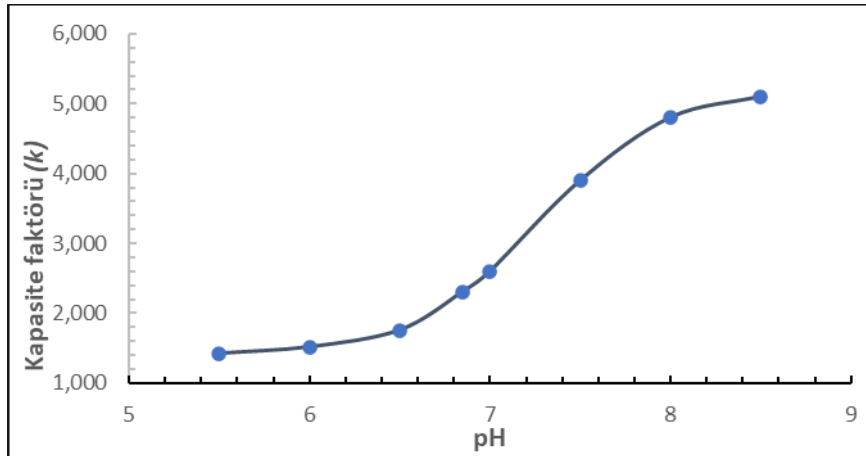
### Geri Kazanım Çalışmaları

Çalışma kapsamında, yöntemin doğruluğunu belirlemek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Numuneler, sabit miktarda etken madde içeren tablet numunesine bilinen miktarda saf standart ve seçilen iç standart (siklizin) eklenerek analiz edilmiştir. Geri kazanım yüzdesi, numunedeki etken maddenin konsantrasyonu ve eklenen standart çözelti kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3. Bulgular

Ayırma verimliliğini en üst düzeyde tutabilmek için analitlere uyumlu kolon seçimi yapılması gerekmektedir [24]. Bu çalışmada kullanılan ayırma yöntemi için seçilen kolon; analiz süresince analitlerin hem kantitatif hem de kalitatif olarak tayinlerinde en verimli sonuçları ortaya koymuştur. Yeni nesil kolonlardan bazik bileşiklerin analizine uygun XBridge C18 BEH kolon, (pH 1-12) tercih edilmiştir. Bu kolonların en iyi özelliği kolon içerisindeki silis bileşiğinin çapraz bağlarından dolayı pH, sıcaklık vb. değişimlere karşı çok dirençli olmalarıdır.

Bu çalışmada, alerjik hastalıkların tedavisinde kullanılan hidrosizinin RPLC yöntemi ile kantitatif tayininde optimum ayırma koşulunu belirlemek için mobil faz optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bileşiklerin pKa değerleri kullanılarak moleküler veya iyonize halde buldukları pH değerlerini belirlemek mümkündür. Bunun için pKa değerinin 1,5 birim üstü ve altındaki pH değerleri çalışma pH aralıkları olarak belirlenir. Bu amaçla kromatografik koşullar sabit tutularak kolon sıcaklığı, mobil fazın asetonitril konsantrasyonu ve pH değişiminin bileşiklerin kapasite faktörü üzerindeki etkileri araştırılmıştır [25-26]. Standart urasil çözeltisi ( $t_0$ ), k değerinin hesaplanması için kullanılmıştır. İncelenen her bir pH değerindeki (5,5 – 8,5), k değerleri, %45 (v/v) içeren asetonitril-su ikili karışımındaki bileşiklerin  $t_R$  ve  $t_0$  değerleri kullanılarak hesaplanmıştır. %45 asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımında değişen pH değerlerine karşı kapasite faktörlerinin değişimi Şekil 2'de verilmiştir.



Şekil 2: Hidrosizinin mobil faz pH'ı ile k değerleri arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoidal grafik

Sıvı kromatografik tayinde optimum kromatografik ayırma koşulunun sağlanabilmesi için; k değerinin  $\geq 1$  olması, seçicilik faktörü ( $\alpha$ )'nın 1,15'ten büyük ve ayırma gücü ( $R_s$ ) değerinin 1,5'ten büyük olması beklenir. Ayırma işlemi, kromatografik analizde mümkün olan en kısa sürede gerçekleşmelidir. Bunun için, pH 6,0'a ayarlanmış %45 (v/v) asetonitril içeren bir asetonitril-su ikili karışımı, belirtilen kromatografik parametrelerin sağlandığı koşul olarak belirlenmiştir.

