

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( YÜKSEK LİSANS TEZİ )**

**DİFENHİDRAMİN VE LİDOKAİNİN GAZ  
KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ  
YÖNTEMİ İLE FARMASÖTİK PREPARATLARDAN YAN  
YANA ANALİZİ**

**SEDA DEMİRCİ**

**DANIŞMAN  
PROF.DR.ARMAĞAN ÖNAL**

**ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA PROGRAMI**




**İSTANBUL-2016**

## TEZ ONAYI

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya A.D Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programında Seda Demirci tarafından hazırlanan Difenhidramin ve Lidokainin Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometrisi Yöntemi ile Farmasötik Preparatlardan Yan Yana Analizi başlıklı Yüksek Lisans tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

06 / 01 / 2016

### Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof.Dr. Serap Sağlık Aslan İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.D.	
2.Prof.Dr. Armağan Önal (Danışman) İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.D	
3.Doç.Dr. Evrim Kepekçi Tekkeli Bezm-i Alem V.Ü. Ecz. Fak. Analitik Kimya A.D.	
4.	
5.	

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

SEDA DEMİRCİ(İmza)



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum



## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılmasına olanak sağlayan, desteğini hiç esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Serap Sağlık Aslan'a

Çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, samimiyeti ile yanımda olan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Armağan Önal'a

Çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen anabilim dalımız öğretim üyesi Doç. Dr. Olcay Sağırlı'ya

Desteklerini ve yardımlarını esirgemeyen aileme, arkadaşlarıma

Anabilim Dalımız Öğretim Üyelerine ve araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45648

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	2
2.1. Difenhidramin Hidroklorür .....	2
2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	2
2.1.2. Farmakolojisi .....	4
2.1.3. Analiz Yöntemleri.....	6
2.1.3.1. Spektroskopik Yöntemler ile Analizleri.....	6
2.1.3.2. Kromatografik Yöntemler ile Analizleri .....	8
2.1.3.3. Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Analizleri.....	12
2.1.3.4. Elektrometrik Yöntemler ile Analizleri .....	13
2.2. Lidokain Hidroklorür .....	14
2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	14
2.2.2. Farmakolojisi .....	16
2.2.3. Analiz Yöntemleri.....	17
2.2.3.1. Spektroskopik Yöntemler ile Analizleri.....	17
2.2.3.2. Kromatografik Yöntemler ile Analizleri .....	18
2.2.3.3. Kapiler Elektroferez Yöntemi ile Analizleri.....	25
2.2.3.4. Elektrometrik Yöntemler ile Analizleri .....	26
2.2.3.5. Difenhidramin ve Lidokainin Biyolojik Materyellerde Yan Yana Analizleri .....	26

3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	28
3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, çözücüler ve çözeltiler .....	28
3.1.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler .....	28
3.1.2. Çözeltiler.....	28
3.1.2.1. Difenhidramin Hidroklorür Stok Çözeltisi.....	28
3.1.2.2. Lidokain Hidroklorür Stok Çözeltisi.....	28
3.2. Aletler ve diğer gereçler.....	28
3.3. Difenhidramin Hidroklorür ve Lidokain Hidroklorürün Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi ile Yan Yana Analizi .....	29
3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	30
3.4. GC-MS yönteminin validasyonu .....	30
3.4.1. Yöntemin seçiciliği .....	30
3.4.2. Tayin ve Gözlenebilme Sınırı .....	30
3.4.3. Doğrusallık.....	31
3.4.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik .....	31
3.4.5. Çözelti Stabilitesi .....	31
3.4.6. Doğruluk .....	31
3.5. Farmasötik Preparatlarda Difenhidramin Hidroklorürün ve Lidokain Hidroklorürün Analizi.....	31
3.5.1. Losyon Stok Çözeltisinin Hazırlanması.....	31
3.5.2. Geliştirilen GC-MS yöntemi ile Analiz .....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Difenhidramin Hidroklorür ile Lidokain Hidroklorürün Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Yan Yana Analiz Sonuçları .....	33
4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi.....	33
4.2. Yöntem Validasyonu .....	35
4.2.1. Seçicilik.....	35
4.2.2. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD).....	35
4.2.3. Doğrusallık.....	35
4.2.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik .....	39
4.2.5. Çözelti Stabilitesi .....	39
4.2.6. Doğruluk .....	40

4.3. Farmasötik Preparatlarda Difenhidramin Hidroklorürün ve Lidokain Hidroklorürün Analizi.....	41
4.3.1. Geliştirilen GC-MS Yönteminin Losyon Formülasyonuna Uygulanması.....	41
5. TARTIŞMA.....	44
KAYNAKLAR.....	46
ÖZGEÇMİŞ.....	63





**TABLULAR LİSTESİ**

Tablo 2-1: Difenhidramin Hidroklorürün İnfrared bant kaymaları .....	4
Tablo 2-2: Lidokain Hidroklorürün İnfrared bant kaymaları .....	15
Tablo 4-1: Difenhidramin Hidroklorürün 0,5–3,5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri.....	36
Tablo 4-2: Tablo 4.1'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler .....	37
Tablo 4-3: Lidokain Hidroklorürün 0,75–5,25 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler.....	38
Tablo 4-4: Tablo 4.3'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler .....	38
Tablo 4-5: Aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği....	39
Tablo 4-6: Oda sıcaklığında, otomatik numune örnekleyicisi ve buzdolabında bekletilen DFN ve LDN standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları.....	40
Tablo 4-7: Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi .....	41
Tablo 4-8: 120g preparatta 2g difenhidramin hidroklorür ve 3g lidokain hidroklorür içeren formülasyonun geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları.....	43

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Difenhidramin Hidroklorürün Molekül Formülü.....	2
Şekil 2-2: Difenhidramin Hidroklorürün 12µg/mL konsantrasyonda metanolde hazırlanmış çözeltisinin 200-400 nm aralığındaki UV spektrumu .....	3
Şekil 2-3: Difenhidramin Hidroklorürün İnfrared Spektrumu.....	3
Şekil 2-4: Lidokain hidroklorürün molekül formülü .....	14
Şekil 2-5: Lidokain Hidroklorürün 18µg/mL konsantrasyonda metanolde hazırlanmış çözeltisinin 200-400 nm aralığındaki UV spektrumu .....	14
Şekil 2-6: Lidokain Hidroklorürün İnfrared Spektrumu.....	15
Şekil 4-1: 2µg/mL difenhidramin (1) ve 3µg/mL lidokaine (2) ait kromatogram (difenhidramin m/z: 58 <sup>+</sup> ,73 <sup>+</sup> ; lidokain m/z:58 <sup>+</sup> ,86 <sup>+</sup> , TIC:toplam iyon kromatogramı...)	34
Şekil 4-2: Difenhidraminin Hidroklorür kütle spektrumu .....	34
Şekil 4-3: Lidokainin Hidroklorür kütle spektrumu .....	34
Şekil 4-4: Metanol çözücüsüne ait kromatogram (difenhidramin m/z: 58 <sup>+</sup> , 73 <sup>+</sup> ; lidokain m/z:58 <sup>+</sup> , 86 <sup>+</sup> , TIC:toplam iyon kromatogramı).....	35
Şekil 4-5: Difenhidraminin 0.5-3.5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi.....	36
Şekil 4-6: Lidokainin 0,75–5,25 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi .....	37
Şekil 4-7: 120g preparatta 2g difenhidramin hidroklorür (1) ve 3g lidokain hidroklorür (2) içeren formülasyonun analizine ait kromatogram (difenhidramin m/z: 58 <sup>+</sup> , 73 <sup>+</sup> ; lidokain m/z:58 <sup>+</sup> , 86 <sup>+</sup> , TIC:toplam iyon kromatogramı) .....	42

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

DFN: Difenhidramin

LDN: Lidokain

GC-MS: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi

HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi

UV: Ultraviyole

LOD : Gözlenebilme Sınırı

LOQ: Tayin sınırı

FT-IR: Fourier Dönüslümlü İnfıred

HPLC/MS : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografı/Kütle Spektrometri

CZE: Kapiler Zon Elektrofırez

ICH: Uluslararası Harmonizasyon Konferansı

MeOH: Metanol

MeCN: Asetonitril

HPLC-DAD: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Diyot Serili Dedektörü

I.D. : İç yarıçap

HPLC-MS/MS: Tandem Kütle Spektrometrik Sıvı Kromatografisi

DAD: Diyot serili dedektör

HILIC: Hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi

NACE: Susuz kapiler elektrofırez

SDS: Sodyum dodesil sülfat

RRS: Rezonans Rayleigh Saçılması

SD: Standart Sapma

RSD: Bağlı Standart Sapma

CTAB: Setil trimetil amonyum bromür



## ÖZET

Demirci, S. (2016). Difenhidramin Ve Lidokainin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Yöntemi İle Farmasötik Preparatlardan Yan Yana Analizi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu tez çalışmasında , difenhidramin ve lidokainin farmasötik preparatlardan yan yana analizi için basit ve seçici yeni bir GC-MS yöntemi geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde TRB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm) kapiler GC kolunda, sabit ısı kullanılmasıyla iki ilaç maddesinin birbirinden ayrılması sağlanmıştır. Analizlerde hem SIM (seçilmiş iyon izleme) hem de TIC (toplam iyon kromatogramı) modları kullanılarak maddeler takip edilmiştir. Takip edilecek referans iyonlar (m/z); bağıl bolluğu en fazla olacak şekilde DFN için 73,58 ; LDN için 86,58 olarak seçilmiştir. Maddelerin doğrusallık aralığı DFN için 0,5-3 µg/mL ; LDN için 0,75-5,25 µg/mL olarak bulunmuştur. Gözlenebilme ve tayin sınırları DFN için 0,012 ve 0,039 µg/mL ; LDN için 0,017 ve 0,056 µg/mL'dir. Geliştirilen bu yöntem iki ilaç maddesini içeren farmasötik preparata uygulandı.

Anahtar Kelimeler: Difenhidramin, Lidokain, Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi, Validasyon, Farmasötik preparat.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 45648

## ABSTRACT

Demirci, S. (2016). Simultaneous Determination of Diphenhydramine and Lidocaine in Pharmaceutical Formulations by Gas Chromatography-Mass Spectrometry Method. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry. Master Thesis. İstanbul.

In this study, a new simple and selective GC-MS method has been developed and validated for the simultaneous determination of diphenhydramine and lidocaine in pharmaceutical preparations. For the chromatographic separation, TRB-5 MS capillary GC column (30mx0,25mmx0,25µm i.d.) with a constant heat were used in this procedure. In the analysis, both SIM and TIC modes were used for the following of reference ions of the drugs. As reference ions 58,73 were selected for diphenhydramine and 86,58 were selected for lidocaine. The linearity ranges were found between 0,5-3µg/mL for diphenhydramine and 0,75-5,25µg/mL for lidocaine. The limits of detection and quantification were found as 0,012 and 0,039µg/mL for diphenhydramine and 0,017-0,056µg/mL for lidocaine. The developed method was successfully applied to the pharmaceutical preparations.

**Key Words:** Diphenhydramine, Lidocaine, Gas Chromatography-Mass Spectrometry, Validation, Pharmaceutical preparation.

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 45648

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

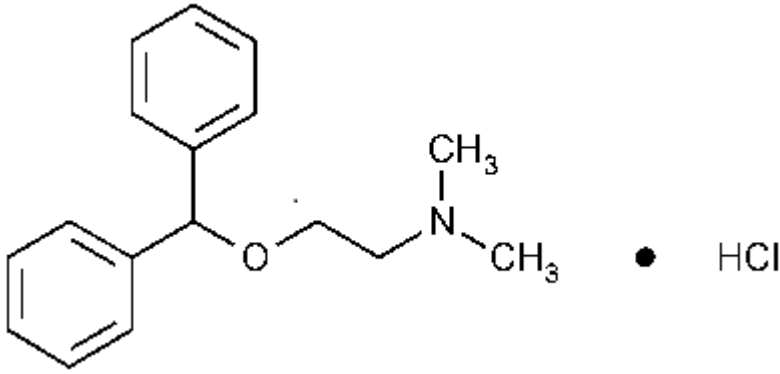
Alerji bağışıklık sisteminin doğada bulunan zararsız bir maddeye reaksiyon göstermesiyle oluşur. Bu tür reaksiyonlara sebep olan maddelere alerjen denir. Alerji tedavisi; bilinen alerjenlerden kaçınmayı, bağışıklık sistemini genel olarak modifiye eden steroidleri, semptomları azaltan antihistaminikler ve dekonjestanlar gibi ilaçları içerir [1]. Antihistaminik terimi genel olarak  $H_1$  reseptör antagonistleri ve  $H_1$  antihistaminikleri olarak da bilinen  $H_1$  antagonistlerini ifade eder [2]. Çalışmamızın temelini oluşturan difenhidramin; birinci kuşak antihistaminiklerden biridir ve yeni nesil antihistaminik ilaçlara oranla daha kuvvetli bir etkiye sahiptir [3-5]. Lidokain ise kuvvetli bir lokal anestezi ve antiaritmiktir. Yanma, kaşıntı ve deri iltihaplarından kaynaklanan acıyı rahatlatmak için kullanılır [6]. Analizi yapılacak formülasyon difenhidramin ve lidokain kombinasyonunu içermektedir.

Biz bu çalışmamızda alerji tedavisinde kombine olarak kullanılan difenhidramin ve lidokainin yan yana analizleri için bir çalışma yapmayı amaçladık. Bu iki maddenin analizleri incelendiğinde iki ilaç maddesinin losyon formülasyonunda yan yana tayinine rastlanmamıştır. Bu yüksek lisans tezinde iki ilaç maddesinin farmasötik preparatlardan yan yana analizi için basit, seçici ve hassas bir Gaz kromatografisi- kütle spektrometrik (GC-MS) yöntem geliştirilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Difenhidramin Hidroklorür

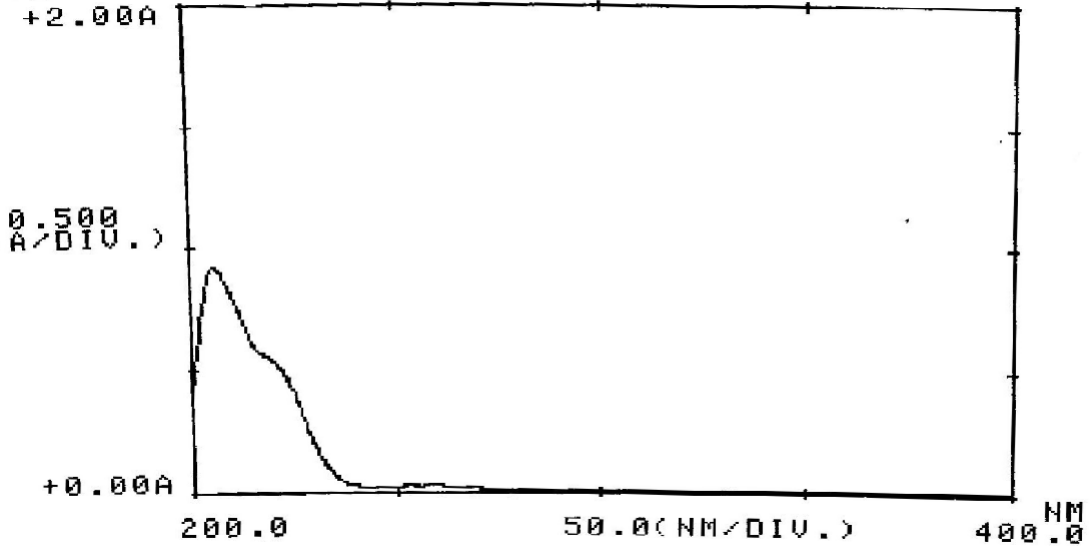
#### 2.1.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



**Şekil 2-1: Difenhidramin Hidroklorürün Molekül Formülü**

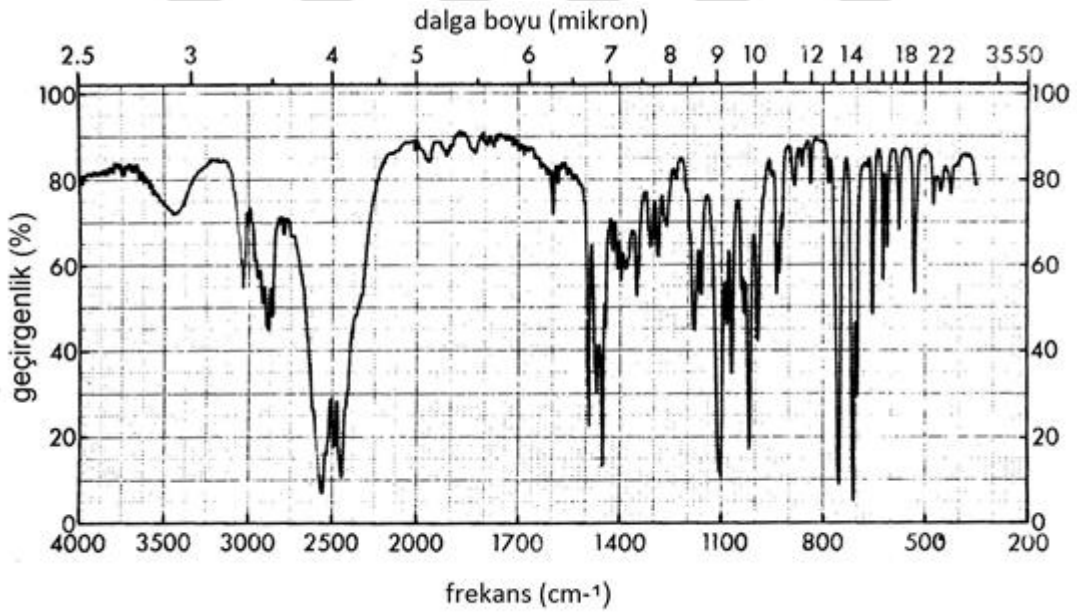
Difenhidramin hidroklorürün (DFN); kimyasal adı 2-(difenilmetoksi)-N,N-dimetiletanamin hidroklorür olup kapalı formülü  $C_{17}H_{21}NO.HCl$ 'dir. Molekül ağırlığı, 291.816g/mol'dür [7]. Beyaz, kokusuz kristal yapıda tozdur. Suda çok alkolde de serbestçe çözünür. Erime sıcaklığı 168-172°C arasındadır [8]. Biyoyararlanımı %40-%60 arasındadır ve plazmadaki konsantrasyonu uygulamadan 2-3 saat sonra en yüksek seviyesine ulaşır [9]. Yarılanma ömrü çocuklarda 8 saat, yetişkinlerde 9-12 saat, daha yaşlılarda 17 saattir [10]. Maddenin 200-400nm dalga boyu aralığındaki UV spektrumu şekil 2-2'de gösterilmiştir.





**Şekil 2-2: Difenhidramin Hidroklorürün 12µg/mL konsantrasyonda metanolde hazırlanmış çözeltisinin 200-400 nm aralığındaki UV spektrumu**

Difenhidramin hidroklorürün infrared (IR) spektrumu Şekil 2-3'te gösterilmiştir [11].



**Şekil 2-3: Difenhidramin Hidroklorürün İnfrared Spektrumu**

Difenhidramin hidroklorürün infrared bant kaymaları Tablo 2-1'de gösterilmiştir [11].

**Tablo 2-1: Difenhidramin Hidroklorürün İnfrared bant kaymaları**

Frekans aralığı (cm <sup>-1</sup> )	Grup
3000-3100	Aromatik CH gerilmesi
2400-2700	-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .HCl
1600,1587,1498,1460	Aromatik halka titreşimleri
1472	CH <sub>2</sub> bükülmesi
1384	CH <sub>3</sub> bükülmesi
1119	C-O-C gerilmesi
717,760	C-H (mono sübstitüe fenil)

### 2.1.2. Farmakolojisi

Histamin, bazı alerjik belirtilerde, gastrik salgılamada ve uyanıklığın düzenlenmesinde rol oynayan endojen bir mediyatördür. Doğada bazı bitkilerde (Ergol alkaloidleri, Claviceps purpurea, ısırgan otu vb.) yaygın olarak bulunan histamin, insan organizmasında da çok sayıda dokuda (cilt, karaciğer, akciğer, sindirim kanalı, bazofilik lökositler, hipotalamus vb.) lokal hormon ya da ortakoid madde olarak rol oynar.

