

## Levodopa Miktar Tayini İçin Yeni Bir Spektrofotometrik Metod\*

A New Spectrophotometric Method For Quantitative Determination of Levodopa.

Hayriye AMAL\*\*

Namık EVREN\*\*\*

Levodopanın visibl alandaki spektrofotometrik miktar tayininde amonyum molibdat (1), iyod (1), 2-kloro-4-nitrobenzen-1-diazonyum naftalen-2-sülfonat (2), 4-amlnoantipirin (3), izonikotidik asit hidrazidi (4) ve amonyum şerik nitrat (5) ile renkli bir bileşigi haline getirme usullerinden yararlanılır.

Çalışmamızda, levodopanın benzhidrazid, p-nitrobenzhidrazid ve p-aminobenzhidrazid ile spektrofotometrik miktar tayini anlatılmaktadır. Bu belirteçler bu güne kadar denenmemiş bazı maddelerin levodopanın spektrofotometrik miktar tayinine olanak sağlayacak bir reaksiyon verip vermediği araştırılarak bulunmuştur.

Genellikle fenol yapısındaki maddelerden o-veya p-konumu açık olanlar  $-NH_2$  içeren belirteçlerle kinoid yapıda bir ürün verirler. Bu seriden çalışmaların en eski örneği, değişik substitue fenoller, katekol, gayakol, noradrenalin, nordefrin ve dopa gibi maddelerin 4-aminoantipirinle miktar tayini sağlayan reaksiyondur (3, 6, 7, 8, 9).

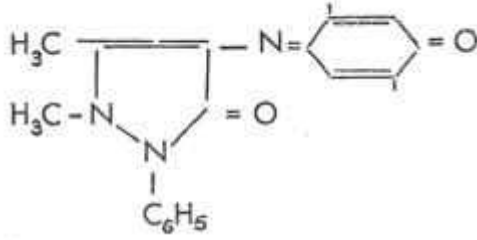
EMERSON (6) ve ROSENBLATT ve arkadaşlarına (5) göre burada oluşan renkli madde aşağıda verilen yapıdadır ve bu madde alkale pH lerde oluşur.

Redaksiyona verildiği tarih : 23 Ekim 1979.

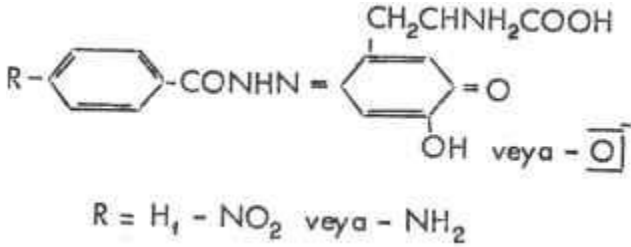
\* Ecz. Uzm. Yzb. Namık Evren'in aynı isimli doktora tezinden özetlenmiştir. Sınav Tarihi : Temmuz 1978.

\*\* Farmasötik Kimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, İstanbul Üniversitesi.

\*\*\* Farmasötik Kimya ve Farmakoloji Enstitüsü, Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Ankara.



Katekol türevi bir madde olan levodopanın fenol gruplarından birine göre p- konumu serbesttir. Esasen EMERSON ve BEEGLE (10)'e göre 4-aminoantipirinle pozitif test veren maddelerde halkaya bağlı bir keto-enol sisteminin bulunması gerekir. Bu esaslara göre bir,  $-NH_2$  grubu içeren izoniyazid veya kullandığımız hidrazidler benzer bir şekilde reaksiyon vermelidirler ve oluşan renkli maddenin yapısı



şeklinde gösterilebilir.

Reaksiyonun oluşum hızı reaktifin hidrazid grubuna göre p- konumunda taşıdığı gruba bağlı olmakta ve p- konumunda  $-NO_2$  gibi elektron çekici bir süstitüentün bulunması ile hidrazid grubunun  $-NH_2$  atomu üzerinde elektron yoğunluğu azalarak reaksiyon nonsüstitüe veya p-amino türevi belirteçlere nazaran daha çabuk yürümektedir.