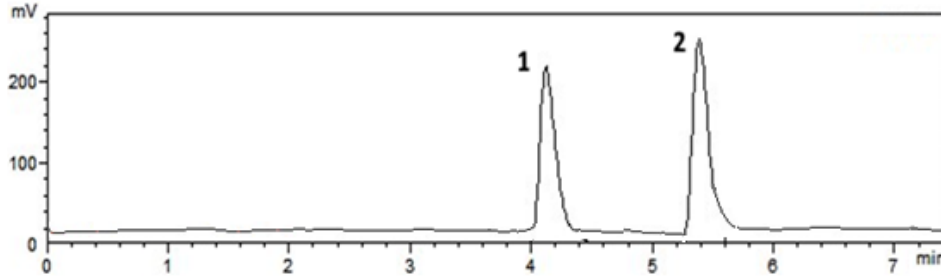
Kantitatif bir analizde analitik ölçümlerdeki hataları telafi etmek için iç standart (İS) metodu kullanılmalıdır. İlaç formülasyonlarındaki katkı maddeleri ve numune enjeksiyonu sırasındaki hacim hataları gibi sistematik ve rastgele hataları elimine etmek için İS yöntemi tercih edilmektedir [27-29]. İç

standart seçilirken; optimum ayırma koşulları altında belirlenen bileşiklerden kromatografik olarak ayrılması şartı aranmaktadır. Bu çalışmada İS olarak siklizinin seçilmiştir. Purnell eşitliği (Eş. 1);  $\alpha$ ,  $R_s$  ve  $k$  değerleri arasındaki ilişkiyi göstermektedir. Belirlenen koşuldaki mobil faz ortamında, Purnell denkleminde göre hesaplanan değerler Tablo 1'de verilmiştir. Optimum ayırma koşulları altında elde edilen kromatogram ise, Şekil 3'te verilmiştir.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[ \frac{\alpha-1}{\alpha} \right] \left[ \frac{k_2}{(1+k_2)} \right] \quad (1)$$

**Tablo 1:** Belirlenen optimum koşula ait değerler

Bileşik	k	$\alpha$	$(\alpha-1)/\alpha$	$(k_2)/(k_2+1)$	$1/4\sqrt{N}$	$R_s$
Siklizinin (İS)	1,167					
Hidroksizin	1,795	1,538	0,350	0,642	22,853	5,133



**Şekil 3:** Belirlenen optimum ayırma koşuluna göre elde edilen kromatogram 1) Siklizinin (İS), 2) Hidroksizin

Bu çalışmada hidroksizinin kantitatif tayini için metod validasyonu yapılmıştır. Optimum ayırma koşulları belirlendikten sonra, kromatografik olarak sistem uygunluk parametreleri Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (USP) yönergesine göre belirlenmiştir. Bu amaçla bileşikler HPLC sistemine üç tekrarlı olarak enjekte edilerek kromatografik parametreler hesaplanmış ve referans değerlere uygunluğu belirlenmiştir (Tablo 2).

**Tablo 2:** Bileşikler için sistem uygunluk parametreleri

Parametre	Siklizinin (İS)	Hidroksizin	Referans değerler
Alıkonma zamanı ( $t_R$ )	4,268	5,505	-
Kuyruklanma faktörü ( $T_f$ )	1,957	1,321	$\leq 2$
Alıkonma (kapasite) faktörü ( $k$ )	1,168	1,796	$\geq 1$
Ayırma gücü ( $R_s$ )	-	5,133	$\geq 2$
Teorik tabaka sayısı ( $N$ )	4070	8356	$> 2000$
Seçicilik faktörü ( $\alpha$ )	-	1,538	$> 1$
RSD% ( $t_R$ , alıkonma zamanı için)	0,129	0,064	$\leq 1$
RSD% (pik alanı için)	0,406	0,884	$\leq 1$