Histamin ( $\beta$ -imidazol etilamin), 1907 yılında Dale tarafında sentez edilmiştir. Histamin L-histidin dekarboksilaz enzimi aracılığı ile L-histidin'den elde edilir. Lokal iritan maddeler bu enzimi aktive ederler. L-histidin dekarboksilaz enzimi çok sayıda bakteride de bulunmaktadır. Histamin oksidatif dezaminasyon ve metilasyonla degradasyona uğrar. Histaminin imidazol halkası üzerindeki bazı değişiklikler, bileşimin H1 ve H2 selektivitesini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Histaminin organizmada depolandığı başlıca yer mast hücreleridir.

H1 antihistaminikler, düşük konsantrasyonda H1 reseptörlerinde histaminin etkilerini, özellikle vazodilatör ve ödemlere neden olan kapiler geçirgenlik artışını reversibl ve kompetitif bir şekilde bloke eden ilaçlardır. Bu ilaçlar selektif olarak H1 reseptörlerini bloke ederler ve yüksek dozlarda uyarılabilir hücreleri deprese ederek lokal anestezi trankilizan tipi sedasyon ve antropinik etkiler oluşturabilirler. Tüm H1 antihistaminikler sindirim kanalından iyi absorbe olurlar ve etkileri 1 saat kadar sonra ortaya çıkar ve 6 saat kadar devam eder. Klasik antihistaminikler kimsayasal yapılarına göre başlıca altı gruba ayrılırlar. Etanolamin türevleri, etilendiamin türevleri, akrilalkilamin türevleri, piperazin türevleri, fenotiazinler ve piperidin türevleri olarak sınıflandırılırlar [12].

Difenhidramin; alerjik semptomları, kaşıntı,uykusuzluk, soğuk algınlığı, yol tutması ve ekstrapiramidal semptomları da içeren çok sayıdaki durumun tedavisinde kullanılan birinci kuşak bir antihistaminiktir [13,4] ve yeni jenerasyon antihistaminiklerden önemli ölçüde kuvvetlidir [5]. Etanolamin sınıfı antihistaminiklerden biri olan difenhidramin, histamin (H1) reseptörünün ters antagonistidir. Histaminin etkisini terse çevirerek alerjik semptomların şiddetini azaltır [14].

Klinik olarak H1 antagonistleri genellikle alerjik reaksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Sedatif etki ise genel bir yan etkisidir ve difenhidramin veya doksilamin gibi H1 antagonistleri uykusuzluk tedavisinde de kullanılır. Difenhidramin aynı zamanda, lokal anestezi etkisine sebep olan hücre içi sodyum kanal bloklayıcısı gibi davranır [15].

Distoni sık sık tekrarlanan hareketlere ve anormal postürlere sebep olan, sürekli kas kasılmalarıyla tanımlanan istenmeyen bir hareket bozukluğudur [16]. Difenhidramin akut distoni reaksiyonlarının tedavisinde standart bir terapi olarak düşünülmüştür ve diğer distoni tedavilerinde de çoklu terapinin bir parçası olarak kullanılmaktadır [17,18]. Difenhidraminin antihistamin gibi hareket ettiği bilinmesine rağmen, ilacın distoniyi hafifletme becerisi histamin üzerindeki etkisine bağlanmamıştır. Difenhidramin zayıf antikolinergik ve sedatif özelliklere sahiptir [19] ve genel olarak bu mekanizmaların ilacın antidistonik ile ilişkili olduğu farzedilmektedir. Ancak kesin mekanizma hala net değildir çünkü ilacın bazı vakalarda idiyopatik distoni tedavisinde başarıyla kullanılmasına rağmen daha kuvvetli ve spesifik antikolinergikler ve sedatifler limitli başarıya ulaşmıştır [20].

### 2.1.3. Analiz Yöntemleri

#### 2.1.3.1. Spektroskopik Yöntemler ile Analizleri

Khalil DFN'nin tayininde, atomik emisyon spektrometresine dayanan bir yöntem geliştirmiştir. Bu çalışmada konsantrasyon aralığı 2,72-75,85 µg/mL olarak belirlenmiştir [21].

El Ries ve arkadaşları DFN in aralarında bulunduğu ilaç maddelerinin farmasötik preparatlardan analizinde atomik absorpsiyon spektrometresi yöntemi geliştirmişlerdir. Tetra iyodo merkürat(II) ile ilaç maddelerinin çöktürülmesi işlemine dayalı bu yöntemde DFN için optimum konsantrasyon aralığı 5,6-58 µg/ml olarak bulunmuştur [22].

Yu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada DFN HCl tayini için akış enjeksiyonlu kemilüminesans yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde konsantrasyon aralığını 1.0-100 µg/mL olarak bulmuşlardır [23].

Zhao ve arkadaşları DFN nin bileşik farmasötiklerden tayini için akış enjeksiyonlu elektrokemilüminesans yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde kalibrasyon eğrisinin DFN nin 2.0-40.0 µg/L değerleri arasında lineer olduğu gözlenmiştir. Dedeksiyon limiti 1.2 µg/L olarak bulunmuştur [24].

Elshahat ve arkadaşları DFN HCL nin aralarında bulunduğu bazı alkaloidlerin farmasötik preparatlardan tayini için reineckate ile komplekslerini oluşturularak spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu kompleksler hazırlandıktan sonra nitrobenzen ile ekstre edilmiştir [25].

Basavaiah ve arkadaşları DFN HCl nin aralarında olduğu dört antihistaminik ilacın tayininde titrimetrik ve spektrofotometrik yöntemler geliştirmişlerdir. Titrimetrik yöntemde civa(II)nitrat ile klorürlerin tayininde difenilkarbazon-bromtimol mavisi indikatör olarak kullanılmıştır. Spektrofotometrik yöntemde ise civa (II)-difenilkarbazon kompleksinin değişik miktarları ilaç maddelerine eklenmiş ve azalan absorbans değerleri ölçülmüştür [26].

Goicoechea ve arkadaşları difenhidraminin aralarında bulunduğu dört farklı maddenin nasal solüsyonlardan aynı anda tayini için kemometri ile spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir [27].

Tripparat ve arkadaşları DFN HCl in farmasötik preparatlardan analizi için akış enjeksiyonlu spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem ilaç maddesinin pH:3 te bromkrezol yeşili ile iyon çifti oluşturmasına dayanır [28].

Hassan ve arkadaşları difenhidraminin de aralarında bulunduğu bazı histamin H1-antagonistlerinin farmasötik preparatlardan tayininde iki hızlı, basit ve hassas spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntemde, molybdenum (V) tiyosiyanat ile ilacın iyon çifti kompleksi oluşturulmuş ekstraksiyon metilen klorürle yapılmış, oluşan turuncu-kırmızı renkli iyon çifti 470 nm'de kolorimetrik olarak tayin edilmiştir. İkinci yöntemde belirteç olarak alizarin kırmızısı S reaktifi kullanılmış, ekstraksiyon işlemi ise kloroform ile yapılmıştır. Absorbansları 425-426 nm'de ölçülmüştür. İlk yöntem için gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) 0,034 ve 0,113 µg/mL , ikinci yöntem için LOD ve LOQ 0,032-0,107 µg/mL bulunmuştur [29].

Ulu ve arkadaşları difenhidraminin şuruptan tayini için geliştirdikleri spektrofotometrik yöntemde 2,3-dikloro-5,6-disiyano-p-benzoquinon (DDQ) ile ilaç arasında yük transfer kompleksi oluşturmuşlardır. Oluşan koyu kırmızı renkli kompleksin absorbansı 460 nm'de ölçülmüştür. LOD ve LOQ 2,09 ve 6,27 µg/mL olarak bulunmuştur [30].

El-Didamony ve arkadaşları biyolojik sıvılarda ve farmasötik preparatlarda difenhidraminin tayini için iyon çifti oluşturarak spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, DFN ile patent mavisi, erikrom siyahı T, metil oranj, bromkrezol moru arasında iyon çifti oluşturulup dikolorometan ile ekstraksiyon yapılmış ve absorbansları sırayla 632, 514, 428 ve 414 nm'de ölçülmüştür [31].

Tabletlerden DFN nin içinde bulunduğu bir grup maddenin tayini için Sourı ve arkadaşlarının geliştirdiği hızlı türev spektrofotometrik yöntemde DFN 226 nm'de ölçülmüştür. Geliştirilen yöntemin DFN için 0.5-5 µg/mL aralığında doğrusal olduğu bulunmuştur [32].

Calatayud ve arkadaşları DFN'nin tayini için fluorometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde akış enjeksiyonu kullanılmıştır. Bu yöntemde DFN nin

sulu çözeltisi , seyreltik sülfirik asit içindeki Ce(IV) içeren taşıyıcı-reaktif akışa enjekte edilmiştir ve oluşan Ce(III) ün floresans yoğunlu izlenmiştir [33].

### 2.1.3.2. Kromatografik Yöntemler ile Analizleri

Muller ve arkadaşları ve DÍ Gregorio ve arkadaşları DFN'nin farmasötik preparatlarda tayini için yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (HPTLC) yöntemi ile analizini gerçekleştirmişlerdir [34,35].

Okamoto ve arkadaşlarının merhemden yaptığı çalışmada DFN'nin içinde bulunduğu yedi aktif maddenin yan yana analizi için hidrofobik etkileşim elektrokinetic kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmış, DFN için LOD ve LOQ değerleri 5ve 18 µg/mL olarak bulunmuştur [36].

Yoo ve arkadaşları biyolojik sıvılardan DFN'nin tayini için azot fosfor dedeksiyonlu kapiler gaz kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir [37].

Raj ve arkadaşları DFN ve psödoefedrinin gaz kromatografisi ile tayini için geliştirdikleri yöntemde %10 OV 1 kolon (2.5m, 2mm id) ve taşıyıcı gaz olarak azot gazını 30ml/dk akış hızıyla kullanmışlardır. DFN için LOD ve LOQ değerleri 0,4 ve 1,5 mg/mL, geri kazanım ise %98,19 olarak bulunmuştur [38].

Hasegawa ve arkadaşları on antihistaminik ilacın insan plazmasından tayini katı faz ekstraksiyonu ile birlikte GC-MS yöntemi kullanmışlardır. DFN'nin aralarında bulunduğu ilaç maddelerinin geri kazanımları %73,8-105, gözlenebilme sınırları 0,02-5,0 ng/mL olarak bulunmuştur [39].

Pujadas ve arkadaşları içinde DFN nin de bulunduğu bir grup psikoaktif ilaçların tayini için katı faz ekstraksiyonunu takip eden bir GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemde kromatografik ayırma için metilsilikon kapiler kolon kullanılmış, maddeler N-Metil-N-(trimetilsilil)trifloroasetamid ile türevlendirilmiş ve seçilmiş iyon izleme modunda izlenmiştir [40].

Foltz ve arkadaşları marketlerden alınmış yenilebilir balıklarda yaptıkları çalışmada antimikrobiyel ajanlarla birlikte DFN'nin aralarında bulunduğu antihistaminikleri tayin etmek için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS) yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırmalar, VF-5ms (30mx0,25 mm id) kapiler kolonda ve taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılarak 1,2mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir [41].

Barbas ve arkadaşları difenhidramin ile birlikte iki maddenin analizi için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve Ultraviyole (UV) dedeksiyona dayanarak yöntemde dalga boyu 229 nm olarak belirlenmiştir. Ayırmalar, C18 kolon (25x0.46cm) ve mobil faz olarak asetonitril-(0,01 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-triethylamin, pH:2,8) karışımı (22:78, h/h) kullanımıyla, 1mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Kolon fırın sıcaklığı 40°C'ye ayarlanmıştır [42].

Lau ve arkadaşlarının öksürük şuruplarında yaptıkları bir çalışmada, difenhidramin hidroklorürün de içinde bulunduğu sekiz aktif içeriğin analizini HPLC yöntemi ile konduktometrik dedektör kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntemde, ayırmalar CN kolonda (250x4.6mm), mobil faz olarak su (1mM HClO<sub>4</sub> içeren)-asetonitril-etanol (38:60:2) karışımı kullanılarak, 1mL/dk akış hızında kolon sıcaklığı 30°C olarak gerçekleştirilmiştir [43].

Dönmez ve arkadaşları şuruplarda yaptıkları çalışmada, difenhidramin hidroklorür ve üç farklı ilaç maddesinin analizinde diyet sıralı dedeksiyona (DAD) dayanan bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde mobil faz olarak su-asetonitril (60:40,h/h) karışımı ve C18 kolon (150x4.6mm) kullanılmıştır [44].

Ali ve arkadaşlarının soğuk algınlığı şuruplarında DFN ve diğer maddelerin yan yana tayini için geliştirdikleri yöntemde hidrofilik etkileşimli sıvı kromatografisi (HILIC) yöntemini kullanmışlardır. Analizler UV dedektörde DFN için 254 nm dalga boyunda tayin yapmışlardır. Geliştirilen yöntemde mobil faz olarak metanol-su (6.0g amonyum asetat ve 1 litrede 10 ml trietil amin içeren sulu çözelti, pH sı ortofosforik asit ile 5.2 ye ayarlanmış) (95:5,h/h) ve 1,2ml/dk akış hızı kullanılmıştır [45].

El-Gindy ve arkadaşları difenhidramin hidroklorürün aralarında bulunduğu altı ilaç maddesinin ve tayini için kemometri yardımlı HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde UV dedeksiyon ile 222 nm'de maksimum absorbans ölçülmüştür. Geliştirilen bu yöntemde C18 kolon, mobil faz 25mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (fosforik asit ile pH:3,2)-asetonitril (60:40,h/h), akış hızı ise 2mL/dk'dır [46].

Wang ve arkadaşları av köpeği plazmasında difenhidramin tayini ve validasyonu için yüksek performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrik (HPLC-TMS) yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C18 kolon (100x3.0,3.5µm),mobil faz olarak metanol-su-formik asit (65:35:0.5,h/h) karışımı kullanılmış, akış hızı 0,2 ml/dk , kolon sıcaklığı 30 °C ye ayarlanmıştır [47].

Gergov ve arkadaşları kan örneklerinde 18 antihistaminik ilacın yan yana görüntülenmesi ve tayini için HPLC-TMS yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde ilk ekstraksiyonla bazik antihistaminler ikinci ekstraksiyonlarla asidik antihistaminler ayrılmıştır. Bazik ilaçlarda geri kazanım % 43-113, asidik ilaçlarda %23-66 arasında bulunmuştur. Ayrılmalar ters faz C18 (100x2.1,4µm) kolonda asetonitril-amonyum asetat (pH:3,2) mobil fazı kullanılarak yapılmıştır [48].

Martinez-Algaba ve arkadaşları farmasötik preparatlardan antihistaminlerin tayininde miseller sıvı kromatografik yöntem kullanmışlardır. Bu yöntemde akış hızı 1mL/dk, durgun faz C18 (250x4.6,5µm)'dir. Organik mobil faz olarak 1-propanol veya 1-bütanol kullanılmış misel olarak setiltrimetil amonyum bromür (CTAB) kullanılmıştır. Ölçmeler 225 nm UV dedeksiyonla yapılmış, LOQ değeri 1µg/mL' nin altında bulunmuştur [49].

Tanaue ve arkadaşları organlardan ve dokulardan ilaç maddelerinin ve kişisel bakım ürünlerinin kalıntılarının analizi için HPLC-TMS yöntemi kullanmışlardır. Bu yöntemde C18 kolon (100x2.1,2.7µm), 0,25ml/dk akış hızı, 40°C kolon sıcaklığında, mobil faz olarak %0,1 lik sulu asetik asit çözeltisi (faz A) ve %0,1 lik asetik asit (metanol/asetonitril, 1:1,h/h) dereceli elusyonu kullanılmıştır. DFN için LOD değerleri; balık ve kuş örnekleri için 0,011-0,25 ng/g, LOQ değerleri ise 0,028-0,48 ng/g arasında bulunmuştur [50].

Mahato ve arkadaşlarının öksürük şuruplarında yaptıkları bir çalışmada klorfeniramin ve DFN nin yan yana tayini için iyon çifti ters faz HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde kromatografik ayrılma 254 nm UV dedeksiyonla, C18 kolonda 2mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir [51].

Selinger ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DFN in insan plazmasından tayini için 205 nm'de, C18 kolonda 1.8ml/dk akış hızı ve mobil faz olarak asetonitril ve sodyum fosfat monobazik karışımı kullanılmıştır [52].

Qi ve arkadaşlarının DFN ile dört aktif maddenin tayini için geliştirdikleri sıvı kromatografik yöntemde, CN kolon, mobil faz olarak 3mM iyon çifti çözeltisi , %2 lik sulu trietilamin çözeltisi ve 2M fosforik asit (68:48:88) (v:v) karışımının kullanımıyla



ayrılmalar gerçekleştirilmiştir. Maddeler 215 nm’de dedekte edilmiştir. Konsantrasyon aralığı 5,0-30,0 µg/mL olarak bulunmuştur [53].

Kumar ve arkadaşları DFN ile diğer maddelerin koyun plazması ve idrar örneklerinden aynı anda tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada konsantrasyon aralığı 0,4-100,0 ng/mL ve 0,2-250,0 ng/mL olarak bulunmuştur [54].

Ye ve arkadaşları DFN içeren bir karışımdan yaptıkları tayin için geliştirdikleri HPLC yönteminde %0.9 sodyum klorür içindeki karışımın enjeksiyonunu yapmıştır. Yapılan bu çalışmada ayrılmalar ODS 1 kolon, mobil faz olarak pH 4.5 0.1M fosfat tamponu:asetonitril (60:40) karışımı 1.2mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir [55].

Park ve arkadaşları domuz eti, süt ve yumurtadan on farklı veteriner ilacının kalıntılarının analizinde DFN ile birlikte diğer maddelerin tayini için geliştirdikleri LC-MS yönteminde LOQ değerleri 0.5-10 ng/g olarak bulunmuştur [56].

Bayen ve arkadaşlarının doku örneklerinden farmasötik maddelerin tayini için geliştirdikleri LC-MS/MS yönteminde DFN için dedeksiyon limitleri <1.31ng/g olarak bulunmuştur [57].

Ge ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada DFN’nin ve ibuprofenin ağızda çözünebilen tabletlerden aynı anda tayininde HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, C18 kolonda, %0.2 trietilamin ve %0.2 glasiyel asetik asit içeren 0.05mol/L potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve MeCN (54:46,v:v) mobil fazının 1.0mL/dk akış hızı kullanılarak yapılmıştır. 263nm’de dedekte edilen maddelerden DFN için 7.5-120 µg/mL aralığının lineer olduğu bulunmuştur [58].

Ma ve arkadaşları tavşan plazmasından DFN’nin tayini için hassas ve seçici bir LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. MeCN ile proteinlerin çöktürülmesinden sonra kromatografik ayırma C18 kolonda , MeCN ile %0.1 lik formik asit içeren mobil fazının dereceli elusyonu ile yapılmıştır. Uygulama pozitif iyon modunda elektrospray iyonizasyon ve çoklu reaksiyon izleme modu kullanılarak yapılmıştır [59].

Waltersthompson ve arkadaşları tavşan tam kan örneklerinde DFN tayini için HPLC/GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmış ve UV absorbanı 258 nm de gözlenmiştir [60].

Yuan ve arkadaşları DFN in sıvı ve katı ilaçlardan tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C8 fazlı kolon ile MeCN:0.005M

heksansülfonik asit:asetik asit (70/30/1,v/v) mobil fazı kullanılmıştır. Yöntemin 200 µg/mL ye kadar doğrusal olduğu gözlenmiştir [61].

Concheiro ve arkadaşları oral sıvılardan yaptıkları DFN nin aralarında olduğu bazı ilaç maddelerinin tayini için LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin 1-5 µg/L ve 100-200 µg/L arasında lineer olduğu gözlenmiştir [62].