Geliştirilen yöntemde kullanılan üç belirteçten p-nitrobenzhidrazid: kromofor oluşumuna on dakika gibi kısa bir süre gerektirmesi, ölçülebilen levodopa üst sınırının diğer belirteçlere nazaran yüksek

olması (15 ve 14 mcg yerine 20 mcg), doğruluğun ve duyarlılığın daha üstün bulunmasından dolayı diğer belirteçlerden üstündür.

Alt sınırın diğer spektrofotometrik metotlardan düşük olması (0.5 mcg/ml), ısıtmaya gerek olmaması, metodun çabuk ve duyarlı olması levodopa tayininde, özellikle sentetik maddelerin kontrolü sırasında ve farmasötik preparatlara uygulamada, verdiğimiz metodun tercih edilmesine neden olabilir.

### DENEYSEL KISIM

1. **Madde:** Levodopa BDH firmasından sağlandı. Katalog No: 37079

2. **Belirteç:** a) Benzhidrazid Merck firmasından temin edildi. Katalog No: 820 125

b) p-nitrobenzhidrazid\* (e.d. 210°C) ve p-aminobenzhidrazid\* (e.d.220°C) sentetize edilerek kazanıldı.

c) Diğer maddeler (NaOH,HCl...) reaktif saflığındadır.

3. **Alet:** Spektrofotometre, Pye Unicam Sp. 800. Ölçmeler 1 cm lik cam küvetlerde (OS 1000) yapıldı.

4. **Metot:** Aşağıdaki metot değişik etkenlerin absorbansa etkileri incelendikten sonra saptanmıştır. 100.0 mg levodopa 1000.0 ml lik joje bir balonda 1.0 ml N hidroklorik asit ve 300 ml suda çözülür ve su ile 1000.0 ml ye tamamlanır. Bu çözeltinin 1 ml sinde 100 mcg levodopa vardır. Bundan 10.0 ml alınıp su ile 100.0 ml ye seyreltilir. Böylece 1 ml sinde 10 mcg levodopa içeren çözelti hazırlanır. Bu çö-tiden 10.0 ml alınır. Üzerine 0.50 ml % 0.5 a/h belirteç çözeltisi ilâ-ve edilir (Çözelti A). Bundan sonra kullanılan belirteç cinsine göre aşağıdaki şekilde çalışılır.

a) Benzhidrazidle çalışma. A çözeltisine 0.40 ml 0.3 N sodyum hidrosit konur. Oda sıcaklığında 35 dakika bekletilir. Aynı şekilde hazırlanan, levodopa içermeyen şahit karşısında 480 nm de absorbans okunur.

\*p-nitrobenzhidrazid ve p-aminobenzhidrazidi sentetize ettiren sayın Doç. Dr. Ser-pil Salman'a teşekkür ederim.

b) p-nitrobenzhydrazidle çalışma. A çözeltisine 0.70 ml % 5 a/ h sodyum hidroksit ilâve edilir. Oda sıcaklığında on dakika bekletilir ve absorbans 490 nm de ölçülür.

c) p-aminobenzhydrazidle çalışma, b deki gibi çalışır. Bekletme süresi 40 dakikadır.

Spektrofotometrik analiz metodunun geliştirilmesi

**a) Çözücünün seçimi:** Miktar tayini yapılacak madde (levodopa) etanol, benzen, kloroform ve etilasetatta çözünmemektedir. Yalnız seyreltik alkali ve asitlerde çözünmektedir. Alkali çözeltileri belirteçlerle tekrarlanabilir neticeler vermediği için seyreltik asitlerdeki çözeltide çalışıldı.

Belirteç olarak kullanılacak benzhydrazid suda ve seyreltik asitlerde, p-nitrobenzhydrazid ile p-aminobenzhydrazid ise yalnız seyreltik asitlerde çözünmektedir. Bu durumda belirteçlerden suda çözünenlerin sudaki, suda çözünmeyenlerin seyreltik asitteki çözeltileri kullanılmıştır.