USP'ye göre sistem uygunluk parametrelerinin sonuçları (Tablo 2), geliştirilen kromatografik yöntemin analiz ve analitik yöntem validasyonu için uygun olduğunu göstermiştir. Sistem uygunluk testinde, bileşiğin alıkonma süreleri ve pik alanlarının %RSD'si %2'nin altındadır. Bu durum, tekrarlanabilir enjeksiyonlardaki değişimin küçük olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntemin doğrusallığını belirlemek için kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Elde edilen veriler Tablo 3'te sunulmuştur. Hidroksizin için tayin limiti (LOD) ve kantitatif tayin limiti (LOQ); 3,3:1 ve 10:1 sinyal/gürültü oranlarına göre belirlenmiştir. Sonuçlar, korelasyon katsayısının >0,999 olması gerektiğini belirten ICH yönergesine göre kabul kriterlerini karşılamaktadır.

**Tablo 3:** Hidroksizine ait kalibrasyon doğrusu parametreleri

Parametreler	Hidroksizin
Regresyon Denklemi	$y=0,424x-0,404$
Eğimin standart hatası	0,009
Kesimin standart hatası	0,149
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Derişim Aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ )	5-25
Tayin limiti (LOD, $\mu\text{g/mL}$ )	1,104
Kantitatif tayin limiti (LOQ, $\mu\text{g/mL}$ )	3,347

Hidroksizinin analizi için yapılan kesinlik çalışmalarında gün içi ve günler arası analizler, iki farklı konsantrasyon için aynı gün, üç farklı zaman ve bu konsantrasyonların üç farklı günde enjekte edilmesi ile belirlenmiştir. Bu sonuçlar Tablo 4'te gösterilmiştir. Burada beş tekrarlı yapılan analizlerden hesaplanan sonuçların bağıl standart sapma (% RSD) değerleri %2'nin altındadır ve kesinlik verileri için yeterlidir.

**Tablo 4:** Hidroksizine ait gün içi ve günler arası analiz sonuçları

Bileşik	Teorik derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gün içi derişim ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g/mL}$ )	Günler arası derişim ortalaması	% RSD ( $\mu\text{g/mL}$ )
Hidroksizin	10,000	10,254	0,117	9,790	0,358
	20,000	21,343	0,403	18,058	0,814

Analitik bir yöntemin doğruluğu, kabul edilen referans değer ile bulunan değer arasındaki yakınlığı ifade etmektedir. Geri kazanım deneyleri, ticari formülasyonlara katkı yapılarak gerçekleştirilmiştir. 25 mg hidroksizin etken maddesini içeren Atarax ® tablet formülasyonunda kantitatif tayin ve geri kazanım çalışması üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Belirli bir derişimdeki standart madde eklenerek doğruluk çalışmaları yapılmıştır. Hesaplanan veriler Tablo 5'te verilmiştir. Hesaplanan ortalama geri kazanım değerleri, yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu ve numune ortamındaki yardımcı maddelerin herhangi bir etkisinin olmadığını göstermektedir.

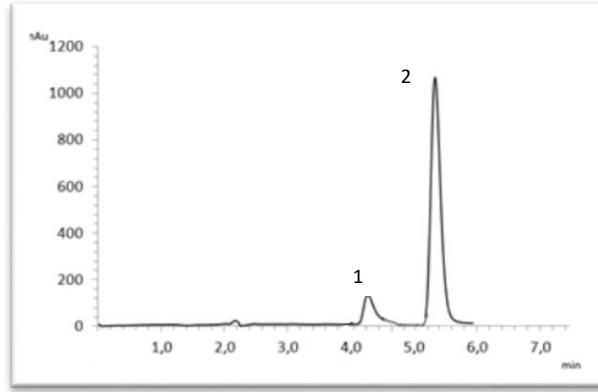
Hidroksizin için ortalama geri kazanım yüzdesi, bu değer %95-105 arasında olması gerektiğini belirten ICH yönergesine uygundur [23].

**Tablo 5:** Hidroksizinin tablet formülasyonunda gerçekleştirilen geri kazanım deneylerine ait bulgular

Hidroksizin		
	Bulunan miktar	Geri kazanım (%)
1	25,576	102,306
2	25,178	100,714
3	25,599	102,395
$X_{ort} \pm GS^*$	25,451 $\pm$ 0,587	101,805 $\pm$ 2,348
SS	0,233	0,236
BSS	0,979	0,929
%Hata	-1,805	-

\*Güven aralığı %95 güven seviyesinde verilmiştir.