### 2.1.3.3. Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Analizleri

Dong ve arkadaşları soğuk algınlığı ilaçlarında yaptıkları çalışmada DFN ve diğer maddelerin tayini için basit ve hızlı bir susuz kapiler elektroforez (NACE) yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemde 25 kV voltaj altında, kapiler sıcaklığı 25°C olan silika dolgulı kapiler kolon (47cmx75µm i.d.) ve tampon olarak %10 asetonitril içeren 40mM amonyum asetat (h/h) kullanılmıştır. DFN için gözlenebilirlik sınırı 0,66 mg/L olarak bulunmuştur [63].

Nasal solüsyonlarda yapılan bir başka çalışmada ise Marchesini ve arkadaşları DFN , nafazolin ve fenilefrinin tayini için kapiller zon elektroforez (CZE) yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntemde 17,7 kV voltaj altında silika kapiler kolon (70cmx75µm i.d.) ve pH:3,72 olan fosfat tamponu kullanılmıştır. DFN için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 4,5 ve 14,9 mg/L olarak bulunmuştur [64].

Gomez ve arkadaşları şuruplardan yaptıkları tayin için CE yöntemini kullanmışlardır. Bu çalışma, fused silika kapiler ile sodyum dihidrojenfosfat (10mM,pH:5) tamponu kullanılarak, 25°C de, 30kV voltaj altında, UV dedektörle 214nm dalgaboyunda yapılmıştır. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 5,5 ve 18,30 µg/mL olarak bulunmuştur [65].

Liu ve arkadaşlarının tavşan plazma ve idrar örneklerinde geliştirdikleri tris (2,2'-bipiridil) rutenyum (II) kemilüminesans dedeksiyonlu kapiler elektroforez yönteminde LOD 5,3 ng/mL bulunmuştur [66].

Bir grup antihistaminik ilacın serum ve farmsötik preparatlardan tayininde Rambla-Alegre ve arkadaşları UV dedeksiyonlu kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntem fosfat tamponu (20mM, pH:2), 5kV voltaj altında, UV dedektörle 214 nm dalgaboyunda yapılmıştır. DFN için LOD ve LOQ değerleri 8 ve 27 ng/L olarak bulunmuştur [67].

Gomez ve arkadaşları soğuk algınlığı ve öksürük şuruplarında yaptıkları çalışmada basit ve hızlı bir kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntem fused silika kapiler 25°C sıcaklıkta, sodyum tetraborat (20mM,pH:8.5) tamponu, 205 ve 250 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. DFN için LOD ve LOQ değerleri  $0,71\pm0,09$  ve  $2,23\pm0,7$  µg/mL olarak bulunmuştur [68].

Li ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada köpek plazmasından alınan örneklerde DFN ve diğer bir maddenin tayini için sıvı-sıvı ekstraksiyonunu takip eden kapiler zone elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir [69].

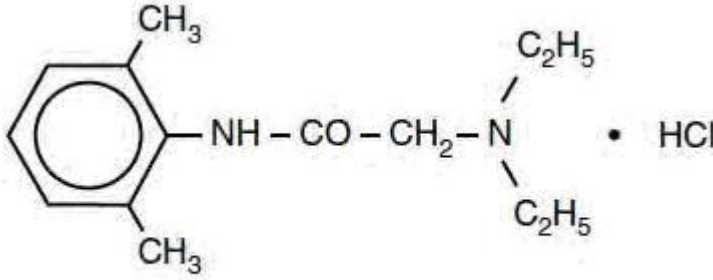
#### **2.1.3.4. Elektrometrik Yöntemler ile Analizleri**

Youssef ve arkadaşları DFN'nin aralarında bulunduğu bazı antihistaminiklerin farmasötik formülasyonlardan tayini için kondüktometrik bir yöntem geliştirmiştir. Yöntem maddelerin fosfotungestik, fosfomonolibdik ve silikomolibdik asit ile titrasyonlarına dayanmaktadır [70].

DFN'nin farmasötik preparatlardan ve biyolojik sıvılardan tayini için Frag ve arkadaşları potansiyometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde konsantrasyon aralığı  $1,0\times10^{-2}$ - $1,0\times10^{-6}$  mol/L, LOD ise  $9,7\times10^{-7}$ - $9,8\times10^{-7}$  mol/L olarak bulunmuştur [71].

## 2.2. Lidokain Hidroklorür

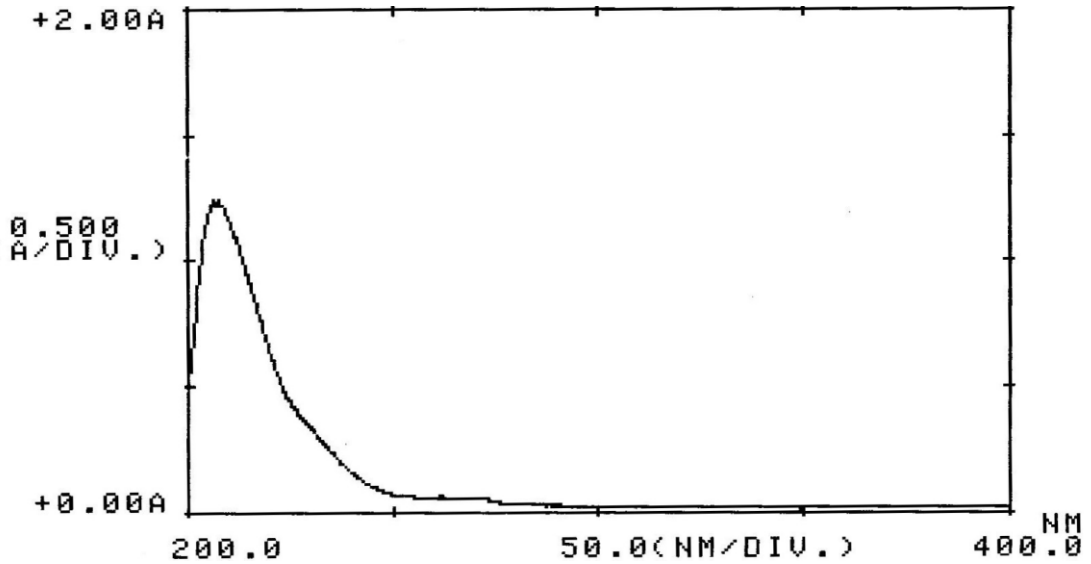
### 2.2.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2-4: Lidokain hidroklorürün molekül formülü

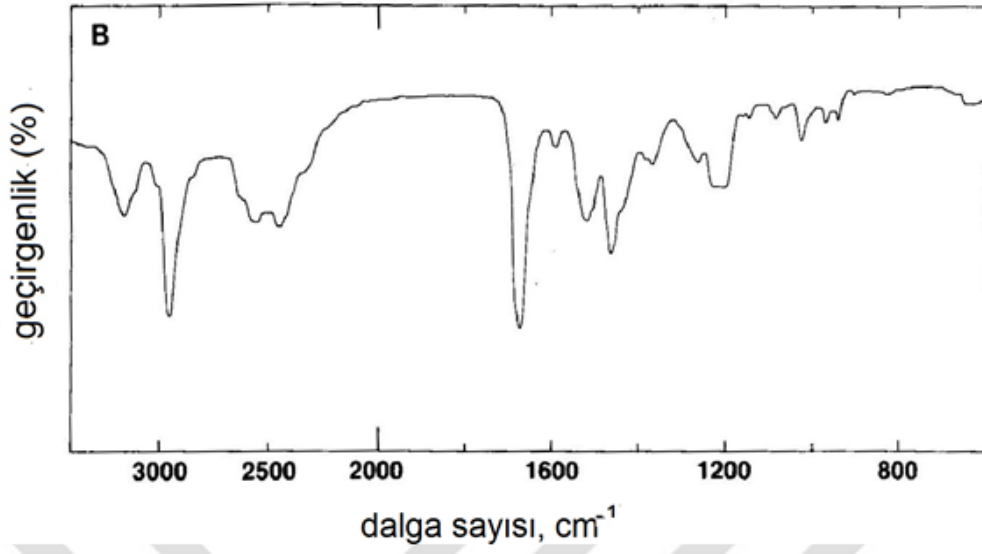
Lidokain hidroklorürün (LDN) kimyasal adı; 2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil) asetamid hidroklorür olup kapalı formülü  $C_{14}H_{23}ClN_2O.HCl$ 'dir. Molekül ağırlığı 270.79822g/mol'dür [72]. Beyaza yakın veya beyaz renkte, kristal toz şeklindedir. Suda iyi çözünür, etanolde serbestçe çözünür. Erime noktası 80-82 °C'dir [73].

Maddenin 200-400 nm dalga boyu aralığındaki UV spektrumu Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2-5: Lidokain Hidroklorürün 18µg/mL konsantrasyonda metanolde hazırlanmış çözeltilisinin 200-400 nm aralığındaki UV spektrumu

Lidokain hidroklorürün infrared spektrumu Şekil 2-7'de gösterilmiştir [11].



**Şekil 2-6: Lidokain Hidroklorürün İnfrared Spektrumu**

Lidokain hidroklorürün infrared bant kaymaları Tablo 2-2’de gösterilmiştir [11].

**Tablo 2-2: Lidokain Hidroklorürün İnfrared bant kaymaları**

Grup	Frekans aralığı (cm <sup>-1</sup> )
N-H gerilmesi	3180
C-H gerilmesi	2978
Amid I, C=O	1682
Amid II, C-N	1525
Parmak izi bölgesi	949,978

### 2.2.2. Farmakolojisi

Lidokain yaygın olarak kullanılan bir antiaritmik ve lokal anesteziiktir. Antiaritmik ilaç sınıflandırılmasında 1b grubunda yer alır. Parenteral yoldan etkin bir antiaritmik olarak aktivite gösterir ve yaşamı tehdit eden akut ventriküler aritmilere karşı ilk sıra ilaç durumundadır [74].

Lokal anesteziikler enjekte edildikleri sinir ya da sinirlerin iletimini bloke ederek bunların inervasyon alanı içine giren bölgede ağrıya karşı duyarlılığı azaltan ilaçlardır. Lokal anesteziikler  $\text{Na}^+$  iyonlarına membraner geçirgenliği azaltarak sinir liflerinde depolarizasyon ve aksonal iletiyi bloke ederler. Lokal anesteziikler sodyum kanallarının membranın dış yüzeyindeki intraselüler taraftaki iç girişi bloke ederler. Bu nedenle etkilerini oluşturmak için kesinlikle hücre içine girmiş olmaları gerekmektedir. Lokal anesteziiklerin aktivite gösterebilmeleri için hücre içine girmek zorunda olmaları, hücrelerin dış yüzüne uygulanan kuvaterner amonyum grubu içeren polar yapılı lokal anesteziiklerin membranları aşamayıp etkisiz kalmalarının nedenini de açıklamaktadır. Bu gibi ilaçlar hücre içine uygulandıklarında lokal anesteziik etkilerini göstermektedirler. Lokal anesteziikler membranları iyonize olmuş nötr şekilleriyle geçmek zorunda olduklarından  $\text{pK}'$ ları ve intraselüler ortamın  $\text{pH}'$ sı önemlidir.

Lokal anesteziikler iyonize şekilleriyle sodyum kanallarının iç yüzüne yerleşik bir reseptöre elektrostatik güçlerle bağlanarak bu kanalları bloke etmektedir. Bunu sonucu membrandan  $\text{K}^+$  iyonlarının geçişi değişmediği halde  $\text{Na}^+$  iyonlarının geçişi belirgin bir şekilde azalmaktadır. Lokal anesteziikler yukarıda özetlenen mekanizmalarla  $\text{Na}^+$ 'un hücre içine girişini bloke ederek sinir lifi hücrelerinde depolarizasyonu, dolayısıyla aksiyon potansiyeli oluşmasını engelleyerek hücrelerin impuls ileti yeteneğini ortadan kaldırmaktadırlar.

Lokal anesteziiklerin farmakokinetik özellikleri (özellikle hızla parçalanmış ester grubu) antiaritmik olarak da kullanılan lidokain dışında, tam olarak aydınlanmış değildir. Amid fonksiyonlu lokal anesteziiklerin (lidokain) metabolizasyonu daha karmaşıktır, daha yavaştır. Metabolizasyon genellikle karaciğerde ve bir amidaz enzimi aracılığı ile mikrozomların amid grubundan bir halka kopması şeklinde olur. Ester grubundan farklı olarak bu, ilaçların karaciğer fonksiyonundaki değişiklikler yarı ömürlerinde uzamaya neden olabilmektedir. Örneğin normal bir kişide lidokain'in 1.6

saat olan yarı ömrü karaciğer yetmezliği olan bir hastada 6 saate çıkabilmekteir [12]. Lidokain'in önemli bir farmakokinetik özelliği karaciğerden ilk geçişi sırasında fazla (%70) inaktive edilmesidir. Vücutta geniş bir sıvı hacmine dağılır. Etkisi kısa sürer [75].

Düşük dozlarda (lidokain, plazmada 2-5 $\mu$ g/mL) lokal anestezipler uyarılabilir sinir liflerinin sodyum kanallarını bloke ederek antiaritmik etki oluştururlar. Bu etki aritmojen odaklar olan depolarize liflerde yoğunlaşır. Normal liflerin elektrik aktivitelerini çok az değiştirirler. Bu durum depolarize liflerde ortaya çıkan ritim bozukluklarında (post infarktüs ya da dijital zehirlenmesi sonucu görülen ventriküler aritmiler) lidokain'in öncelikli etkisini ve normal olarak polarize dokulardan kaynaklanan aritmilerdeki etkisizliğini açıklamaktadır [12]. Lidokain dar spektrumlu bir antiaritmik ilaçtır. Akut myokard infarktüsünde ventriküler kaynaklı aritmiler önemli bir komplikasyondurlar ve ölüme neden olurlar. Bu hastalıkta lidokain infüzyonu ventriküler taşikardiyi baskılar ve ventrikül fibrilasyonu riskini azaltır; ancak ventrikül fibrilasyonunu önleme bakımından sınıf III ilaçlar kadar etkili olmamakla beraber lidokain ventriküler aritmilerde güvenli oluşu nedeniyle acil durumlarda ilk kullanılacak ilaç sayılır [75].

### **2.2.3. Analiz Yöntemleri**

#### **2.2.3.1. Spektroskopik Yöntemler ile Analizleri**

Nerin ve arkadaşları farmasötik preparatlardan lidokain tayini için atomik absorpsiyon spektrofotometresi yöntemi geliştirmişlerdir. bu yöntemde lidokain ve inorganik kompleks karışımı iyon çifti organik çözücüye eklenmiştir [76].

Saleh ve arkadaşları farmasötik preparatlardan lidokain tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde borik asit varlığında hematoksilin reaktifi ile oluşan kırmızımsı menekşe renk ölçülmüştür [77].

Yapılan başka bir çalışmada ise Nemcova ve arkadaşları lidokain tayini için akış enjeksiyon sistemli spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir [78].

Ivanov ve arkadaşları bazı lidokainin aralarında olduğu lokal anesteziplerin tayini için fotometrik ve renk ölçümüne dayalı bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde renklendirme ajanı olarak Alizarin kırmızısı S (ARS) kullanılmıştır. ARS ile lokal anesteziplerin setiltrimetilamonyum bromür ile iyon etkileşimlerinin spektrofotometrik ve kolorimetrik özellikleri incelenmiştir [79].

Ivanov ve arkadaşları lidokain ve başka bir lokal anestezi ilacın tayini için Alizarin kırmızısı C kullanarak spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir [80].

Penido ve arkadaşları kokainin içine karıştırılan lidokain ve diğer maddelerin tayini için Raman ve Fourier transform infrared spektroskopisini kullandıkları bir yöntem geliştirmişlerdir [81].

### **2.2.3.2. Kromatografik Yöntemler ile Analizleri**

Willis ve arkadaşları yaptıkları çalışmada azot- fosfor dedektörlü gaz-likit kromatografisi kullanarak lidocaine ve metabolitlerinin aynı anda tayinini gerçekleştirmişlerdir [82].

Kruczek yaptığı çalışmada lidokainin serum seviyelerinin tayini için azot-fosfor dedektörlü gaz-sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmiştir [83].

Arimoto ve arkadaşları insan serumundan lidokain tayini için silika kapiler kolonlu gaz kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemde hassas ve seçici yüzey iyonizasyon dedektörünü kullanmışlardır. Dedeksiyon limiti 30-50 ng/mL olarak bulunmuştur [84].

Hattori ve arkadaşları lidokain ve diğer lokal anesteziğin vücut sıvılarından tayini için yüzey iyonizasyon dedeksiyonu ile gaz kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Dedeksiyon limiti lidokain için 5-10 pg aralığında bulunmuştur. 1mL tam kandaki geri kazanım ise %100'e yakın bulunmuştur [85].

Lozec ve arkadaşları lidokain ve diğer maddelerin serumdan yan yana tayini için geliştirdikleri yöntemde azot-fosfor dedektör eşliğinde gaz-sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. En düşük dedeksiyon limiti 15ng/mL'dir [86].

Grouls ve arkadaşları lidokain ve diğer maddenin plazma örneklerinden tayini için kapiler gaz-kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. geliştirilen Yöntemde azot seçici dedeksiyon kullanılmıştır [87].

Demedts ve arkadaşları lidokain ile birlikte başka bir maddenin kendilerini ve metabolitlerinin aynı anda tayini için azot-fosfor dedektörlü gaz kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir [88].

Laroche ve arkadaşları lidokain ve metabolitinin plazmadan tayini için gaz kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde katı faz ekstraksiyonu



kullanılmış ve splitless modda çalışılmıştır. Geliştirdikleri yöntemde kapiler kolon ve azot-fosfor dedektör kullanılmış ve LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 1 ng/mL ve 2.5 ng/mL olarak bulunmuştur [89].

Liu ve arkadaşları lidokainin ölüm sonrası sıvılardan ve dokulardan aldıkları örneklerden tayini için GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir [90].

Koster ve arkadaşları insan idrarından yaptıkları çalışmada lidokain tayini için katı faz mikroekstraksiyonu sonrası gaz-sıvı kromatografisi kullanmışlardır. Çalışmanın, SPME-GC ve SPME-LC için sırasıyla 5-1000ng/mL ve 25-1000ng/mL aralıklarında lineer olduğu gözlenmiştir. Dedeksiyon limitleri SPME-GC için 5ng/mL, SPME-LC için 25ng/mL olarak bulunmuştur [91].

Koster ve arkadaşları plazmadan lidokain tayini için gaz kromatografisiyle birleştirilmiş katı faz mikroekstraksiyonu yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmanın 25-2000ng/mL aralığında lineer olduğu bulunmuştur. LOD 5 ng/mL'dir [92].

Ohshima ve arkadaşları lidokaininde aralarında olduğu lokal anesteziğin insan plasmasından ve idrarından tayini için katı faz ekstraksiyonu sonrası GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde lidokain için LOQ değeri 50 ng/mL bulunmuştur [93].

Van Hout ve arkadaşları lidokain ve diğer ilaç maddesinin idrardan tayini için katı faz ekstraksiyonu- termal desorpsiyon- gaz kromatografisi ve kütle seçici dedektör kullandıkları bir yöntem geliştirmişlerdir. Kütle seçici dedektörde seçilmiş iyon izleme moduyla lidokain için 0.5ng/mL dedeksiyon limiti gözlenmiştir [94].

Yamini ve arkadaşları insan idrarından lidokain ve diğer maddelerin analizi için sıvı faz mikroekstraksiyonu ve GC-MS yöntemi geliştirmişlerdir. Kalibrasyon eğrisinin 1-500g/L değerleri arasında lineer olduğu gözlenmiştir [95].

Smith lidokain HCl ve diğer maddelerin USP lidokain enjeksiyonundan tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntemde durgun faz olarak oktilsilan (RP-8) hareketli faz olarak D-10-Kamforsülfonik asit/ metanol/ asetik asit/ su karışımı kullanmışlardır. Lidokain dedeksiyonu 254nm'de yapılmıştır [96].

Kabra ve arkadaşları lidokainin aralarında bulunduğu antidisritmik ilaçların serumdan tayini için UV ve floresans dedektörün kullanıldığı sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Durgun faz olarak oktil bağlı ters faz kolon, mobil faz olarak MeCN/fosfat tamponu karışımı kullanılmıştır [97].