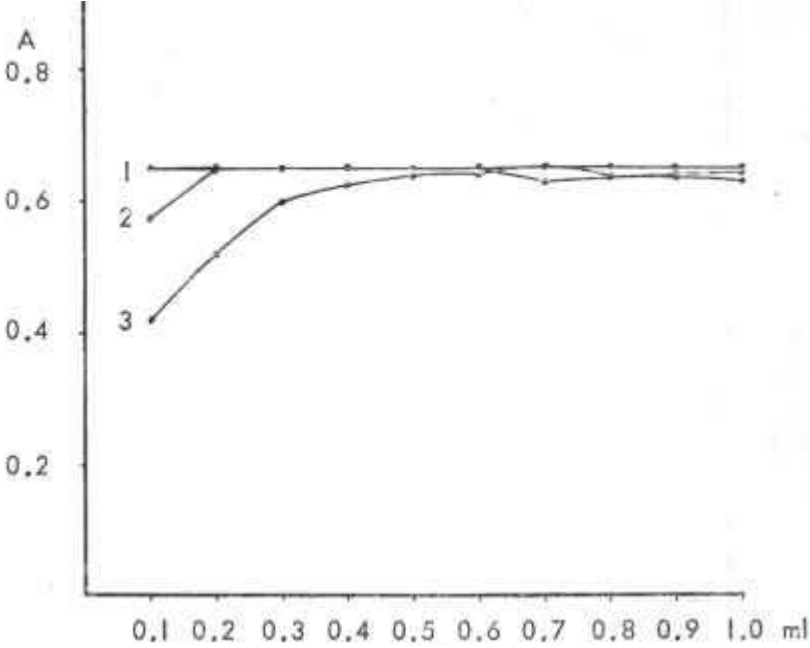
**b) Uygun dalga boyu:** Uygun dalga boyunun saptanması için 10 mcg / ml konsantrasyonda hazırlanan levodopa çözeltileri ile yukarıda verilen metoda göre hazırlanan renkli çözeltinin absorpsiyon spektrumu alınır. Uygun dalga boyu benzhydrazid için 480 nm ( $\lambda_{max}$ ), diğerleri için 490 nm ( $\lambda_{max}$ ) dir.

**c) Gerekli belirteç miktarı:** Gerekli belirteç miktarı 10 mcg/ml konsantrasyondaki levodopa çözeltisinin 10.0ml si ile araştırıldı. Benzhydrazidle çalışılırken, değişik konsantrasyonlarda hazırlanan reaktif çözeltilerinden artan miktarlar numune üzerine ilâve edildi. Diğer iki reaktif (p-nitrobenzhydrazid ve p-aminobenzhydrazid) suda çözünmediği için % 5 a/ h HCl de çözüldürülüp kullanıldığından, bunların yalnız değişik konsantrasyonlardan çözeltilerinden 0.5 er ml ile gerekli belirteç miktarı araştırıldı.

Bulgular, benzhydrazid için şekil 1 de, p-nitrobenzhydrazid ve p-aminobenzhydrazid için şekil 2 dedir.

**d) Uygun alkali miktarı:** Uygun alkali miktarı da uygun belirteç miktarı gibi 10.0 ml 10 mcg / ml konsantrasyondaki levodopa çözeltisi ile araştırıldı. Belirteç olarak benzhydrazid kullanıldığında uygun alkali miktarı 0.1N, 0.2N, 0.3N NaOH in değişen miktarları ile 0.5

ml % 0.5 a/h p-nitrobenzhydrazid veya p-aminobenzhydrazid kullanıldığında uygun alkali miktarı % 5 a/h NaOH çözeltisinin artan miktarları ile araştırıldı. Bulgular benzhydrazid için şekil 3, p-nitrobenzhydrazid ve p-aminobenzhydrazid için şekil 4 tedir.