Tablet numunesinde gerçekleştirilen kromatografik tayini gösteren kromatogram Şekil 4'te verilmiştir.



**Şekil 4:** Hidroksizin içeren Atarax® (25 mg) tablet için hazırlanan kromatogram, 1-Siklizin (3 µg/mL, İS); 2-Hidroksizin (20 µg/mL)

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Hidroksizinin tayini için literatürde deneme yanılma metodu ile yapılmış çalışmalar vardır. Bu çalışma ile mobil faz pH'sı ve bileşiğin kapasite faktörü değerleri arasındaki ilişkiden yararlanarak sistematik bir çalışma ile optimum tayin koşulu belirlenmiştir. Geliştirilen metodun kesinliği ve doğruluğunun yeterli olduğu metod validasyonun çalışması ile belirlenmiştir. RPLC analizi ile tablet formülasyonlarındaki bileşiğin kantitatif analizinde kesinliğin belirlenmesinde RSD değeri %2'nin altında hesaplanmıştır. Seçilen ticari tabletlerdeki hidroksizin miktarı (Atarax, 25 mg), hesaplanan miktarları ile uyum içinde bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar geliştirilen metodun rutin kullanıma uygun olduğunu göstermiştir.

#### Teşekkür

Bu projenin mali desteği için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine (4826-D2-16) teşekkür ederim.

#### Etik Beyanı

*Bu çalışmada, "Yükseköğretim Kurumları Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiği Yönergesi" kapsamında uyulması gerekli tüm kurallara uyulduğunu, bahsi geçen yönergenin "Bilimsel Araştırma ve Yayın Etiğine Aykırı Eylemler" başlığı altında belirtilen eylemlerden hiçbirinin gerçekleştirilmediğini taahhüt ederiz.*

#### Kaynakça

- [1] Pettersson, M. E., Koppelman, G. H., Flokstra-de Blok, B. M., Kollen, B. J., & Dubois, A. E. 2018. Prediction of the severity of allergic reactions to foods. *Allergy*, 73(7), 1532-1540.