Flood ve arkadaşları lidokainle birlikte 3 antiaritmik ilacın alkali yapılmış serumdan tayini için sıvı-kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde maddeler diklorometan ile ekstrakte edilmiştir. Geliştirilen bu yöntemde C18 kolon ve mobil faz olarak 30mmol/L fosfat tamponu ve MeCN karışımı (72:28, v:v) kullanılmıştır [98].

Verbesselt ve arkadaşları 12 antiaritmik ilacın plazmadan tayini için geliştirdikleri HPLC yönteminde katı faz kolon ekstraksiyonu kullanmışlardır. Bu çalışmada heksil kolon (150x4.6mmI.D.), mobil faz olarak MeCN ve MeOH fosfat ve asetat tamponlarıyla değişik pH'larda kullanılmıştır [99].

Luzzi ve arkadaşları köpek plazma ve kalp kasından alınan örneklerde lidokain ve metabolitinin aynı anda tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir [100].

Halbert ve arkadaşları lidokain ve aktif metabolitlerinin serumdan tayini için elektrokimyasal dedeksiyonlu sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir [101].

Smith ve arkadaşları lidokain enjeksiyonundan lidokain tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C18 kolon ve mobil faz olarak MeCN ile fosfat tamponu karışımı kullanılmıştır. Yöntem 5-12.5 µg aralığında çalışılmıştır [102].

Sattler ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada lidokainin plazmadan tayini için HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde alkalilendirilmiş plazmadan dietil eterle ekstraksiyon yapılarak hazırlanan örnekler, seyreltilmiş sülfirik asitle tekrar ekstre edilmiştir [103].

Kleine ve arkadaşları plasmadan lidokain ve diğer maddelerin yan yana tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir, Geliştirilen yöntemde 200 µL plasma örnekleri ile çalışılmış, maddeler plazmadan alkali ortamda dietil eter ile ekstre edilmiştir. Gözlenebilme sınırı 4ng/mL olarak bulunmuştur [104].

Tebbett ve arkadaşlarının geliştirdikleri yöntemde at idrarından alınan örneklerden lidokain ve metabolitlerinin tayinini yapmışlardır. Bu yöntemde kolon değiştirme tekniğiyle HPLC yöntemi kullanılmıştır [105].

Escuder-Gilabert ve arkadaşları lidokain ile birlikte altı lokal anestezi maddenin tayini için spektrofotometrik dedeksiyonlu misellar sıvı kromatografisi yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılma pH 3'te %10 1-propanol + 0.15M sodyum dodesil

(SDS) sülfat içeren çözücü kullanılarak, C18 kolonda 230nm'de gerçekleştirilmiştir [106].

Lidokain HCl ve diğer maddenin enjeksiyon formlarından tayini için geliştirdikleri yöntemde Parissi-Poulou ve arkadaşları katı faz ekstraksiyonu sonrası kullanılan bir ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde C18 kolon, mobil faz olarak MeCN:0.2M amonyum asetat (30:70, v/v) kullanmışlardır. Ayrılma 1.2mL/dk akış hızında ve dedeksiyon 254 nm'de gerçekleştirilmiştir. Gözlenebilme sınırı 0.96 µg/mL olarak bulunmuştur [107].

Lotfi ve arkadaşları lidokain ve diğer bir maddenin insan plazmasından aynı anda tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmanın 10-2000 µg/L aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir [108].

Barat ve arkadaşları lidokain ve diğer maddelerin tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde durgun faz olarak C18 kolon ve mobil faz olarak pH 6 fosfat tamponu, MeCN ve MeOH karışımı kullanılmıştır. Lidokain için gözlenebilme sınırı 5ng/mL olarak bulunmuştur [109].

Kakiuchi ve arkadaşları plazmadan serbest lidokain ve metabolitlerinin tayini için basit ve seçici bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C18 kolon ve UV dedektör kullanmışlardır. Geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisinin 25-1000ng/mL aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir. Geri kazanım, lidokain ve diğer maddeler için %73.2-%89.1 arasında bulunmuştur [110].

Liawruangrath ve arkadaşları lidokainin analizi için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışma, C18 kolonda, %5.5 trietilamin içeren su ve MeCN (30:70, v/v) karışımı içeren mobil fazda 0.7mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen yöntemin 10-500 µg/mL aralığında doğrusal olduğu gözlenmiştir. Lidokain için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 100ng/20µL ve 250ng/20µL olarak bulunmuştur [111].

Abdel-Rehim ve arkadaşları lidokain ve metabolitlerinin insan plazma ve idrarından tayini için HPLC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. İdrar örnekleri için katı faz ekstraksiyonu kullanılmıştır [112].

Kang ve arkadaşları idrardan lidokain tayini için sıvı faz mikroekstraksiyonlu HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntemin 0.2-5 mg/mL aralığında lineer olduğu bulunmuştur. Dedeksiyon limiti 0.1 mg/mL'dir [113].

Piwowarska ve arkadaşları lidokain ve metabolitinin insan serumundan tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Serumdan lidokain ve metabolitinin ekstraksiyonu için diklorometan kullanılmıştır. Mobil faz olarak pH 3'e ayarlanmış 15mM potasyum dihidrojen fosfat ile %12 MeCN karışımı kullanılmıştır. Dedeksiyon UV dedektörle 205 nm'de yapılmıştır. Lidokain için en düşük dedeksiyon limiti 200 µg/L bulunmuştur [114].

Youngvises ve arkadaşları lidokain ve diğer bir maddenin çeşitli farmasötik preparatlardan aynı anda tayini için micellar sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C18 (12.5mmx4.6mm,5µm) kolon, diyot serili dedektör, sodyum dodesil sülfat (SDS) ve izopropanol kullanılmıştır. Dedeksiyon 210nm'de gerçekleştirilmiştir. Lidokain için kalibrasyon eğrisi aralığı 0.125-500µg/mL ve LOD 0.73ng/20µL olarak bulunmuştur. Geri kazanımı %98-103 olarak bulunmuştur [115].

Maes ve arkadaşları lidokain ve metabolitlerinin köpek ve at plasmasından tayini için HPLC-elektrospray iyonizasyon kütle spektrometresi yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde örnek hazırlama için sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılmış, Kromatografik ayırma C18 kolon ve 0.01M amonyum asetat ve MeCN mobil fazıyla gerçekleştirilmiştir. Kalibrasyon eğrisi 2.5-1000 ng/mL aralığında doğrusal bulunmuştur. LOQ değerleri köpek ve at plazması için 2.5 ng/mL'dir [116].

Chen ve arkadaşları insan kanı ve beyin sıvısından aldıkları örneklerden lidokain ve diğer bir maddenin aynı anda tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde durgun faz olarak C18 kolon (150x4.6mm) ve mobil faz olarak 22:78 (v/v) MeOH ve pH:4'e ayarlanmış dietilamin:asetik asit tamponu kullanılmıştır. Lidokain için geri kazanımlar %78.9- 97.2 arasındadır [117].

Ma ve arkadaşları lidokainin aralarında bulunduğu bir grup lokal anesteziik ilaçın insan idrarından tayini için sıvı-faz ekstraksiyonu ile birlikte bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir [118].

Qin ve arkadaşları insan plasmasından lidokainle birlikte diğer maddelerin aynı anda tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde UV dedektör kullanılmıştır. Plasma örneklerinin sıvı-sıvı ekstraksiyonu için etil eter kullanılmıştır. Kromatografik ayırma için durgun faz olarak C18 kolon, mobil faz olarak %0.16 trietilamin (TEA) içeren fosforik asit ile pH:4.9'a ayarlanmış 30mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve MeCN (63:37,v/v) karışımı kullanılmıştır [119].

Jancic-Stojanovic ve arkadaşları fitilden lidokain tayini için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde C18 kolon (150x4.6mm), mobil faz olarak MeOH ve %85'lik ortofosforik asitle pH'sı 2.5 olan (65:35, v/v) çözelti karışımı kullanılmıştır. UV dedeksiyonu 250 nm'de ölçülmüştür [120].

De Orsi ve arkadaşları kozmetik kremlerden bazı lokal anestetiklerin ve başka ilaç maddelerinin tayini için HPLC electrospray iyonizasyon kütle spektroskopisi yöntemi geliştirmişlerdir. mobil faz olarak %0.02'lik trifloroasetik ve MeCN karışımı kullanılmıştır [121].

Mohammad yaptığı çalışmada lidokain ve safsızlıklarının tayini için sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmiştir. Yöntemde C18 kolon, pH:7 Briton-Robinson tamponu, MeOH-MeCN (40:45:15,v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Dedeksiyon 225 nm'de gerçekleşmiştir. Lidokain için LOD 0.346µg/mL bulunmuştur [122].

Raikos ve arkadaşları anestetiklerin analjeziklerin insan idrarından tayini için headspace SPME ve GC yöntemi geliştirmişlerdir [123].

Dinç ve arkadaşları ampul formlarından LDN ile birlikte bulunan maddelerin tayini için kemometri ile birlikte uyguladıkları bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C18 kolon (50x2.1mm) ve mobil faz olarak MeOH ve 0.01 M HCl karışımını kullanmışlardır [124].

Belal ve arkadaşları jelden LDN tayini için HPLC-DAD yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C8 kolon, 0.05 M fosforik asit ve MeCN mobil fazını 1mL/dk akış hızıyla kullanmışlardır. Kalibrasyon eğrisi 5-100µg/mL aralığında doğrusal bulunmuştur [125].

Caris ve arkadaşları plazmadan alınan örneklerde lidokain tayini için katı faz ekstraksiyonu sonrası UV dedeksiyonlu sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu çalışma için LOQ değeri 50 ng/mL bulunmuştur [126].

Ter Weijden ve arkadaşları lidokain ve metabolitinin plazmadan tayini için kolay ve hızlı LC-MS/MS yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde, örnek hazırlama aşamasında metanolla protein çöktürülmesi sonrası kromatografik ayrılma C18 kolonda (150x2.1mm), %0.1 amonyum asetat ve %0.1 formik asit içeren çözelti ve MeCN karışımından (70:30, v/v) mobil faz kullanılarak yapılmıştır. Lidokain için en düşük tayin limiti 0.2 mg/L bulunmuştur [127].

El-Kommos ve arkadaşları lidokaininde bulunduğu ilaç maddelerinin ikili karışımlarını içeren farmasötik preparatlardan tayin için ters faz HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılmalar C18 kolonda, mobil faz olarak pH:5'e ayarlanmış fosfat tamponu ve MeCN (40:60) 1mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon UV dedektörle 254 nm'de yapılmıştır [128].

Pendela ve arkadaşları LDN ve diğer maddelerin farmasötik preparatlardan tayini için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Ayrılmalar C18 kolonda, mobil faz olarak MeOH ve seyreltilmiş fosforik asitle pH:4.5'e ayarlanmış sodyum dihidrojen fosfat karışımıyla 1mL/dk akış hızında yapılmıştır. Ölçümler 230 nm'de yapılmıştır [129].

Chu ve arkadaşları lidokainin kemirgen plazmasından alınan örneklerden tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemde sentezlenen  $Fe_3O_4.SiO_2$ -C18 nanopatikülleri magnetler yardımıyla tüplere doldurulmuş ve lidokain içeren örnekler bu tüplere pompalanmıştır. Tüplerdeki C18 gruplarıyla lidokain arasındaki hidrofobik etkileşim sayesinde lidokain absorplanmıştır daha sonra asetone ile yıkanmıştır [130].

Belal ve arkadaşları LDN ve diğer bir maddenin jel formülasyonlarından tayini için HPLC-diyot serili dedektörlü bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C8 kolon (250x4.6mm), mobil faz olarak 0.05 M fosforik asit ve MeCN kullanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin lidokain için 5-200  $\mu$ g/mL değerleri arasında doğrusal olduğu bulunmuştur [131].

Hoonka ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada lidokainin aralarında bulunduğu ilaçların yiyecek ve içeceklerden analizi için HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde C18 kolon (250x4.6mm), mobil faz MeCN ve pH:3 0.01 M sodyum dihidrojenfosfat çözeltisi (40:60, v/v) karışımı kullanılmıştır. Dedeksiyon diyot serili dedektörde 252 nm'de gerçekleştirilmiştir [132].

Subhra ve arkadaşları lidokainin aralarında olduğu bazı psikoaktif bileşiklerin aynı anda tayini için micellar sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde C18 kolon ve 0.15 M SDS ve %6 pentanol karışımını mobil faz olarak kullanmışlardır. UV dedeksiyon 230 nm'de yapılmıştır [133].

Floriani ve arkadaşları yaptıkları çalışmada kokain ve aralarında lidokainin olduğu katkı maddelerinin kokain ürünlerinden yan yana tayini için HPLC-DAD

yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde ayrılmalar, C18 kolonda MeCN ve 0.05 M amonyum format mobil fazını 1.0mL7dk akış hızıyla kullanmışlardır [134].

Zargar ve arkadaşlarının biyolojik ve farmasötik örneklerden yaptığı çalışmada lidokain tayini için fiber sıvı mikroekstraksiyonla birlikte HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada lidokain örnek donörden organik bir faza daha sonra sıvı alıcı faza aktarılmıştır LOD 0.01µg/mL, kalibrasyon eğrisi aralığı 0.05-2 µg/mL olarak bulunmuştur [135].

Plenis ve arkadaşları LDN ve safsızlıklarının tayini için bir HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde örnek hazırlamada etanolle sıvı-sıvı ekstraksiyonu yapılmış, C18 kolon ve MeCN ile %0.1'lik ortofosforikasit çözeltisi karışımı mobil fazı kullanılmıştır. Lidokain için LOD ve LOQ 4.36 ve 13.21 µg/mL olarak bulunmuştur [136].

He ve arkadaşlarını yaptığı çalışmada lidokainin insan plazmasından tayini için rezonans Rayleigh saçılması (RRS) dedeksiyonuyla HPLC yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem maddelerin RRS'de zayıf şiddet göstermesine dayanmıştır ve Eritrosin sarısı eklenmesiyle artırılmıştır. RRS sinyaller 370nm'de ölçülmüştür. Kalibrasyon eğrisi 0.005-15.375µg/mL arasında doğrusaldır. Lidokain için LOD 15 ng/mL bulunmuştur [137].

### **2.2.3.3. Kapiler Elektroforez Yöntemi ile Analizleri**

Cao ve arkadaşları lidokain ve diğer bir maddenin idrardan tayini için elektrokemilüminesans dedeksiyonlu kapiler-elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada idrar örnekleri eterle ekstre edilmiştir. Geri kazanımlar %94-%97 arasında bulunmuştur. Geliştirilen bu çalışma için LOD değeri  $4.5 \times 10^{-8}$  mol/L'dir [138].

Li ve arkadaşları insan idrarından lidokain ile birlikte diğer maddenin aynı anda tayini için elektrokemilüminesans dedeksiyonlu kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada lidokain için kalibrasyon eğrisinin  $1.0 \times 10^{-7}$ - $1.0 \times 10^{-4}$  M aralığında doğrusal olduğu gözlenmiş ve LOD  $1.0 \times 10^{-8}$ M bulunmuştur [139].

Chik ve arkadaşları lidokainin deriden tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Ayırma işlemi silika kapiler kolon kullanılarak yapılmıştır. Bant

örneklerinden lidokain ekstraksiyonu için metanol kullanılmıştır. LOQ değeri 50 pg, kalibrasyon eğrisinin 50-1000 pg arasında doğrusal olduğu gözlenmiştir [140].

Sun ve arkadaşları lidokain ve diğer maddelerin insan idrarında yan yana analizi için elektrokemilüminesans dedeksiyonlu kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Lidokain için LOD 0.02 µg/mL olarak bulunmuştur [141].

Lombardo-Agui ve arkadaşları lidokainin aralarında bulunduğu bir grup lokal anesteziklerin ve alkaloidlerin idrar örneklerinden tayini için diyot serili dedektörlü kapiler zone elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen yöntemde katı faz ekstraksiyonu kullanılmış, LOQ değerleri yaklaşık olarak 300ng/mL olarak bulunmuştur [142].

Liu ve arkadaşları lidokainin aralarında olduğu anesteziklerin insan serum ve idrarından alınan örneklerden tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Lidokain için idrarda LOD  $1.3 \times 10^{-8}$  mol/L, serumda  $6.9 \times 10^{-7}$  mol/L olarak bulunmuştur [143].

Akyıl ve arkadaşları LDN HCl jel formülasyondan tayini için kapiler elektroforez yöntemi geliştirmişlerdir. Bu çalışmada 20 mM fosfat tamponu kullanılmıştır. Ayırma kapiler silika kolonda ve +30 kV potansiyel kullanılarak yapılmıştır [144].

#### **2.2.3.4. Elektrometrik Yöntemler ile Analizleri**

Hassan ve arkadaşları lidokainin lokal anestezik formülasyonlardan tayini için yeni bir sıvı membran elektrod geliştirmişlerdir [145].

Oliveira ve arkadaşları lidokainin farmasötik preparatlardan tayini için elektroanalitik bir yöntem geliştirmişlerdir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 10 ve 34.4µg/L olarak bulunmuştur. Lidokain geri kazanımı %97.6-99.2 arasındadır [146].

Tan ve arkadaşları lidokain tayini için kimyasal olarak modifiye edilmiş elektrottan faydalanarak bir yöntem geliştirmişlerdir [147].

#### **2.2.3.5. Difenhidramin ve Lidokainin Biyolojik Materyellerde Yan Yana Analizleri**

Yapılan literatür çalışmalarında difenhidramin ve lidokainin çeşitli yöntemlerle yan yana tayinlerine rastlanmıştır. Fretthold ve arkadaşları biyolojik sıvılardan ilaçların analizi için gaz kromatografisi- azot fosfor dedektörü yöntemi kullanmıştır [148]. Cox



ve arkadaşları kan örneklerinden azot-fosfor dedektörlü gaz kromatografik bir yöntem kullanmışlardır [149]. Pierce ve arkadaşları ölüm sonrası kan örneklerinde ilaç maddelerinin analizi için azot-fosfor dedeksiyonlu gaz kromatografisi yöntemi kullanmışlardır [150]. De la Torre ve arkadaşları kandan ilaç maddelerinin tayini için azot-fosfor dedektörlü gaz-sıvı kromatografisi yöntemi kullanmışlardır [151]. Sporkert ve arkadaşları saç telinden organik bileşiklerin analizi için headspace-katı faz mikro ekstraksiyonu yöntemi kullanmışlardır [152]. Musshoff ve arkadaşları biyolojik sıvılardan ve dokulardan ilaç analizleri için aralarında GC-MS yönteminde bulunduğu değişik analitik metodlar kullanmışlardır [153]. Adamowicz ve arkadaşları adli tecavüz vakalarında kullanılan ilaçların idrar örneklerinden analizinde GC-MS yöntemi kullanmışlardır [154]. Lillsunde ve arkadaşları idrarda ilaç maddelerinin görüntülenmesinde ince tabaka kromatografisi ve GC-MS yöntemi kullanmışlardır [155]. Crifasi ve arkadaşları adli vakalardan aldıkları kan örneklerinde ilaç analizleri için GC-MS yöntemi kullanmışlardır [156]. Hausmann ve arkadaşları zehirlenme vakalarında doku ve organlardan aldıkları örneklerde gaz-sıvı kromatografisi ve GC-MS yöntemi kullanmışlardır [157]. Plössl ve arkadaşları kandan ilaç maddelerinin analizleri için GC-MS yöntemi kullanmışlardır [158]. Liu ve arkadaşları Çin'deki tescilli bitkisel ilaçlarda yaptıkları çalışmada içeriğinde belirtilmemiş ilaç maddelerinin analizinde GC-MS yöntemi kullanmışlardır [159]. Li ve arkadaşları intihar vakalarından aldıkları çeşitli biyolojik örneklerde ilaç maddelerinin görüntülenmesinde GC-MS yöntemi kullanmıştır [160]. Ostrea ve arkadaşları yenidoğanlarda biyolojik örneklerde ilaç maddelerinin görüntülenmesinde GC-MS ve HPLC yöntemi kullanmıştır [161]. Lurie ve arkadaşları eroindeki safsızların analizi için HPLC yöntemine kullanmıştır [162]. Ohtsuji ve arkadaşları idrar, serum ve mide içeriği örneklerinde toksikolojik ilaç konsantrasyonlarının tayini için HPLC yöntemi kullanmışlardır [163]. Kalansinsky ve arkadaşları adli vakalarda kan, idrar ve dokulardan yaptıkları ilaç analizlerinde HPLC yöntemi kullanmışlardır [164]. Logan ve arkadaşları idrarda ilaç maddelerinin görüntülenmesinde HPLC yöntemi kullanmışlardır [165]. Pesce ve arkadaşları idrar örneklerinde yaptıkları çalışmada ilaç maddelerinin analizi için LC-MS/MS yöntemi kullanmışlardır [166].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda 2014-2015 yılında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler, çözücüler ve çözeltiler

##### 3.1.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler

Tez çalışması süresince kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler

Difenhidramin Hidroklorür (Toprak İlaç, Sakarya, Türkiye)

Lidokain Hidroklorür (Toprak İlaç, Sakarya, Türkiye)

Ovadril® (yerel eczane)

Metanol (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Asetonitril (HPLC saflığında) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ortofosforik asit (%85, ağ.) (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Potasyum dihidrojen fosfat (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Sodyum hidroksit (Analitik saflıkta) (Merck, Darmstadt, Almanya)

Ultra saf su (HPLC saflığında)

Helyum (Yüksek saflıkta)

##### 3.1.2. Çözeltiler

###### 3.1.2.1. Difenhidramin Hidroklorür Stok Çözeltisi

Difenhidramin Hidroklorür tartılarak 1mg/1mL olacak şekilde metanol çözücüsüyle çözüldürüldü.