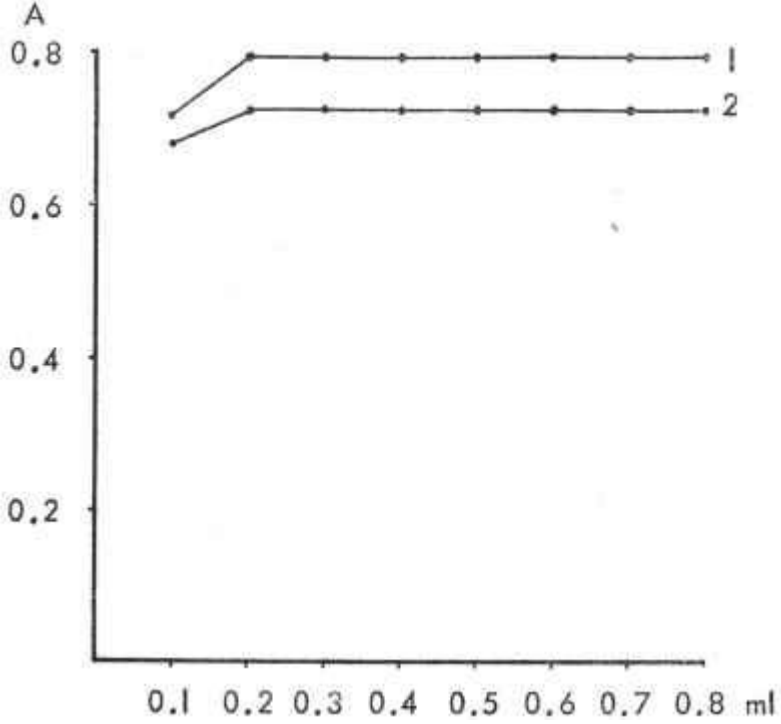
Şek. 1. Levodopa ile benzhydrazid arasındaki reaksiyona belirteç miktarının etkisi (1. % 1, 2. % 0.5 3. % 0.2 a/h benzhydrazid çözeltisi).

Deneylerde kullanılan alkali miktarına göre ortamın pH si aşağıda verilmiştir (tablo I, II).

**e) Temperaturün etkisi:** Temperaturün reaksiyona etkisini incelemek için hazırlanan numuneler ve şahitler 35 ve 50 °C da 30 dakika ısıtıldı. Üç reaktifle ayrı ayrı yapılan çalışmaların sonuçlarında sıcaklığın renk şiddetine etkisi olmadığı saptandı.

**f) Bekletme süresi:** Bu bölümde yapılan incelemeler ile renk şiddetinin en yüksek seviyeye çıkması için geçen zaman ve bu durumun devam ettiği sürenin saptanması için alet 5 er dakika ara ile ölçmeler

yapmak üzere 90 dakikaya ayarlanmış, bundan sonra yapılan ölçüme 4 saatte kadar bir değişme olmadığı (üç belirteçle) görülmüştür. Absorbansın maksimum değeri alması için geçen süre benzhidrazidte



Şek. 2. Levodopa ile p-nitrobenzhidrazid (a) ve p-aminobenzhidrazid (2) arasındaki reaksiyona belirteç miktarının etkisi

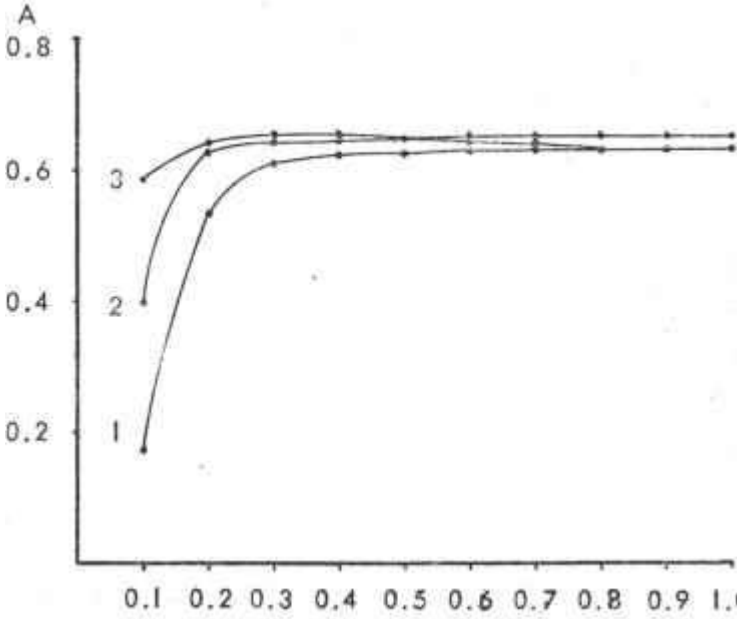
Tablo-I. Karışımların PH si (belirteç benzhidrazid).