- [2] Maintz, L., & Novak, N. 2007. Histamine and histamine intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, 85(5), 1185-1196
- [3] Thurmond, R. L., Desai, P. J., Dunford, P. J., Fung-Leung, W. P., Hofstra, C. L., Jiang, W., ... & Karlsson, L. 2004. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 309(1), 404-413.
- [4] Laszlo, V., Rothe, G., Hegyesi, H., Szeberenyi, J. B., Orsó, E., Schmitz, G., & Falus, A. 2001. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflammation Research*, 50, 428-434.
- [5] Simons, F. E. R. 2004. Advances in H1-antihistamines. *New England Journal of Medicine*, 351(21), 2203-2217.
- [6] Schaefer, U., Schmitz, V., Schneider, A., & Neugebauer, E. 1999. Histamine induced homologous and heterologous regulation of histamine receptor subtype mRNA expression in cultured endothelial cells. *Shock (Augusta, Ga.)*, 12(4), 309-315.
- [7] Dimitriadou, V., Pang, X., & Theoharides, T. C. 2000. Hydroxyzine inhibits experimental allergic encephalomyelitis (EAE) and associated brain mast cell activation. *International journal of immunopharmacology*, 22(9), 673-684.
- [8] Kintz, P., Godelar, B., & Mangin, P. 1990. Gas chromatographic identification and quantification of hydroxyzine: application in a fatal self-poisoning. *Forensic science international*, 48(2), 139-143.
- [9] Ackermann, H., Kretzschmann, F., Krüger, S., & Lexow, B. 1977. Thin-layer chromatographic technic for the semiquantitative determination of hydroxyzine residues in animal material. *Die Nahrung*, 21(7), 603-610.
- [10] Martinez-Algaba, C., Bermudez-Saldana, J. M., Villanueva-Camanas, R. M., Sagrado, S., & Medina-Hernández, M. 2006. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(2), 312-321.
- [11] Capella-Peiro, M. E., Bossi, A., & Esteve-Romero, J. 2006. Optimization by factorial design of a capillary zone electrophoresis method for the simultaneous separation of antihistamines. *Analytical biochemistry*, 352(1), 41-49.
- [12] Beltagi, A. M., Abdallah, O., & Ghoneim, M. M. 2008. Development of a voltammetric procedure for assay of the antihistamine drug hydroxyzine at a glassy carbon electrode: Quantification and pharmacokinetic studies. *Talanta*, 74(4), 851-859.
- [13] Zhou, N., Liang, Y. Z., Chen, B. M., Wang, P., Chen, X., & Liu, F. P. 2007. Development and validation of LC-MS method for the determination of hydroxyzine hydrochloride in human plasma and subsequent application in a bioequivalence study. *Chromatographia*, 66, 481-486.
- [14] Bouklouze, A., Elbouzekraoui, M., Cherrah, Y., Hassar, M., & Kauffmann, J. M. 2002. Potentiometric sensor for hydroxyzine determination. *Electroanalysis: An International Journal Devoted to Fundamental and Practical Aspects of Electroanalysis*, 14(19-20), 1369-1374.
- [15] Ciaccio, L. L., Missan, S. R., McMullen, W. H., & Grenfell, T. C. 1957. Nonaqueous titration of 1, 4-Disubstituted piperazines. *Analytical Chemistry*, 29(11), 1670-1673.
- [16] Pasich J, Stasiewska K. 1962. Simple gravimetric determination of hydroxyzine, diprophylline, chlorpromazine and ethionamide in suppositories. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 1962;(19):181-182.
- [17] Basavaiah, K., & Charan, V. S. 2002. Titrimetric and spectrophotometric assay of some antihistamines through the determination of the chloride of their hydrochlorides. *Il Farmaco*, 57(1), 9-17.
- [18] Rajendraprasad, N., & Basavaiah, K. 2013. Titrimetric assay of hydroxyzine dihydrochloride in pharmaceuticals and formulations in non-aqueous medium. *International Journal of PharmTech Research*, 5(1), 105-111.
- [19] Rajendraprasad, N., Basavaiah, K., Vinay, K. B., & Revanasiddappa, H. D. 2010. Sensitive and selective extractive spectrophotometric method for the determination of hydroxyzine dihydrochloride in pharmaceuticals. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 54(4), 233-239.
- [20] Péhourcq, F. 2004. A simple high-performance liquid chromatographic method for detection of hydroxyzine in human plasma after overdose. *Journal of pharmacological and toxicological methods*, 50(1), 41-44.



- [21] Sher, N., Siddiqui, F. A., Fatima, N., Perveen, S., & Shafi, N. 2015. New method development for hydroxyzine determination: application in stability studies, pharmaceutical formulations, and humane serum. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 38(8), 911-918.
- [22] Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. 2011. *Introduction to modern liquid chromatography*. John Wiley & Sons.
- [23] ICH, *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1) Harmonized Tripartite Guideline* 2005.
- [24] Daldal, Y. D., & Demiralay, E. Ç. 2022. Development of liquid chromatographic and UV-visible spectrophotometric methods for determination of pKa values of folic acid antimetabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 212, 114647.
- [25] Yılmaz, H., Üstün, Z., & Çubuk Demiralay, E. 2016. RPLC determination of acid dissociation constants and quantitative estimation for sulfasalazine. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 13, 103-110.
- [26] Demiralay, E. Ç., Ürer, F., Üstün, Z., & Daldal, Y. D. 2023. RPLC Method Development And Validation For The Simultaneous Determination Of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors In Tablet Formulations. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 47(2), 7-7.
- [27] Vonaparti, A., Kazanis, M., & Panderi, I. 2006. Development and validation of a liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric method for the determination of benazepril, benazeprilat and hydrochlorothiazide in human plasma. *Journal of mass spectrometry*, 41(5), 593-605.
- [28] Paszun, S. K., Stanisz, B., & Pawłowski, W. 2012. Rapid and simple stability indicating HPLC method for the determination of cilazapril in pure substance and pharmaceutical formulation in comparison with classic and derivative spectrophotometric methods. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69(2), 193-201.
- [29] Kuzucanlı, E., Demiralay, E. Ç., Daldal, Y. D., Üstün, Z., Konçe, İ., & Alsancak, A. G. (2022). Development and validation of RPLC method for the simultaneous analysis of ACE inhibitors in tablet formulations. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*, 4(2), 103-110.