###### 3.1.2.2. Lidokain Hidroklorür Stok Çözeltisi

Lidokain Hidroklorür tartılarak 1mg/1mL olacak şekilde metanol çözücüsüyle çözüldürüldü.

#### 3.2. Aletler ve diğer gereçler

1- Gaz-Kromatografisi- Kütle Spektrometresi cihazı (Shimadzu Corporations-Japan)

- Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometresi GCMS-QP2010 Plus (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)

- Gaz Kromatografisi GC-2010 (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- AOC-20s numune örnekleyicisi (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- AOC-20i otomatik enjektör (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- Shimadzu GC-MS Real Time Analysis yazılımı (Shimadzu Corporations, Kyoto, Japan)
- Analitik kolon Teknokroma TRB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 $\mu$ m)

## 2-Yazılımlar

- MS Office Word Programı
- MS Office Excel Programı

3- Teraziler (Denver Instrument TB 2150D)

4- Vorteks Mikser (Electro-mag)

5- Ultrasonik banyo (Elma Ultrasonic LC 30 H)

6- Otomatik pipetler (Eppendorf 200 $\mu$ L ve 1000 $\mu$ L'lik)

7- Mobil Faz Süzme Ünitesi (Milipor, 5 $\mu$ )

8- pH metre (Hanna Instruments)

9- Şırınga (Steril hayat şırınga, 5mL)

10- Enjektör Filtreleri (naylon, 0.2 $\mu$ m ve 0.45 $\mu$ m, Millipore)

11- Hesap Makinesi (Casio Scientific Calculator fx-95MS)

12- Balon jojeler (Isolab, 5mL, 10mL, 100mL, 500mL)

13- Beher (Isolab, 50mL)

### 3.3. Difenhidramin Hidroklorür ve Lidokain Hidroklorürün Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Yan Yana Analizi

Difenhidramin hidroklorür ile Lidokain hidroklorürün GC-MS ile yan yana analizinin yapılabilmesi için gerekli olan gaz akış hızı, kolon fırını sıcaklık programı, enjeksiyon sıcaklığı gibi kromatografik koşullar ve kütle spektrometresi koşulları belirlenerek geliştirilen yöntem bu iki ilaç maddesinin birlikte bulunduğu farmasötik preparatlardan analizine uygulandı. Elde edilen veriler Bölüm 4.1.1.'de yer almaktadır.

### 3.3.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Difenhidramin ve lidokainin yapılmış çalışmaları göz önüne alınarak GC-MS çalışmaları TRB 5MS (%95 Dimetil- %5 difenil polisiloksan) kolonda farklı kolon sıcaklık programları, gaz akış hızı, enjeksiyon sıcaklığı, enjeksiyon hacmi denenerek belirlenmiştir. Yapılan denemelerde kolon sıcaklığı 100°C'den başlatılıp dakikada 20°C artırılarak 250°C'ye çıkarılmış ve 5dk bu sıcaklıkta bekletilmiştir. Diğer bir denemede kolon sıcaklığı 150°C'den başlatılmış dakikada 20°C artırılarak 250°C'ye çıkarılmıştır. Yapılan başka bir denemede kolon sıcaklığı 250°C'ye ayarlanmış ve sabit sıcaklıkta 20 dakika beklenmiştir. Bu denemeler analiz sürelerinin uzunluğu ve piklerin ayrılmaması sebebiyle başarılı olmamıştır. Kütle spektrometresi koşullarının belirlenmesinde iki ilaç maddesinin de yüzde bolluğu en fazla olan kütlelerin seçilmiş iyon izleme modunda izlenebilmesi için GC-MS kütüphanesindeki kütle spektrumları karşılaştırılarak bulunmuştur. Uygun bulunan koşullar kütle spektrometresi parametreleri kullanılarak tayini yapılacak maddelerin ikili kombinasyonunun bulunduğu losyon formülasyonuna uygulandı.

### 3.4. GC-MS yönteminin validasyonu

Yöntem geliştirme işlemi tamamlandıktan sonra analitik yöntem validasyonu ICH kılavuzu Q2 ye göre yapıldı [167]. Buna göre seçicilik, doğruluk, kesinlik, LOD ve LOQ, doğrusalılık ve stabilite çalışmaları yapıldı.

#### 3.4.1. Yöntemin seçiciliği

Yöntemin seçiciliğinin tayini amacıyla çözücünden herhangi bir girişimin olup olmadığı incelendi. Buna ait kromatogramlar Bölüm 4.2.1.'de verilmiştir.

#### 3.4.2. Tayin ve Gözlenebilme Sınırı

Geliştirilen yöntemin hassasiyetini belirlemek için LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki formüller ile hesaplandı. Hesaplanan değerler Bölüm 4.2.2' de verildi.

$$\text{LOD} = 3 \times \text{SD}/m$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SD}/m$$

SD: Kalibrasyon doğrusunun y kesişiminin standart sapması

m: Kalibrasyon doğrusunun eğimi

### 3.4.3. Doğrusallık

Doğrusallık aralığı, geliştirilen yöntemin kabul edilebilir duyarlılık ve tekrarlanabilirlikte sonuçlar verdiği konsantrasyon aralığıdır.

Bu doğrusal ilişkinin gösterilebilmesi için difenhidramin hidroklorür ve lidokain hidroklorürün 7 farklı konsantrasyonunu içeren karışımlar hazırlanarak analizleri yapıldı. Kromatogramlardan elde edilen pik alanlarına karşı konsantrasyonların doğrusallık grafikleri çizildi. Sonuçlar Bölüm 4.2.3' de bildirildi.

### 3.4.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda difenhidramin hidroklorür için (0.5,2 ve 3 $\mu$ g/mL) ve lidokain hidroklorür için (0.75,3 ve 5.25 $\mu$ g/mL ) içeren çözeltilerle Bölüm 4.2.4' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Analizler aynı gün (gün içi) ve 5 farklı günde (günler arası) yapılmıştır. Her konsantrasyon için analizler en az 5 kez tekrarlandı. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.4' de bildirildi.

### 3.4.5. Çözelti Stabilitesi

Çözelti stabilitesinin saptanması için standart çözeltiler, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4°C de 1 ay bekletildi. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.5' de verilmiştir.

### 3.4.6. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için losyon çözeltisinden 10 mL lik balonjojeye alınan DFN için 0.5  $\mu$ g/mL ve LDN için 0.75  $\mu$ g/mL konsantrasyonlardaki çözelti üzerine 4 farklı konsantrasyonda DFN ve LDN standart çözeltilerinden ilave edildi. Elde edilen alan değerleri daha önce hazırlanan ölçü eğrisi denkleminde yerine konularak konsantrasyonlar bulundu. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.2.6' da verilmiştir.

## 3.5. Farmasötik Preparatlarda Difenhidramin Hidroklorürün ve Lidokain Hidroklorürün Analizi

### 3.5.1. Losyon Stok Çözeltisinin Hazırlanması

Geliştirilen yöntem difenhidramin hidroklorür ve lidokain hidroklorürün ikili kombinasyonunu içeren losyon (Ovadril®;120g'da 3g lidokain hidroklorür, 2g difenhidramin hidroklorür) formülasyonuna uygulanmıştır. Losyon formülasyonundan 50 mL'lik beherlere tartım alınarak metanolla çözdürülüp 100mL'lik balon jodelere

alınıp metanolla hacmine tamamlandı ve ultrasonik banyoda bir saat bekletildi, daha sonra mekanik çalkalayıcıda bir saat çalkalandı. Daha sonra mavi bantlı süzgeç kağıtlarından süzöldü. 100 mL'lik balon jodedeki losyon çözeltisi difenhidramin 10 µg/mL lidokain 15 µg/mL (stok çözelti I) olacak şekilde metanolla seyreltildi.

### **3.5.2. Geliştirilen GC-MS yöntemi ile Analiz**

Losyon stok çözeltisinden seyreltme işlemleri metanol ile yapıldı. Losyon stok çözelti I'den alınan 1 mL'lik hacimdeki çözelti 5 mL'lik balon jeye konularak metanolla hacmine tamamlandı (difenhidramin 2µg/mL, lidokain 3µg/mL). İşlem 5 kez tekrarlandı. Losyon formülasyonlarındaki difenhidramin ve lidokain miktarları daha önce hazırlanan ölçü eğrisinin denklemi yardımıyla hesaplandı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Difenhidramin Hidroklorür ile Lidokain Hidroklorürün Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ile Yan Yana Analiz Sonuçları

#### 4.1.1. Kromatografik Koşulların Belirlenmesi

Yapılan denemelerde en iyi analiz sonuçlarını sağlayan koşulların aşağıdaki gibi olduğu belirlenmiştir.

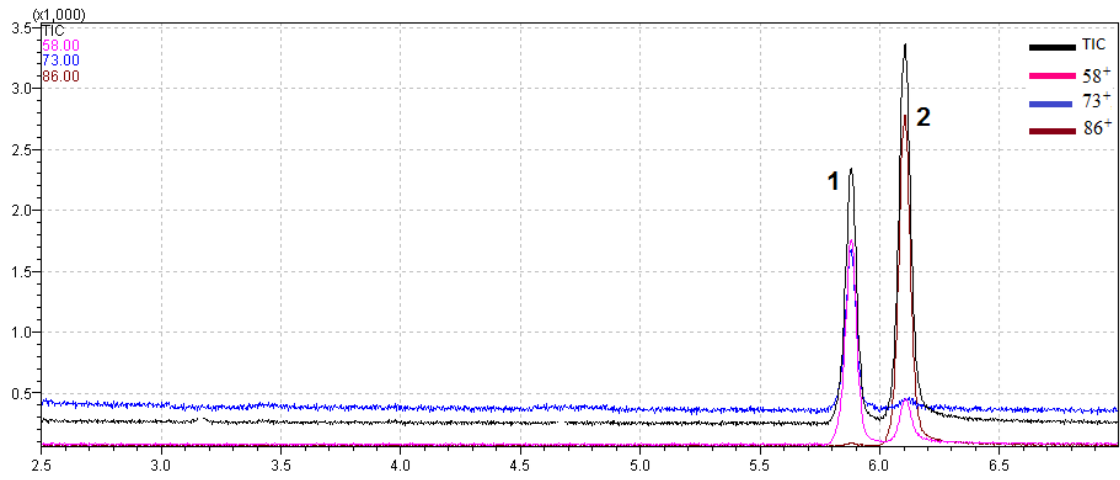
##### GC sistem parametreleri

- Kolon: TRB 5MS %95 Dimetil- %5 difenil polisiloksan (30m x 0.25mm x 0.25µm)
- Taşıyıcı gaz: Yüksek saflıkta helyum gazı
- Gaz akış hızı: 0,9 mL/dk
- Enjeksiyon hacmi: 1µl
- Enjeksiyon sıcaklığı: 300 °C
- Fırın sıcaklığı: 200 °C'de 7dakika (izotermal)
- Split 1:10

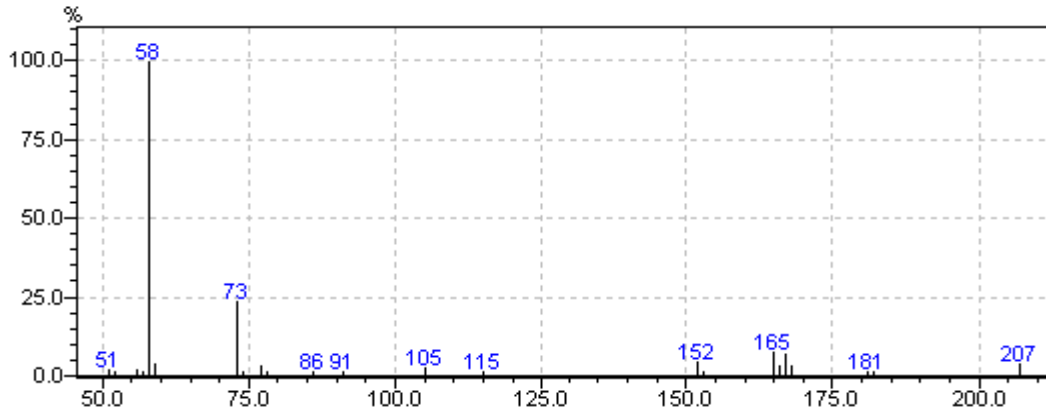
##### MS sistem parametreleri

- TIC (40-550 amu)ve SIM (m/z, difenhidramin 58<sup>+</sup>,73<sup>+</sup>; lidokain 58<sup>+</sup>,86<sup>+</sup>)
- iyonizasyon enerjisi: 0,70kV
- iyon kaynağı sıcaklığı: 200 °C

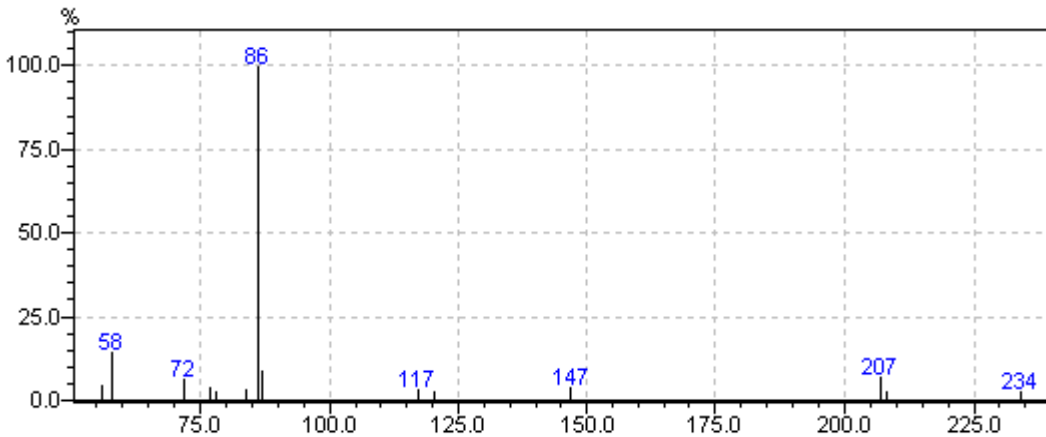
Bu kromatografik koşullarda difenhidraminin alıkonma zamanı 5.879, lidokain için 6.103 dakikadır.



**Şekil 4-1: 2µg/mL difenhidramin (1) ve 3µg/mL lidokaine (2) ait kromatogram (difenhidramin m/z: 58<sup>+</sup>,73<sup>+</sup>; lidokain m/z:58<sup>+</sup>,86<sup>+</sup> , TIC:toplam iyon kromatogramı**



**Şekil 4-2: Difenhidraminin Hidroklorür kütle spektrumu**



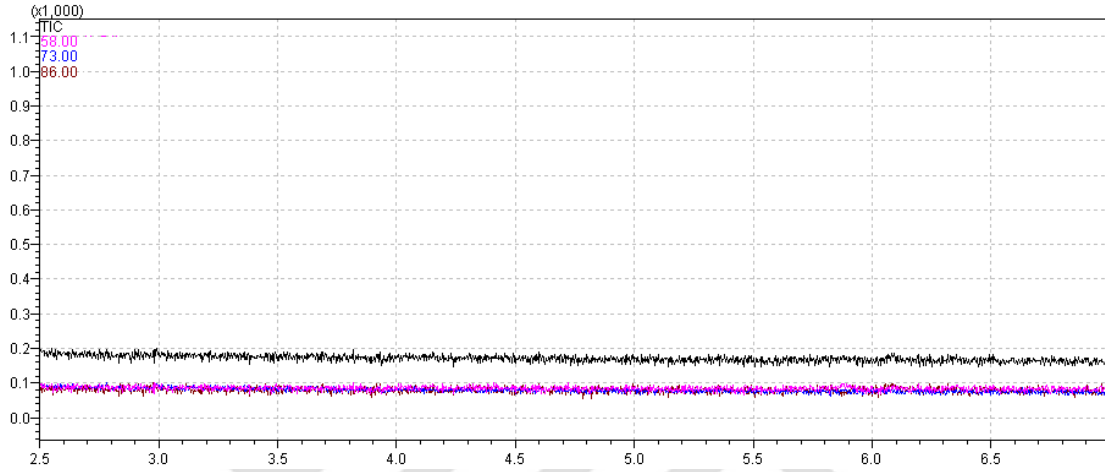
**Şekil 4-3: Lidokainin Hidroklorür kütle spektrumu**



## 4.2. Yöntem Validasyonu

### 4.2.1. Seçicilik

Çözücü metanol enjeksiyonu yapıldı. Difenhidramin ve lidokainin piklerinin çıktığı dakikalarda herhangi bir girişim olup olmadığı belirlendi. Metanol çözücüsüne ait kromatogram Şekil 4-4'te verilmiştir.



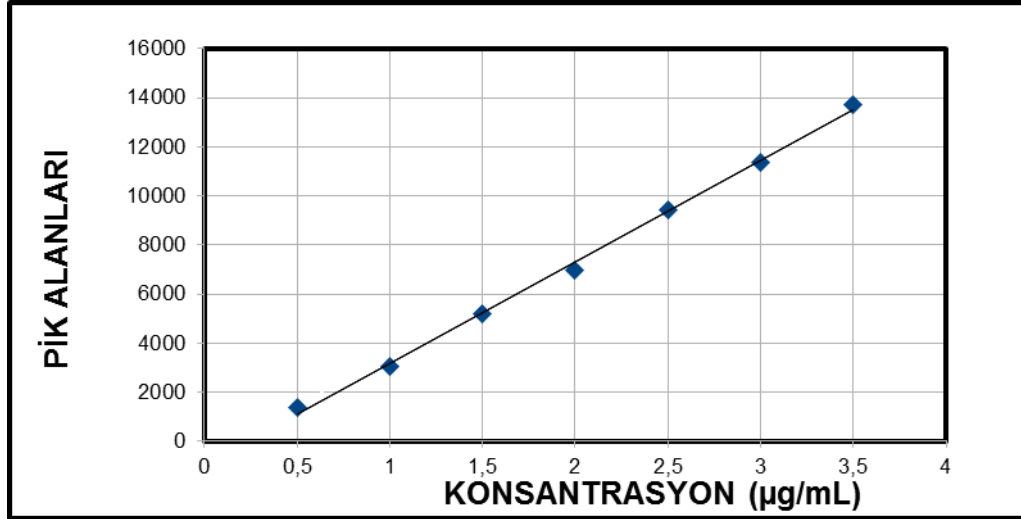
Şekil 4-4: Metanol çözücüsüne ait kromatogram (difenhidramin m/z: 58<sup>+</sup>, 73<sup>+</sup>; lidokain m/z:58<sup>+</sup>, 86<sup>+</sup>, TIC:toplam iyon kromatogramı)

### 4.2.2. Tayin Sınırı (LOQ) ve Gözlenebilme Sınırı (LOD)

Bölüm 3.4.2' de verilen denklemlere göre hesaplanan LOD değerleri DFN için 0.012 µg/mL, LDN için 0,017 µg/mL ve LOQ değerleri DFN için 0,039 µg/mL ve LDN için 0,056 µg/mL olarak bulunmuştur.