Solusyon	10	10	10	10	10	10	10	10
A (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
0,3N.NaOH (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	0.7	0.8	
pH	11.71	12.00	12.25	12.41	12.48	12.59	12.64	12.71

Tablo-II. Karışımların pH si (belirteç p-nitrobenzhidrazid veya p-aminobenzhidrazid).

Solusyon A (ml)	10	10	10	10	10	10	10	10
%5 a/hHCl (ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
% 5 a/hNaOH (ml)	0.55	0.6	0.9	0.9	1.0	1.1	1.1	
pH	3.34	11.21	11.94	12.26	12.69	12.89	12.94	12.99

35 dakika, p-nitrobenzhidrazidte 10 dakika ve p-aminobenzhidrazidte 40 dakikadır (Şek. 5).

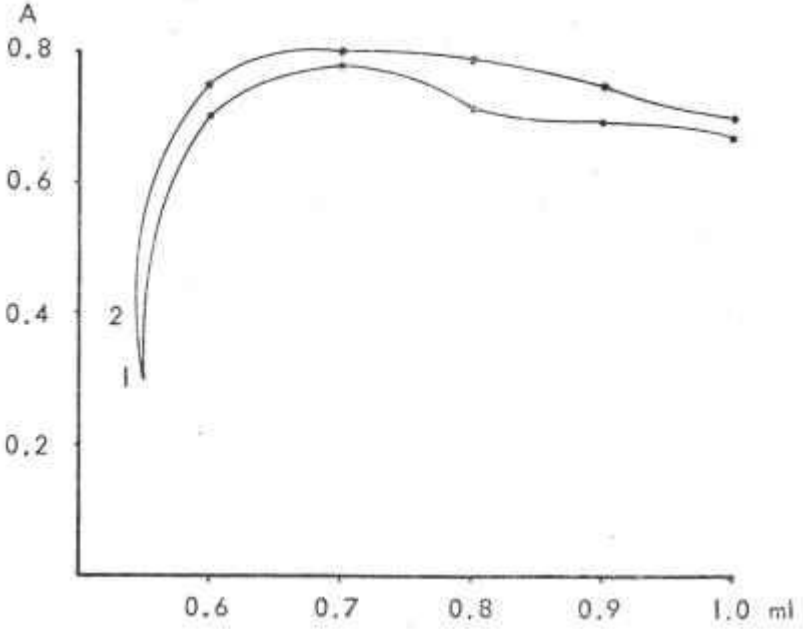


Şek. 3. Levodopa ile benzhidrazid arasındaki reaksiyona alkali miktarının etkisi (1.0.1N NaOH 2.0. 2N NaOH, 3. 0.3N NaOH)

**g) Çözeltilerin konulma sırası:** Bu çalışmada numune üzerine belirteç ve alkalinin ilâve ediliş sırası çok önemlidir. Çünkü levodopa çözeltisi alkali pH ye getirildikten sonra belirteç ilâve edildiğinde pH ye ve zamana bağlı olarak reaksiyon ya hiç yürümekte veya değişken ve daima gittikçe düşen absorbanlar ölçülmektedir. Bu nedenle levodopa çözeltisi üzerine önce belirteç sonra alkali ilâvesi zorunludur.

#### Miktar Tayinine Esas Alınan Koşullar

Levodopa ile benzhidrazid, p-nitrobenzhidrazid veya p-aminobenzhidrazidin alkali ortamda reaksiyona girmesiyle meydana gelen renkten istifade edilerek spektrofotometrik miktar tayini için çalışma koşulları yukarıda bildirilen incelemelerde varılan sonuçlara göre düzenlendi.