### 4.2.3. Doğrusallık

DFN için 0,5–3,5 µg/mL ve LDN için 1,0–5,25 µg/mL konsantrasyon aralığında 7 farklı konsantrasyondaki standart çözeltiler ile Bölüm 3.4.3' de anlatıldığı gibi çalışıldı. Her konsantrasyona karşı elde edilen ortalama pik alan oranı değerleri yardımı ile belirtilen konsantrasyon değerleri arasında çizilen ölçü eğrisi DFN için Şekil 4-5'te ve LDN için Şekil 4-6' da verilmiştir.



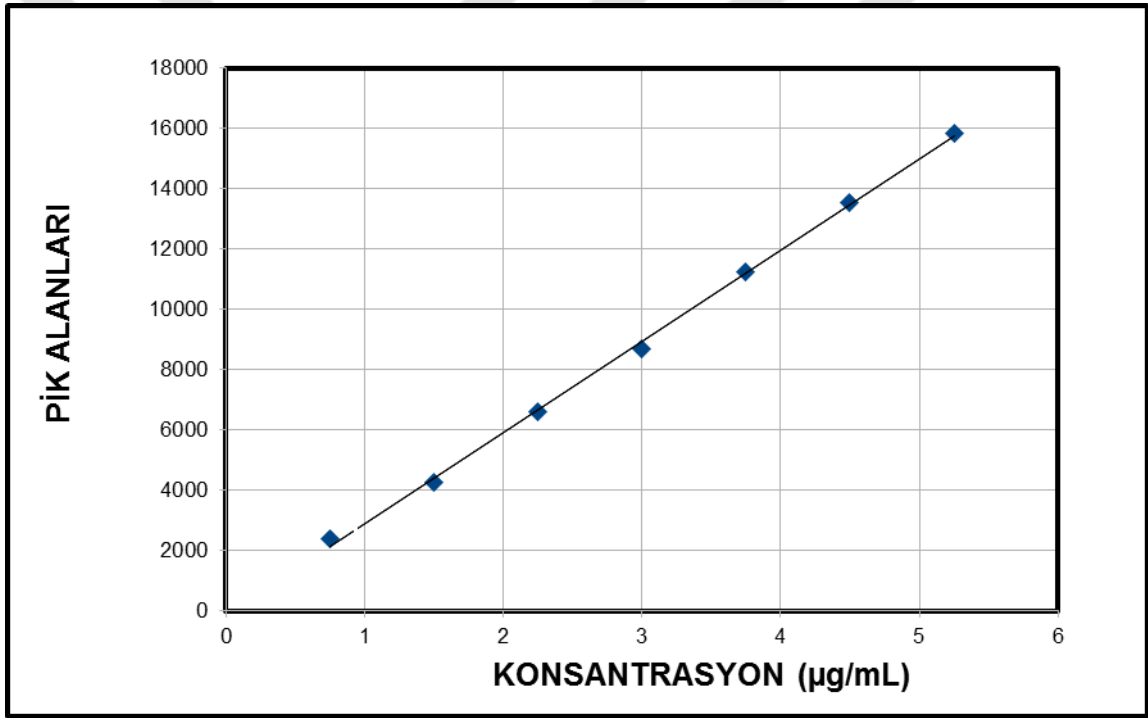
Şekil 4-5: Difenhidraminin 0.5-3.5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi

Tablo 4-1: Difenhidramin Hidroklorürün 0,5–3,5 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik verileri

<b>C</b> (µg / mL)	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>1,5</b>	<b>2,0</b>	<b>2,5</b>	<b>3,0</b>	<b>3,5</b>
<b>A</b>							
<b>1</b>	1408	3085	5284	7095	9576	11486	13865
<b>2</b>	1406	3065	5254	7063	9552	11390	13862
<b>3</b>	1357	3044	5112	6823	9230	11278	13596
<b>4</b>	1384	2995	5187	6953	9423	11337	13619
<b>5</b>	1395	3057	5189	6982	9496	11372	13664
<b>6</b>	1381	2998	5125	6871	9396	11335	13598
<b>Ortalama</b>	1388,50	3040,66	5191,83	6964,50	9445,50	11366,33	13700,67
<b>SD</b>	18,9604	36,7187	68,1628	105,7691	126,7434	70,0818	128,4861
<b>RSD (%)</b>	1,3655	1,2076	1,3128	1,5186	1,3418	0,6165	0,9378
<b>Ortalama alan oran(A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:</b>							
<b><math>A = 4131,54C - 963,36</math>      (<math>r = 0,9988</math>)</b>							

**Tablo 4-2: Tablo 4.1'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler**

	1	2	3	4	5	6	ortalama±SD
<b>m</b>	4176,07	4165,43	4093,07	4116,07	4124,57	4114,00	4131,53±32,27
<b>b</b>	952,29	960,57	980,43	961,00	941,29	984,57	963,35±16,52
<b>r</b>	0,9989	0,9988	0,9987	0,9989	0,9989	0,9987	0,9988±0,00009



**Şekil 4-6: Lidokainin 0,75–5,25 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrisi**

**Tablo 4-3: Lidokain Hidroklorürün 0,75–5,25 µg/mL konsantrasyon aralığında hazırlanan ölçü eğrilerine ait pik alanı değerleri ve istatistik veriler**

<b>C</b> (µg / mL)	<b>0,75</b>	<b>1,5</b>	<b>2,25</b>	<b>3,0</b>	<b>3,75</b>	<b>4,5</b>	<b>5,25</b>
<b>A</b>							
<b>1</b>	2361	4291	6582	8691	11229	13652	15865
<b>2</b>	2371	4306	6597	8723	11215	13584	15852
<b>3</b>	2396	4196	6586	8706	11236	13521	15859
<b>4</b>	2411	4245	6583	8682	11222	13495	15863
<b>5</b>	2382	4310	6594	8694	11217	13576	15848
<b>6</b>	2355	4298	6604	8635	11430	13421	15862
<b>Ortalama</b>	2379,33	4274,33	6591,00	8688,50	11258,17	13541,50	15858,17
<b>SD</b>	21,3791	44,9651	8,76356	29,79094	84,53973	80,38594	6,73547
<b>RSD (%)</b>	0,8985	1,0519	0,1329	0,3428	0,7509	0,5936	0,0424
<b>Ortalama alan oran(A) değerlerinden hesaplanan doğru denklemi:</b>							
<b><math>A = 3030,38C - 149,58</math> (r= 0,9994)</b>							

**Tablo 4-4: Tablo 4.3'deki ölçü eğrilerinin regresyon analizine ait parametreler**

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>ortalama±SD</b>
<b>m</b>	3041,95	3029,38	3032,81	3023,57	3026,33	3028,24	3030,38±6,45
<b>b</b>	172,86	138,43	169,86	142,00	133,14	141,14	149,57±17,18
<b>r</b>	0,9993	0,9994	0,9993	0,9994	0,9994	0,9992	0,9993±0,00007

Tablo 4-1 ve 4-3'de pik alan oranları (A), SD ve RSD değerleri, Tablo 4-2 ve 4-4'de ise en küçük kareler yöntemi uygulanarak hesaplanan doğru denkleminde ( $A = mC + b$  [m = eğim, b = kesim noktası, C = konsantrasyon]) elde edilen değişkenler ve korelasyon katsayıları (r) verilmiştir.

#### 4.2.4. Gün içi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

Üç farklı konsantrasyonda difenhidramin için (0.5, 2, 3 µg/mL ) ve lidokain için (0.75, 3, 5.25 µg/mL ) içeren çözeltilerle Bölüm 3.4.4. de anlatıldığı gibi çalışıldı.

Aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri %0,11-0,94 arasında hesaplandı (Tablo 4-5).

Farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise %0,25 –1,88 arasında bulundu (Tablo 4-5).

**Tablo 4-5: Aynı gün içinde ve farklı günlerde yapılan analizlerin tekrarlanabilirliği**

	Gün içi (n=5)			Günler arası *(n=5)		
	Alınan Konsantrasyon (µg /mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg /mL)	RSD (%)	Alınan Konsantrasyon (µg /mL)	Bulunan Konsantrasyon (µg /mL)	RSD (%)
DFN	0,5	0,502	0,49	0,5	0,506	0,42
	2,0	2,019	0,11	2,0	1,995	0,41
	3,0	2,947	0,90	3,0	2,941	0,45
LDN	0,75	0,781	0,94	0,75	0,743	1,88
	3,0	2,99	0,45	3,0	2,937	1,58
	5,25	5,254	0,89	5,25	5,204	0,25

\*Beş farklı günde elde edilen sonuçlar

#### 4.2.5. Çözelti Stabilesi

Çözelti stabilesinin saptanması için standart çözeltiler, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4°C de 1 ay bekletildi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda çözeltilerin stabil kaldığı saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4-6'da verilmiştir.

0,

**Tablo 4-6: Oda sıcaklığında, otomatik numune örnekleyicisi ve buzdolabında bekletilen DFN ve LDN standart çözeltilerine ait stabilite sonuçları**

Uygulama	Geri kazanım (ortalama±SD) (%)		RSD (%)	
	DFN	LDN	DFN	LDN
Oda sıcaklığında, karanlıkta 24 saat bekletme	101,33±0,40	100,97±0,57	0,40	0,56
Buzdolabında +4°C de 1 ay bekletme	99,33±0,28	99,11±0,19	0,29	0,19
Otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat bekletme	101,05±0,13	99,28±0,22	0,13	0,22

SD: Standart sapma,

RSD: Relatif standart sapma

#### 4.2.6. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu saptamak için standart katma yöntemi uygulandı. Bunun için bölüm 3.4.6' da anlatıldığı gibi çalışıldı.

Daha sonra geri kazanım yüzdeleri  $(C_t - C_u) \times 100 / C_a$  formülünden hesaplandı.

Burada;

$C_t$  : Bulunan toplam (DFN veya LDN) konsantrasyonu,

$C_u$  : Farmasötik preparatdan alınan analit konsantrasyonu,

$C_a$  : İlave edilen standart çözeltinin konsantrasyonudur.

Geri kazanım değerleri % aralığında bulundu (Tablo 4-7). Elde edilen sonuçlar tabletlerde bulunan katkı maddelerinin interferense neden olmadığını göstermiştir.

**Tablo 4-7: Standart katma yöntemine ait analiz sonuçları ve sonuçların istatistiki olarak değerlendirilmesi**

	Alınan Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) <sup>a</sup>	İlave edilen Konsantrasyon ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ )	Bulunan Konsantrasyon <sup>b</sup> ( $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) (Ortalama $\pm$ SD <sup>c</sup> )	Geri Kazanım (%)	RSD (%) <sup>*</sup>
DFN		0,50	1,019 $\pm$ 0,005	103,80	0,50
	0,5	1,5	1,971 $\pm$ 0,018	98,06	0,92
		2,0	2,566 $\pm$ 0,004	103,00	0,16
		3,0	3,561 $\pm$ 0,021	102,03	0,61
LDN		0,75	1,529 $\pm$ 0,003	103,86	0,22
	0,75	1,5	2,289 $\pm$ 0,027	102,60	1,20
		3,0	3,802 $\pm$ 0,007	101,73	0,19
		4,5	5,304 $\pm$ 0,015	101,20	0,29

<sup>a</sup>Ovadril ®, 120g'da 2g DFN HCl ve 3g LDN HCl içerir.

<sup>b</sup>n=5,

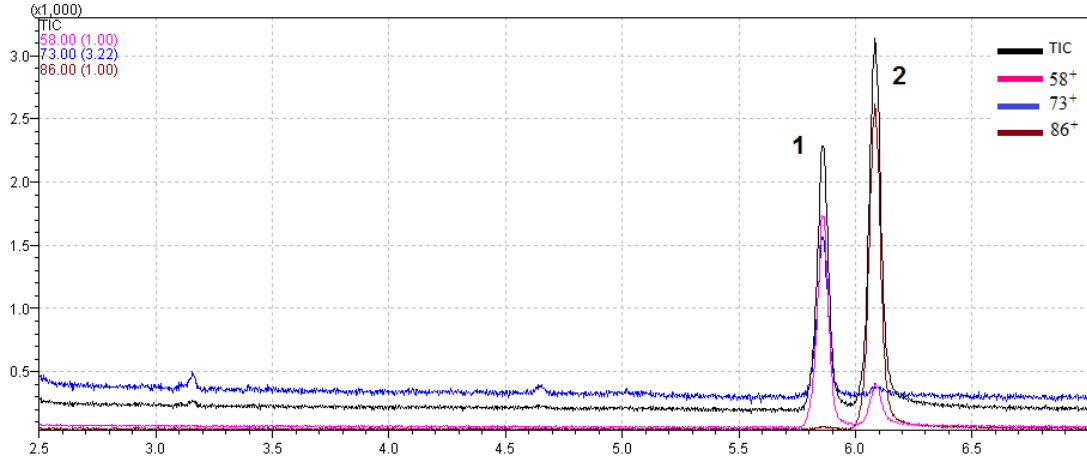
<sup>c</sup>Standart sapma

<sup>\*</sup>Bağıl standart sapma

### 4.3. Farmasötik Preparatlarda Difenhidramin Hidroklorürün ve Lidokain Hidroklorürün Analizi

#### 4.3.1. Geliştirilen GC-MS Yönteminin Losyon Formülasyonuna Uygulanması

Geliştirilen GC-MS yöntemi ile elde edilen sonuçlar 5 adet tayin üzerinden hesaplanan ortalamalar (X), SD, %RSD ve Tablo 4-8'de verilmiştir. Geliştirilen GC-MS yöntemi ile elde edilen kromatogram Şekil 4-7'de verilmiştir.



**Şekil 4-7: 120g preparatta 2g difenhidramin hidroklorür (1) ve 3g lidokain hidroklorür (2) içeren formülasyonun analizine ait kromatogram (difenhidramin m/z: 58<sup>+</sup>, 73<sup>+</sup>; lidokain m/z:58<sup>+</sup>, 86<sup>+</sup> , TIC:toplam iyon kromatogramı)**



**Tablo 4-8: 120g preparatta 2g difenhidramin hidroklorür ve 3g lidokain hidroklorür içeren formülasyonun geliştirilen yöntemle elde edilen analiz sonuçları**

	DFN	LDN
	GC-MS yöntemi	GC-MS yöntemi
n <sub>1</sub>	1,92	2,88
n <sub>2</sub>	1,92	2,89
n <sub>3</sub>	1,93	2,89
n <sub>4</sub>	1,93	2,89
n <sub>5</sub>	1,93	2,88
X <sub>ort</sub> <sup>b</sup>	1,93	2,89
Geri Kazanım (%)	96,50	96,33
SD	0,0054	0,0054
RSD (%)	0,28	0,19

<sup>a</sup> Ovdaril®losyon, Her 120g preparatta 2g difenhidramin hidroklorür ve 3g lidokain hidroklorür içerir.

<sup>b</sup>n<sub>1</sub>=n<sub>2</sub>=5

## 5. TARTIŞMA

Difenhidramin; alerjik semptomları, kaşıntı,uykusuzluk, soğuk algınlığı, yol tutması ve ekstrapiramidal semptomları da içeren çok sayıdaki durumun tedavisinde kullanılan birinci kuşak bir antihistaminiktir [13,4] ve yeni jenerasyon antihistaminiklerden önemli ölçüde kuvvetlidir [5]. Etanolamin sınıfı antihistaminerjik ajanlardan biri olan difenhidramin, histamin (H1) reseptörünün ters antagonistidir. Histaminin etkisini terse çevirerek alerjik semptomların şiddetini azaltır [14]. Klinik olarak H1 antagonistleri genellikle alerjik reaksiyonları tedavi etmek için kullanılır. Sedatif etki ise genel bir yan etkisidir ve difenhidramin veya doksilamin gibi H1 antagonistleri uykusuzluk tedavisinde de kullanılır. Difenhidramin aynı zamanda, lokal anestezik etkisine sebep olan hücre içi sodyum kanal bloklayıcısı gibi davranır [15]. Lidokain yaygın olarak kullanılan bir antiaritmik ve lokal anesteziktir. Antiaritmik ilaç sınıflandırılmasında 1b grubunda yer alır. Parenteral yoldan etkin bir antiaritmik olarak aktivite gösterir ve yaşamı tehdit eden akut ventriküler aritmilere karşı ilk sıra ilaç durumundadır [75].

Difenhidramin ve lidokainin farmasötik preparatlardaki yan yana analizleri incelendiğinde sadece tabletlerde surface assisted laser desorption ionization (SALDI)-kütle spektrometresi metoduna rastlanmıştır [168]. Her analiz laboratuvarında bulunmayacak bir yöntemdir. Bu özgün yüksek lisans tezi kapsamında difenhidramin ve lidokainin losyon formülasyonunda yan yana tayini için gaz kromatografisi-kütle spektrometresi yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntemin validasyonu yapılmış ve ilaç maddelerinin farmasötik preparatlardaki analizine uygulanmıştır.

Geliştirilen GC-MS yönteminde öncelikle kromatografik koşullar belirlenmiştir. Yapılan denemeler sonucunda iki ilaç maddesinin ayrılmasında kullanılmak üzere en uygun kolonun, 30m uzunluğunda 0,25mm iç çapında ve 0,25µm film kalınlığında TRB-5MS (%95Dimetil-%5difenil polisiloksan) stasyoner faz ile kaplı kapiler kolon kullanılmıştır. Çalışmada 200°C sabit sıcaklıkta, 0.9mL/dk gaz akış hızı kullanılarak ayrılma sağlanmıştır. Kütüphanedeki spektrumlarla elde edilen kütle spektrumlarının benzerliğinden faydalanılarak takip için (difenhidramin hidroklorür için m/z 58<sup>+</sup> ve 73<sup>+</sup>, lidokain hidroklorür için 58<sup>+</sup>,86<sup>+</sup>) uygun iyonlar seçilmiştir. Alıkonma zamanları ise difenhidramin için 5.879, lidokain için 6.103 dk olarak bulunmuştur.

Belirlenen çalışma koşullarında doğrusal aralık, difenhidramin için 0.5–3.5 µg/mL ve lidokain için 0.75–5.25 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen yöntem ayrıca valide edilmiş ve sonuçlar başarılı bulunmuştur. Geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için aynı günde ve farklı günlerde üç farklı konsantrasyonda analizler yapılmış ve aynı gün içinde yapılan analizlere ait bağıl standart sapma değerleri % 0.11 – 0.94, farklı günlerde yapılan analizler sonucunda elde edilen bağıl standart sapma değerleri ise % 0.25 – 1.88 olarak saptanmıştır. Yöntemin doğruluğunu belirlemek amacıyla standart katma metodu uygulanmış ve geri kazanım değerleri % 98.06-103.86 aralığında bulunmuştur. Ayrıca ölçü eğrilerinin eğimi ve y eksenini kestiği nokta kullanılarak hesaplanan LOD değerleri DFN için 0.012, LDN için 0.017 µg/mL ve LOQ değerleri DFN için 0.039 ve LDN için 0.056 µg/mL olarak bulunmuştur. Çözelti stabilitesinin saptanması için de standart çözeltiler, oda sıcaklığında karanlıkta 24 saat, otomatik numune örnekleyicisinde 24 saat ve +4°C de 1 ay bekletilmiş ve yapılan değerlendirmeler sonucunda çözeltilerin stabil kaldığı belirlenmiştir.

Özet olarak bu çalışmada farmasötik preparatlarda difenhidramin ve lidokainin yan yana analizi için kullanımı kolay, tekrarlanabilirliği ve güvenilirliği yüksek yeni bir GC-MS yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen ve valide edilen bu yöntem rutin farmasötik analizlerde, bu ilaç maddelerinin yan yana miktar tayininde güvenilir, hızlı, pratik olarak rahatlıkla kullanılabilir niteliktedir.

## KAYNAKLAR

- 1-McConnel, T.H. *The nature of disease: pathology for the health professions*. Baltimore, Mar. Lippincott Williams & Wilkins. (2007).
- 2-Leurs, R., Church, M.K. ve Taglialatela, M. H1-antihistamines : inverse agonism, anti-inflammatory actions and cardiac effects. *Clinical&Experimental Allergy* 2002; **32**,489-498.
- 3-Diphenhydramine hydrochloride, Drugs, Erişim 15.11.2014, Erişim 15.11.2014 <http://www.drugs.com/monograph/diphenhydramine-hydrochloride.html>
- 4-Brown, H.E., Stoklosa, J. ve Freudenreich, O. How to stabilize an acutely psychotic patient. *Current Psychiatry* 2012; **11**,10–16.
- 5-Raphael, G.D., Angello, J.T., Wu, M.M. ve Druce, H.M. Efficacy of diphenhydramine vs desloratadine and placebo in patients with moderate-to-severe seasonal allergic rhinitis. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2006;**96**,606–614.
- 6-Lidokaine, Wikipedia, Erişim 15.11.2014, <http://en.wikipedia.org/wiki/Lidocaine>
- 7-Diphenhydramine, Drugs, Erişim 15.11.2014, <http://drugbank.ca/drugs/DB01075>
- 8- European Pharmacopoeia, 6th ed. 2007
- 9-Paton, D.M. ve Webster, D.R. Clinical pharmacokinetics of H1-receptor antagonists (the antihistamines). *Clinical Pharmacokinetics* 1985; **10**,477–497.
- 10- Simons, K.J., Watson, W.T., Martin, T.J., Chen, X.Y. ve Simons, F.E. Diphenhydramine: pharmacokinetics and pharmacodynamics in elderly adults, young adults, and children. *The Journal of Clinical Pharmacology* 1990; **30**,665–671.
- 11-Florey, K.,editor. *Analytical Profiles of Drugs Substances*. New York and London: Academic Press; 1974.
- 12-Dökmeci, İ. *Farmakoloji Temel Kavramlar*. Nobel Tıp Kitabevi 2000.
- 13-Diphenhydramine Hydrachloride Monograph. Drugs.com. The American Society of Health-System Pharmacists.
- 14-Yamashiro, K., Kiryu, J., Tsujikawa, A., Nonaka, A., Honjo, M., Tanihara, H. ve ark. Suppressive effects of histamine H1 receptor antagonist diphenhydramine on the leukocyte infiltration during endotoxin-induced uveitis. *Experimental. Eye Research* 2001; **73**,69–80.
- 15-Kim, Y.S., Shin, Y.K., Lee, C., Song, J. Block of sodium currents in rat dorsal root ganglion neurons by diphenhydramine. *Brain Research* 2000; **881**:190–8.

- 16-Fahn, S., Marsden C.D., Calne D.B. *Classification and investigation of dystonia. In Movement Disorders 2*, Boston, Butterworths,1987
- 17- Fahn, S.,Marsden C.D. *The treatment of dystonia. In Movement Disorders 2*, Butterworths, Boston,1987.
- 18- Lee,A. S. Treatment of drug-induced dystonic reactions. *JACEP* 1979; **8**:453-457.
- 19-Douglas,W.W. Histamine and 5-hydroxytryptamine(serotonin) and their antagonists. In *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (A.G. Gilman, L.S. Goodman, T.W.Rall and F.Murad,Eds.),7th ed.,pp.605-638. Macmillan ,New York,1985.
- 20-Truong, D.D., P.Sandroni, S. Van Den Noort,R.R. Matsumoto. Diphenhydramine is effective in the treatment of idiopathic truncal dystonia. *Arch.Neurol* 1995; **52**:405-407.
- 21-Khalil, S. Atomic emission spectrometric determination of ephedrine, cinchonine, chlorpheniramine, atropine and diphenhydramine based on formation of ion associates with ammonium reineckate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 1999; **21**:697-702.
- 22-El-Ries, M.A. ve Khalil, S. Indirect atomic absorption determination of atropine, diphenhydramine, tolazoline, and levamisole based on formation of ion-associates with potassium tetraiodomercurate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; **25**:3-7.
- 23-Yu, C.L., Tang, Y.H., Han, X.N. ve Wu, S.J. Flow injection chemiluminescence analysis of Diphenhydramine Hydrochloride and Chlorpheniramine maleate. *Instrumentation Science & Technology* 2006; **34**,529-536.
- 24-Zhao, C.Z., Chai, X.L., Tao, S.C., Li, M.H. ve Jiao, K. Selective determination of Diphenhydramine in compound pharmaceutical containing Ephedrine by flow-injection electrochemiluminescence. *Analytical Sciences* 2008; **24**,535-538.
- 25-Elshahat, M.F., Badei, M.M.A. ve Daifullah , A.A.M. Spectrophotometric determination of Ephedrine HCl , Cinchonine HCl , Chlorpheniramine Maleate , Atropine Sulfate and Diphenhydramine HCl by solvent-extraction of reineckate complexes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 1992; **54**,175-181.
- 26-Basavaiah, K. ve Charan, V.S. Titrimetric and spectrophotometric assay of some antihistamines through the determination of the chloride of their hydrochlorides. *Farmaco* 2002; **57**, 9-17.

- 27-Goicoechea, H.C., Olivieri, A.C. Chemometric assisted simultaneous spectrophotometric determination of four-component nasal solutions with a reduced number of calibration samples. *Analytica Chimica Acta* 2002; **453**:289-300.
- 28-Tripparat, P., Lapanantnoppakhun, S., Jakmune, J. ve Grudpan, K. Determination of diphenhydramine hydrochloride in some single tertiary alkylamine pharmaceutical preparations by flow injection spectrophotometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; **30**:105-112.
- 29-Hassan,W.S., El-Henawee, M.M., Gouda,A.A. Spectrophotometric determination of some histamine H1-antagonists drugs in their pharmaceutical preparations. *Spectrochimica Acta Part A* 2008;**69**:245-255.
- 30-Ulu,S.T.,Elmalı,F.T. Spectrophotometric method for the determination, validation, spectroscopic and thermal analysis of diphenhydramine in pharmaceutical preparation. *Spectrochimica Acta Part A* 2010; **77**:324-329.
- 31-El-Didamony,A.M.,Moustafa,M.A. Spectrophotometric determination of diphenhydramine hydrochloride in pharmaceutical preparations and biological fluids via ion-pair formation. *Arabian Journal of Chemistry* 2010; **3**:265-270.
- 32-Souri, E., Rahimi, A., Ravari, N.S. ve Tehrani, M.B. Development of a rapid derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of Acetaminophen, Diphenhydramine and Pseudoephedrine in tablets. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2015; **14**,435-442.
- 33-Calatayud, J.M., Marinez, F.J.B. ve Vives , S.S. Fluorometric-determination of Diphenhydramine by flow-injection analysis. *Mikrochimica Acta* 1992; **106**,319-325.
- 34-Muller, E.E. ve Sherma, J. Quantitative HPTLC determination of Diphenhydramine Hydrochloride in tablet, gelcap, and capsule antihistamine pharmaceuticals. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1999; **22**,153-159.
- 35-DiGregorio, D. ve Sherma, J. Determination of the sleep aid ingredients Diphenhydramine Hydrochloride and Doxylamine Succinate in pharmaceutical products by quantitative HPTLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1999; **22**,1599-1606.
- 36-Okamoto, H., Uetake, A., Tamaya, R., Nakajima, T., Sagara, K. ve Ito, Y. Simultaneous determination of ingredients in an ointment by hydrophobic interaction electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A* 2001; **929**:133-141.

- 37-Yoo, S.D., Axelson, J.E. ve Rurak, D.W. Determination of Diphenhydramine in biological-fluids by capillary gas-chromatography using nitrogen-phosphorus detection— application to placental – transfer studies in pregnant sheep. *Journal of Chromatography* 1986; **378**,385-393.
- 38-Raj, S.V., Kapadia, S.U. ve Argekar, A.P. Simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride and diphenhydramine hydrochloride in cough syrup by gas chromatography (GC). *Talanta* 1998; **46**:221-225.
- 39-Hassegawa, C., Kumazawa, T., Lee, X.P., Fujishiro, M., Kuriki, A., Marumo, A. ve ark. Simultaneous of ten antihistamine drugs in human plasma using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 2006; **20**,537-543.
- 40-Pujadas, M., Pichini, S., Civit,E., Snamatarina, E., Perez, K. Ve de la Torre, R. A simple and reliable procedure for the determination of psychoactive drugs in oral fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; **44**,594-601.
- 41-Foltz, J., Abdul Mottaleb, M. Mohammed, Meziani, M.J. ve Islam, M.R. Simultaneous detection and quantification of select nitromusks, antimicrobial agent, and antihistamine in fish of grocery stores by gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 2014;**107**:187-193.
- 42-Barbas,C.,Garcia,A.,Saavedra,L.,Castro,M. Optimization and validation of a new method for the determination of caffeine, 8-chlorotheophylline and diphenhydramine by isocratic high-performance liquid chromatography Stress test for stability evaluation. *Journal of Chromatography*, 2000,**870**:97-103.
- 43-Lau,O.W.,Mok,C.S. High-performance liquid chromatographic determination of active ingredients in cough-cold syrups with indirect conductometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1995,**693**:45-54.
- 44-Dönmez,Ö.A.,Aşçı,B.,Bozdoğan,A.,Sungur,S. Simultaneous determination of potassium guaiacolsulfonate, guaifenesin, diphenhydramine HCl and carbetapentane citrate in syrups by using HPLC-DAD coupled with partial least squares multivariate calibration. *Talanta*,2011,**83**:1601-1605.
- 45-Ali, M.S., Ghorri, M., Rafiuddin, S. ve Khatri, A.R. A new hydrophilic interaction liquid chromatographic (HILIC) procedure for simultaneous determination of pseudoephedrine hydrochloride (PSH), diphenhydramine hydrochloride (DPH) and

dextromethorphan hydrobromide (DXH) in cough-cold formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; **43**:158-167.

46-El-Gindy, A., Emar, S., ve Mostafa, A. Application and validation of chemometric-assisted spectrophotometry and liquid chromatography for the simultaneous determination of six component pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; **41**:421-430.

47-Wang, C., Fan, G.R., Lin, M., Chen, Y., Zhao, W.Q. ve Wu, Y.T. Development and validation of a liquid chromatography /tandem mass spectrometry assay for the simultaneous determination of D-amphetamine and diphenhydramine in beagle dog plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007; **854**:48-56.

48-Gergov, M., Robson, J.N., Ojanpera, I., Heinonen, O.P. ve Vuori, E. Simultaneous screening and quantitation of 18 antihistamine drugs in blood by liquid chromatography ionspray tandem mass spectrometry. *Forensic Science International* 2001; **121**:108-115.

49-Martinez-Algaba, C., Bermudez-Saldana, J.M., Villanueva-Camanas, R.M., Segrado, S. ve Medina-Hernandez, M.U. Analysis of pharmaceutical preparations containing antihistamine drugs by micellar liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; **40**:312-321.

50-Tanoue, R., Nomiyama, K., Nakamura, H., Hayashi, T., Kim, J.W., Isobe, T. ve ark. Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *Journal of Chromatography A* 2014; **1355**:193-205.

51-Mahato, S.B., Sahu, N.P. ve Maitra, S.K. Simultaneous determination of Chlorpheniramine and Diphenhydramine in cough syrups by reversed-phase ion-pair high-performance liquid-chromatography. *Journal of Chromatography* 1986; **351**,580-584.

52-Selinger, K., Prevost, J. ve Hill, H.M. High-performance liquid-chromatography method for the determination of Diphenhydramine in human plasma. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* 1990; **526**,597-602.

53-Qi, M.L., Wang, P., Zhou, L. ve Sun, Y. Simultaneous determination of four active components in a compound formulation by liquid chromatography. *Chromatographia* 2003; **58**,183-186.

54-Kumar, S., Rurak, D.W. ve Riggs, K.W. Simultaneous determination of Diphenhydramine, its N-oxide metabolite and deuterium-labeled analogues in ovine



plasma and urine using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* 1998; **33**,1171-1181.

55-Ye, L. ve Stewart, J.T. HPLC determination of an Ondansetron and Diphenhydramine mixture in 0.9% sodium chloride injection. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1996; **19**,711-718.

56-Park, J.A., Zhang, D., Kim, D.S., Kim, S.K., Cho, K.S., Jeong, D. Ve ark. Single-step multiresidue determination of ten multiclass veterinary drugs in pork, milk, eggs using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* 2015; **38**,2772-2780.

57-Bayen, S., Estrada, E.S., Juhel, G. Ve Kelly, B.C. Direct injection of tissue extracts in liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of pharmaceuticals and other contaminants of emerging concern in mollusks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2015; **407**,5553-5558.

58-Ge, Z.K., Luo, Y.H, Zhao, Y.J., Zhang, Y.J., Zhang, H. ve Tian, C.C. Simultaneous determination of Ibuprofen and Diphenhydramine HCl in orally disintegrating tablets and its dissolution by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2011; **5**,2100-2105.

59- Ma, J.S., Zhang, M.L., Shentu, Y.P., Zhang, Y.Q., Fan, X.F. ve Gong, Y.S. Determination of Diphenhydramine Hydrochloride in rabbit plasma by LC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study. *Latin American Journal of Pharmacy* 2011; **30**,1372-1376.

60-Walters-Thompson, K.M. ve Mason, W.D. Method for the determination of Diphenhydramine in rabbit whole-blood by high-performance-liquid-chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection in conjunction with gas-chromatography (GC) with mass selective detection (MSD). *Pharmaceutical research* 1992; **9**,929-932.

61-Yuan, H.P. ve Locke, D.C. High-performance liquid-chromatographic method for the determination of Diphenhydramine in liquid and solid drug-dosage and its application to stability testing. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1991; **17**,2319-2331.

62-Concheiro, M., de Castro, A., Quintela, O., Cruz, A. Ve Lopez-Rivadulla, M. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2008; **391**,2329-2338.

- 63-Dong, Y.M., Chen, X.F., Chen, Y.L., Chen, X.G. ve Hu, Z.D. Separation and determination of pseudoephedrine, dextromethorphan, diphenhydramine and chlorpheniramine in cold medicines by noneaqueous capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis* 2005; **39**:285-289.
- 64-Marchesini, A.F., Williner, M.R., Mantovani, V.E., Robles, J.C. ve Goicoechea, H.C. Simultaneous determination of naphazoline, diphenhydramine and phenylephrine in nasal solutions by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; **31**:39-46.
- 65-Gomez, M.R., Olsina, R.A., Martinez, L.D. ve Silva, M.F. Simultaneous determination of dextromethorphan, diphenhydramine and phenylephrine in expectorant and decongestant syrups by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2002; **30**:791-799.
- 66-Liu, J.F., Cao, W.D., Yang, X.R. ve Wang, E.K. Determination of diphenhydramine by capillary electrophoresis with tris (2,2-bipyridyl)ruthenium(II) electrochemiluminescence detection. *Talanta* 2003; **59**:453-459.
- 67-Rambla-Alegre, M., Peris- Vicente, J., Esteve-Romero, J., Capella-Peiro, M.E. ve Bose, D. Capillary electrophoresis determination of antihistamines in serum and pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta* 2010; **666**:102-109.
- 68-Gomez, M.R., Sombra, L., Olsina, R.A., Martinez, L.D. ve Silva, M.F. Development and validation of a capillary electrophoresis method for the determination of codeine, diphenhydramine, ephedrine and noscapine in pharmaceuticals. *Il Farmaco* 2005; **60**:85-90.
- 69-Li, J., Zhong, D.F., Zhang, L.G., Pan, Y., Fan, G.R. ve Wu, Y.T. Determination of D-Amphetamine and Diphenhydramine in dog plasma by a 96-well format liquid-liquid extraction and capillary cone electrophoresis. *Drug Metabolism Reviews* 2008; **40**, 49.
- 70-Youssef, A.F.A. ve Farghali, R.A. Utilization of ion-associate formation in conductimetric determination of some antihistamines in pharmaceutical formulations. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* 2006; **51**:288-296.
- 71-Frag, E.Y.Z., Mohamed, G.G. ve El-Sayed, W.G. Potentiometric determination of antihistamine diphenhydramine hydrochloride in pharmaceutical preparations and biological fluids using screen-printed electrode. *Bioelectrochemistry* 2011; **82**:79-86.
- 72-Lidocaine hydrochloride, PubChem, Erişim 30.10.2015, [http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lidocaine\\_hydrochloride#section=Top](http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lidocaine_hydrochloride#section=Top)

- 73-Lidocaine hydrochloride, Chemical Book, Erişim 30.10.2015, [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_US\\_CB4117973.aspx](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_US_CB4117973.aspx)
- 74- Rx Media 2015, Lidokain hidroklorür
- 75-Kayaalp, O., editor. *Akılci Tedavi Yönünden Tibbi Farmakoloji*, Pelikan Yayıncılık, 2012.
- 76- Nerin, C., Garnica, A. ve Cacho, J. Indirect determination of lidocaine by atomic-absorption spectrophotometry. *Analytical Letters* 1991; **24**,1847-1859.
- 77- Saleh, G. ve Askal, H.F. Spectrophotometric determination of certain local-anesthetics in pharmaceutical preparations. *Analytical Letters* 1995; **28**,2663-2671.
- 78- Nemcova, I., Rychlovsky, P., Tomankova, V. ve Zivanovic, L. Extraction spectrophotometric determination of lidocaine using flow injection analysis. *Analytical Letters* 2001; **34**,2457-2464.
- 79- Ivanov, V.M., Adamova, E.M. ve Figurowskaya, V.N. Alizarin Red S as a colored agent for the extraction-photometric and color measurement determination of some local anesthetic organic compounds. *Journal of Analytical Chemistry* 2010; **65**,912-920.
- 80-Ivanov, V.M., Adamova, E.M. ve Figurowskaya, V.N. Sorption- spectrophotometry and chromaticity determination of some organic bases used in local anesthesia using Alizarin Red C. *Journal of Analytical Chemistry* 2012; **67**,429-436.
- 81-Penido, C.A.F.D., Silveira, L. ve Pacheco, M.T.T. Quantification of binary mixtures of cocaine and adulterants using dispersive raman and FT-IR spectroscopy and principal component regression. *Instrumentation Science & Technology* 2012; **40**,441-456.
- 82-Willis, C.R., Greenblatt, D.J., Benjamin, D.M. ve Abernethy, D.R. Simultaneous determination of lidocaine and its deethylated metabolites using gas-liquid-chromatography with nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography* 1984; **307**,200-205.
- 83-Kruczek, M.E. A rapid gas-liquid-chromatographic determination of serum lidocaine using a nitrogen-phosphorus specific detector. *Journal of Pharmacological Methods* 1981; **5**,137-141.
- 84-Arimoto, H. ve Shiomi, K. Determination of lidocaine in human serum by capillary gas-chromatography with surface-ionization detection. *HRC- Journal of High Resolution Chromatography* 1991; **14**,672-675.