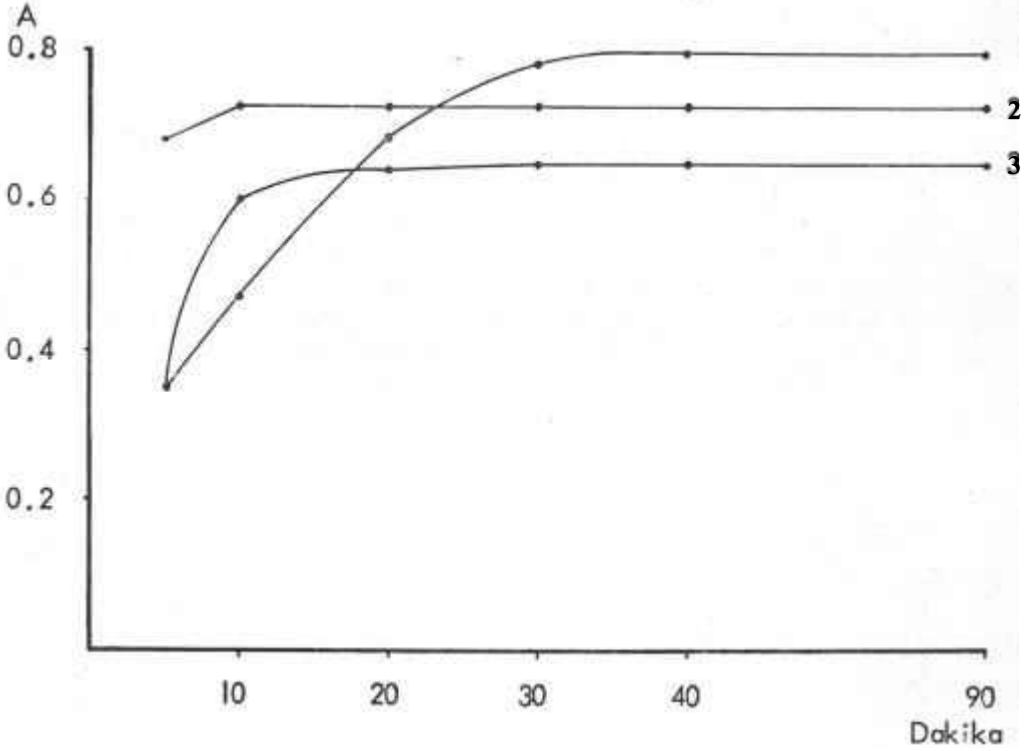


Şek. 4. Levodopa ile p-nitrobenzhydrazid (1) veya p-aminobenzhydrazid (2) arasındaki reaksiyona alkali miktarının etkisi

1. Çalışma, sulu ortamda yapılmalıdır.
2. Maksimum absorpsiyonun bulunduğu dalga boyu benzhidrazid ile 480 nm, p-nitrobenzhydrazid ve p-aminobenzhydrazid ile 490 nm dir.
3. Uygun belirteç miktarı (10.0 ml numune için):
  - a. 0.5 ml % 0.5 a/h Benzhidrazidin sudaki çözeltisi,
  - b. 0.5 ml % 0.5 a/h p-nitrobenzhydrazidin % 5 a/h HGI deki çözeltisi,
  - c. 0.5 ml % a/h p-aminobenzhydrazidin %5 a/h HGI deki çözeltisi,
4. Her üç belirteçle de reaksiyonun yürümesi için en iyi pH 12.4 tür. Bunun sağlamak için belirteç benzhidrazid ise 0.40 ml 0.3N



### Levodopa Miktar Tayini.



Şek. 5. Bekletme süresinin absorbansa etkisi (1. Benzhidrazid, 2. p-nitrobenzhidrazid, 3. p-aminobenzhidrazid ile)

NaOH, belirteç p-nitrobenzhidrazid veya p-aminobenzhidrazid ise ise 0.70 ml % 5 a / h NaOH ilâve edilmelidir.