- 85- Hattori, H., Yamamoto, S., Yamada, T. ve Suzuki, O. Determination of local-anesthetics in body-fluids by gas-chromatography with surface-ionization detection. *Journal of Chromatography- Biomedical Applications* 1991; **564**,278-282.
- 86-Lorec, A.M., Bruguerolle, B., Attolini, L. ve Roucoules, X. Rapid simultaneous determination of lidocaine, bupivacaine, and their 2 main metabolites using capillary gas-liquid- chromatography with nitrogen phosphorus detector. *Therapeutic Drug Monitoring* 1994; **16**,592-595.
- 87-Grouls, R.J.E., Machielsen, E., Korsten, H.H.M., Hellebrekers, L.J., Breimer, D.D. ve Ackerman, E.W. Capillary gas-chromatographic method for the determination of N-butyl-P-aminobenzoate and lidocaine in plasma samples. *Journal of Chromatography B- Biomedical Applications* 1995; **673**,51-57.
- 88-Demedts, P., Wauters, A., Franck, F. ve Neels, H. Simultaneous determination of lidocaine, bupivacaine, and their two metabolites using gas chromatography and a nitrogen- phosphorus detector: Selection of stationary phase and chromatographic conditions. *Therapeutic Drug Monitoring* 1996; **18**,208-209.
- 89-Laroche, N., Leneveu, A. ve Flouvat, B. Capillary gas chromatographic method for the determination of small concentrations of monoethylglycinexylidide and lidocaine in plasma. *Journal of Chromatography B* 1998; **716**, 375-381.
- 90-Liu, Y., Griesemer, E.C., Budd, R.D. ve Noguchi, T.T. Determination of lidocaine in postmortem fluids and tissues. *Journal of Chromatography* 1983; **268**,329-335.
- 91-Koster, E.H.M., Hofman, N.S.K. ve de Jong, G.J. Direct solid-phase microextraction with combined gas and liquid chromatography for the determination of lidocaine in human urine. *Chromatographia* 1998; **47**,678-684.
- 92- Koster, E.H.M., Wemes, C., Morsink, J.B. ve de Jong, G.J. Determination of lidocaine in plasma by direct solid- phase microextraction combined with gas chromatography. *Journal of Chromatography B* 1999; **739**,175-182.
- 93-Ohshima, T. ve Takayasu, T. Simultaneous determination of local anesthetics including ester-type anesthetics in human plasma and urine by gas chromatography mass spectrometry with solid- phase extraction. *Journal of Chromatography B* 1999; **726**,185-194.
- 94-Van Hout, M.W.J., de Zeeuw, R.A., Franke, J.P., de Jong, G.J. Solid-phase extraction- thermal desorption-gas chromatography with mass selective detection for the determination of drugs in urine. *Chromatographia* 2003; **57**,221-225.

- 95-Yamini, Y., Seidi, S., Feizbakhsh, R., Baheri, T. ve Rezazadeh, M. Liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents followed by gas chromatography with mass spectrometry as an efficient for the preconcentration and determination of cocaine, ketamine, and lidocaine in human urine samples. *Journal of Separation Science* 2014; **37**,2364-2371.
- 96-Smith, D.J. Determination and temperature effects of lidocaine (lignocaine) hydrochloride, epinephrine, methylparaben, 2,6-dimethylaniline, and para-hydroxybenzoic acid in USP lidocaine injection by ion-pair reversed-phase high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatographic Science* 1981; **19**,253-258.
- 97-Kabra, P.M., Chen, S.H. ve Marton, L.J. Liquid-chromatographic determination of antidysrhythmic drugs—procainamide, lidocaine, quinidine, disopyramide, and propranolol. *Therapeutic Drug Monitoring* 1981; **3**,91-101.
- 98-Flood, J.G., Bowers, G.N. ve McComb, R.B. Simultaneous liquid-chromatographic determination of 3 anti-arrhythmic drugs- disopyramide, lidocaine, and quinidine. *Clinical Chemistry* 1980; **26**,197-200.
- 99-Verbesselt, R., Tjandramaga, T.B. ve Deschepper, P.J. High-performance liquid-chromatographic determination of 12 antiarrhythmic drugs in plasma using solid-phase column extraction. *Therapeutic Drug Monitoring* 1991; **13**,157-165.
- 100-Luzzi, F.A., Wenger, T.L., Klinger, J.K., Barchowsky, A. ve Strauss, H.C. Simultaneous determination of lidocaine and its metabolites in plasma and myocardium. *Journal of Chromatography* 1984; **311**,291-299.
- 101-Halbert, M.K. ve Baldwin, R.P. Determination of lidocaine and active metabolites in blood-serum by liquid-chromatography with electrochemical detection. *Journal of Chromatography* 1984; **306**,269-277.
- 102-Smith, F.M. ve Nuessle, N.O. HPLC method for determination of lidocaine in admixture with dextrose injection. *Analytical Letters Part B- Clinical and Biochemical Analysis* 1981; **14**,567-575.
- 103-Sattler, A., Kramer, I., Jage, J., Vrana, S., Kleemann, P.P. ve Dick, W. Development of a HPLC-system for quantitative measurement of lidocaine and bupivacaine in patients plasma during postoperative epidural pain therapy. *Pharmazie* 1995; **50**,741-744.

- 104-Klein, J., Fernandes, D., Gazarian, M., Kent, G. ve Koren, G. Simultaneous determination of lidocaine, prilocaine and the prilocaine metabolite o-toluidine in plasma by high performance liquid- chromatography. *Journal of Chromatography B-Biomedical Applications* 1994; **655**, 83-88.
- 105- Raikos, N., Theodoridis, G., Alexiadou, E., Gika, H., Argiriadou, H., Parlaapani, H. ve arkadaşları. Analysis of anesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. *Journal of Separation Science* 2009; **32**,1018-1026.
- 106-Escuder-Gilabert, L., Sagrado, S., Villanueva- Camanas, R.M. ve Medina-Hernandez, M.J. Analysis of pharmaceuticals containing local anesthetics by micellar chromatography and spectrophotometric detection. *Chromatographia* 1999; **49**,85-90.
- 107-Parissi- Poulou, M. ve Panderi, I. Determination of hyoscine n-butyl-bromide, and lidocaine hydrochloride, and paracetamol in injection forms using solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, and UV-vis spectrophotometry. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 1999; **22**,1055-1068.
- 108-Lotfi, H., Debord, J., Dreyfus, M.F., Marquet, P., BenRhaïem, M. ve Feiss, P. ve arkadaşları. Simultaneous determination of lidocaine and bupivacaine in human plasma: Application to pharmacokinetics. *Therapeutic Drug Monitoring* 1997; **19**,160-164.
- 109-Barat, S.A., Kardos, S.A. ve Abdel Rahman, M.S. Development and validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of cocaine, its metabolites and lidocaine. *Journal of Applied Toxicology* 1996; **16**,215-219.
- 110-Kakiuchi, Y., Fukuda, T., Miyabe, M., Homma, M., Toyooka, H. ve Kohda, Y. Chromatographic determination of free lidocaine and its active metabolites in plasma from patients under epidural anesthesia. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2002; **40**, 493-498.
- 111-Liawruangrath, S., Liawruangrath, B. ve Pibool, P. Simultaneous determination of tolperison and lidocaine by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001; **26**,865-872.
- 112-Abdel-Rehim, M., Bielenstein, M., Askemark, Y., Tyrefors, N. ve Arvidsson, T. High-performance liquid chromatography-tandem electrospray mass spectrometry for the determination of lidocaine and its metabolites in human plasma urine. *Journal of Chromatography B* 2000; **741**,175-188.

- 113-Kang, S.Y., Wang, H.B., Ma, M., Chen, B. ve Yao, S.Z. Determination of lidocaine in urine by liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 2004; **32**,1467-1470.
- 114-Piwowarska, J., Kuczynka, J. ve Pachecka, J. Liquid chromatographic method for the determination of lidocaine and monoethylglycine xylidide in human serum containing various concentrations of bilirubin for the assessment of liver function. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2004; **805**,1-5.
- 115-Youngvises, N., Liawruangrath, B. ve Liawruangrath, S. Simultaneous micellar LC determination of lidocaine and tolperisone. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2003; **31**,629-638.
- 116-Maes, A., Weiland, L., Sandersen, C., Gasthuys, F., De Backer, P. ve Croubels, S. Determination of lidocaine and its two N-desethylated metabolites in dog and horse plasma by high-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2007; **852**,180-187.
- 117-Chen, L.L., Liao, L.C., Zuo, Z., Yan, Y.Y., Yang, L. ve Fu, Q. Simultaneous determination of nikethamide and lidocaine in human blood and cerebrospinal fluid by high performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2007; **43**,1757-1762.
- 118-Ma, M., Kang, S.Y., Zhao, Q., Chen, B. ve Yao, S.Z. Liquid- phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for the determination of local anesthetics in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006; **40**,128-135.
- 119-Qin, W.W., Jiao, Z., Zhong, M.K., Shi, X.J., Zhang, J. ve Li, Z.D. Simultaneous determination of procaine, lidocaine, ropivacaine, tetracaine and bupivacaine in human plasma by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B- Analytical technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2010; **878**,1185-1189.
- 120-Jancic-Stojanovic, B., Malenovic, A., Markovic, S., Ivanovic, D. ve Medenica, M. Optimization and validation of an RP-HPLC method for analysis of hydrocortisone acetate and lidocaine in suppositories. *Journal of AOAC International* 2010; **93**,102-107.

121-De Orsi, D., Pellegrini, M., Marchei, E., Nebuloni, P. ve Gallinella, B. High performance liquid chromatography- diode array and electrospray-mass spectrometry analysis of vardenafil, sildenafil, tadalafil, testosterone and local anesthetics in cosmetic creams sold on the internet web sites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2009; **50**,362-369.

122-Mohammad, M.A.A. LC determination of lidocaine and prilocaine containing risky impurities and application to pharmaceuticals. *Chromatographia* 2009; **70**,563-568.

123-Raikos, N., Theodoridis, G., Alexiadou, E., Gika, H., Argiriadou, H., Parlaapani, H. ve arkadaşları. Analysis of anesthetics and analgesics in human urine by headspace SPME and GC. *Journal of Separation Science* 2009; **32**,1018-1026.

124-Dinc, E. ve Baleanu, D. Fractional- Continuous wavelet transforms and ultra-performance liquid chromatography for the multicomponent analysis of a ternary mixture containing thiamine, pyridoxine, and lidocaine in ampules. *Journal of AOAC International* 2012; **95**,903-912.

125-Belal, T.S. ve Haggag, R.S. Gradient HPLC-DAD stability indicating of miconazole nitrate and lidocaine hydrochloride in their combined oral gel dosage form. *Journal of Chromatographic Science* 2012; **50**,401-409.

126-Caris, J.A., Silva, B.J.G., Moises, E.C.D., Lanchote, V.L. ve Queiroz, M.E.C. Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid- phase microextraction coupled with LC- UV for pharmacokinetic study. *Journal of Separation Science* 2012; **35**,734-741.

127-Ter Weijden, E., Van den Broek, M.P.H. ve Ververs, F.F.T. Easy and fast LC-MS/MS determination of lidocaine and MEGX in plasma for therapeutic drug monitoring in neonates with seizures. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2012; **881-882**, 111-114.

128-El-Kommos, M.E., Mohamed, N.A. ve Hakiem, A.F.A. Selective reversed phase high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of some pharmaceutical binary mixtures containing NSAIDs. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2012; **35**,2188-2202.

129-Pendela, M., Kahsay, G., Baekelandt, I., Van Schepdael, A. ve Adams, E. Simultaneous determination of lidocaine hydrochloride, hydrocortisone and nystatine in a pharmaceutical preparation by RP-LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2011; **56**,641-644.



130-Chu, B., Lou, D.J., Yu, P.F., Hu, S.N. ve Shen, S. Development of an on-column enrichment technique based on C-18- functionalized magnetic silica nanoparticles for the determination of lidocaine in rat plasma by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2011; **1218**,7248-7253.

131-Belal, T.S., Shaalan, R.A. ve Haggag, R.S. Gradient HPLC-diode array detector stability-indicating determination of lidocaine hydrochloride and cetylpyridinium chloride in two combined oral gel dosage forms. *Journal of AOAC International* 2011; **94**,503-512.

132-Hoonka, S., Durgbanshi, A., Esteve-Romero, J., Dubey, N.P. ve Bose, D. Simultaneous determination of three stupefacient in foodstuff using high-performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2014; **37**,1287-1297.

133-Subhra, H., Prakash, D.N., Abhilasha, D., Josep, E.R. ve Devasish, B. Simultaneous determination of psychoactive compounds in foodstuff using micellar liquid chromatography with direct injection. *Journal of AOAC International* 2014; **97**,409-414.

134-Floriani, G., Gasparetto, J.C., Pontarolo, R. ve Gocalves, A.G. Development and validation of an HPLC-DAD method for simultaneous determination of cocaine, benzoic acid, benzoylecgonine and the main adulterants found in products based on cocaine. *Forensic Science International* 2014; **235**,32-39.

135-Zargar, B. ve Hatamine, A. Hollow fiber liquid based microextraction combined with high-performance liquid-chromatography for the analysis of lidocaine in biological and pharmaceutical samples. *Analytical Methods* 2014; **6**,2506-2511.

136-Plenis, A., Konieczna, L., Miekus, N. ve Baczek, T. Development of the HPLC method for simultaneous determination of lidocaine hydrochloride and tribenoside along with their impurities supported by the QSRR approach. *Chromatographia* 2013; **76**,255-265.

137-He, Y.T., Peng, J.D., Tang, J.X. ve Zhang, C. Incorporation of high performance liquid chromatography with resonance Rayleigh scattering detection for determination of procaine and lidocaine in human plasma. *Analytical Methods* 2013; **5**,7110-7116.

138-Cao, W.D., Liu, J.F., Qiu, H.B., Yang, X.R. ve Wang, E.K. Simultaneous determination of tramadol and lidocaine in urine by end-column capillary

electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Electroanalysis* 2002; **14**, 1571-1576.

139-Li, J.G. ve Ju, H.X. Simultaneous determination of ethamsylate, tramadol and lidocaine in human urine by capillary electrophoresis with electrochemiluminescence detection. *Electrophoresis* 2006; **27**,3467-3474.

140-Chik, Z., Johnston, A., Tucker, A.T., Burn, R.T. ve Perrett, D. Validation and application of capillary electrophoresis for the analysis of lidocaine in a skin tape stripping study. *Biomedical Chromatography* 2007; **21**,775-779.

141-Sun, H.W., Li, L.Q. ve Su, M. Simultaneous determination of lidocaine, proline and lomefloxacin in human urine by CE with electrochemiluminescence detection. *Chromatographia* 2008; **67**,399-405.

142-Lombardo-Agui, M., Cruces-Blanco, C. ve Garcia-Campana, A.M. Capillary zone electrophoresis with diode-array detection for analysis of local anaesthetics and opium alkaloids in urine samples. *Journal of Chromatography B- Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2009; **877**,833-836.

143-Liu, Y.M., Li, J. ve Yang, Y. Separation and determination of anesthetics by capillary electrophoresis with mixed micelles of sodium dodecyl sulfate and Tween 20 using electrochemiluminescence detection. *Luminescence* 2013; **28**, 673-678.

144-Akyıl, G.B., Kara, H.E.S., Bas, S.Y., Ertas, N. Goger, N.G. Simultaneous determination of dexpanthenol, lidocaine hydrochloride, and mepyramine maleate in combined pharmaceutical gel by capillary electrophoresis. *Turkish Journal Of Chemistry* 2014; **38**,756-764.

145-Hassan, S.S.M. ve Ahmed, M.A. Newliquid membrane-electrode for determination of lidocaine in local-anesthetic formulations. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 1986; **69**,618-620.

146-Oliveira, R.T.S., Salazar-Banda,G.R., Ferreira, V.S., Oliveira, S.C. ve Avaca, L.A. Electroanalytical determination of lidocaine in pharmaceutical preparations using boron- doped diamond electrodes. *Electroanalysis* 2007; **19**,1189-1194.

147-Tan, G., Bolat, G., Onur, M.A. ve Abaci, S. Determination of lidocaine based on electrocatalysis of a chemically modified electrode. *Turkish Journal of Chemistry* 2012; **36**,593-600.

- 148-Fretthold, D., Jones, P., Sebrosky, G. ve Sunshine, I. Testing for Basic Drugs in Biological Fluids by Solvent Extraction and Dual Capillary GC/NPD. *Journal of Analytical Toxicology* 1986;**10**,10-14.
- 149- Cox, R.A., Crifasi, J.A., Dickey, R.E., Ketzler, S.C. ve Pshak, G.L. A Single-Step Extraction for Screening Whole Blood for Basic Drugs by Capillary GC/NPD. *Journal of Analytical Toxicology* 1989;**13**,224-228.
- 150-Pierce, W.O, Lamoreaux, T.C. ve Urry, F.M. A new,rapid gas chromatography method for the detection of basic drugs in postmortem blood, using a nitrogen phosphorus detector. Part I. Qualitative analysis. *Journal of Analytical Toxicology* 1978;**2**,26-31.
- 151-De la Torre, C.S., Martinez, M.A. ve Almarza, E. Determination of several psychiatric drugs in whole blood using capillary gas-liquid chromatography with nitrogen phosphorus detection: comparison of two solid phase extraction procedures. *Forensic Science International* 2005;**155**,193-204.
- 152-Sporkert, F ve Prags, F. Use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) in hair analysis for organic compounds. *Forensic Science International* 2000;**107**,129-148.
- 153-Musshoff, F., Padosch, S., Steinborn, S. ve Madea, B. Fatal blood and tissue concentrations of more than 200 drugs. *Forensic Science International* 2004;**142**,161-210.
- 154-Adamowicz, P. ve Kala, M. Simultaneous screening and determination of 128 drugs in urine by gas chromatography- electron ionization – mass spectrometry. *Forensic Science International* 2010;**198**,39-45.
- 155-Lillsunde, P. ve Korte, T. Comprehensive drug screening in urine using Solid-Phase Extraction and combined TLC and GC/MS identification. *Journal of Analytical Toxicology* 1991;**15**,71-81.
- 156-Crifasi, J.A., Bruder, M.F., Long, C.W. ve Janssen, K. Performance evaluation of Thermal Desorption System (TDS) for detection of basic drugs in forensic samples by GC-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 2006;**30**,581-592.
- 157-Hausmann, E., Wewer, H., Wellhöner, H.H. ve Weller, J.P. Lethal intoxication with diphenhydramine. *Archives of Toxicology* 1983;**53**,33-39.

- 158-Plössl, F., Giera, M. ve Bracher, F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *Journal of Chromatography A* 2006;**1135**,19-26.
- 159-Liu,S.Y., Woo, S.O. ve Koh, H.L. HPLC and GC–MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2001;**24**,983-992.
- 160-Li1, L., Liao, X., Zhang, G., Sun, D., Yang, T., Yun, K. Ve arkadaşları. Characteristics of suicides caused by drug overdose in the state of Maryland. *Journal of Forensic Science and Medicine* 2015;**1**,38-42.
- 161-Ostrea, E.M., Matias, O., Keane, C., Mac, E., Utarnachitt, R., Ostrea, A.ve arkadaşları. Spectrum of gestational exposure to illicit drugs and other xenobiotic agents in newborn infants by meconium analysis. *The Journal of Pediatrics* 1998;**133**,513-515.
- 162-Lurie, I.S., Driscoll, S.E., Cathapermal, S.S. ve Panicker, S. Determination of heroin and basic impurities for drug profiling by ultra- high- pressure liquid chromatography. *Forensic Science International* 2013;**231**,300-305.
- 163-Ohtsuji, M., Lai, J.S., Binder, S.R., Kondo, T., Takayasu,T. ve Ohshima, T. Use of REMEDI HS in emergency toxicology for a Rapid Estimate of Drug Concentrations in urine, serum, and gastric samples. *Journal of Forensic Sciences* 1996;**41**,881-886.
- 164-Kalasinsky, K.S., Schaefer, T. Ve Binder, S.R. Forensic application of an automated drug-profiling system. *Journal of Analytical Toxicology* 1995;**19**,412-418.
- 165-Logan, B.K., Stafford, D.T., Tebbett, I.R. ve Moore, C.M. Rapid screening for 100 basic drugs and metabolites in urine using cation exchange solid-phase extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection. *Journal of Analytical Toxicology* 1990;**14**,154-159.
- 166-Pesce1, A., West, C., West, R., Latyshev, S., Masters-Moore1, D., Friel, P., ve arkadaşları. Analytical considerations when monitoring pain medications by LC-MS/MS. *Analytical & Bioanalytical Techniques* 2012;**5**,1-11.
- 167-ICH Q2 (R1), Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. 2005 Kasım, Güncel Step 4 Versiyonu.
- 168-Grechnikov, A.A., Kubasov, A.E., Georgieva, V.B., Borodkov, A.S., Nikiforov, S.M., Simanovsky, Y.O. ve arkadaşları. Rapid screening of pharmaceutical drugs using thermal desorption – SALDI mass spectrometry. *Journal of Physics: Conference Series* 2012;**398**,012033.