5. Isıtma renk şiddetini arttırmadığından miktar tayini oda sıcaklığında yapılabilir.

6. Rengin en yüksek absorpsiyon değeri vermesi için geçen süre belirtece göre değişmektedir. Bu süre benzhidrazidle 35 dakika, p-nitrobenzhidrazidle 10 dakika, p-aminobenzhidrazidle 40 dakikadır.

7. Çalışmada levodopa çözeltisinin üzerine belirteç, alkaliden önce ilâve edilmelidir.

#### Geliştirilen Metod

**Levodopanın benzhidrazid, p-aminobenzhidrazid veya p-nitrobenzhidrazid ile spektrumun görünen alanında spektrofotometrik**

miktar tayini için metot yukardaki koşullar saptanarak (sahife 3 ) bildirilmiştir.

### Konsantrasyonla Absorpsiyon Arasındaki İlişki

Yöntem bölümünde bildirildiği gibi 100 mcg/ ml konsantrasyon-daki çözeltiden seyreltme suretiyle 10.0 ar ml lik 0.5-20 mcg/ml arasında değişik konsantrasyonlarda levodopa çözeltileri hazırlandı. Reaksiyon üç belirteç için de yöntem bölümünde bildirildiği gibi ta mamlandı. Uygulama on defa tekrar edildi. Benzhidrazid, p-nitrobenzhidrazid ve p-aminobenzhidrazid belirteç olarak kullanıldığında okunan absorbanların ortalamaları tablo-III tedir.

Tablo-III. Okunan absorbanların ortalamaları

Konsantrasyon mcg / ml	Ortalama absorbanlar*		p-aminobenzhid- razid
	Benzhidrazid	p-nitrobenzhid- razid	
0.5	0.034	0.038	0.041
0.8	0.051	0.057	0.064
1	0.064	0.073	0.081
2	0.128	0.143	0.162
4	0.259	0.286	0.323
6	0.383	0.436	0.479
8	0.510	0.578	0.636
10	0.648	0.724	0.791
12	0.772	0.875	0.962
14		1.013	11.113
15	0.981		
16		1.156	
18		1.309	
20		1.442	

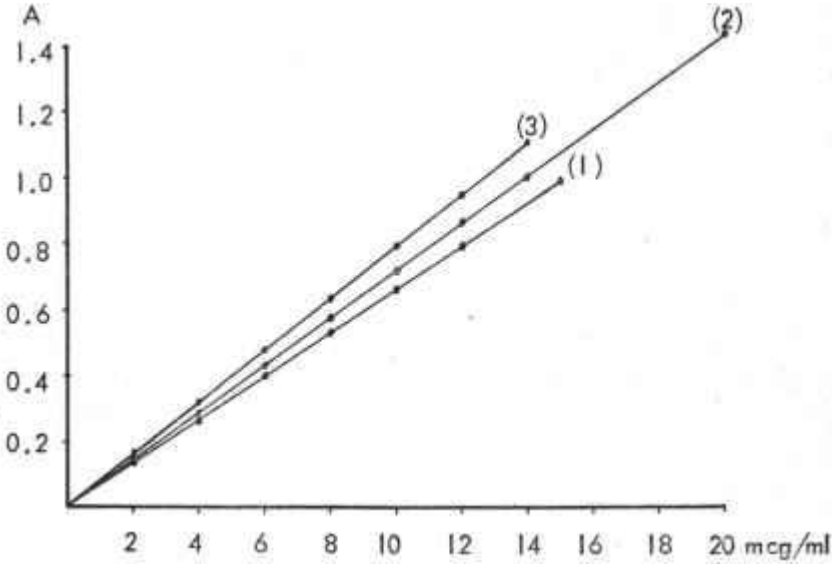
\* 10 deneyin ortalaması

Belirteç olarak benzhidrazid, p-nitrobenzhidrazid ve p-amino-benzhidrazid kullanıldığında sistem sırasıyla 0.5-15 mcg/ ml, 0.5-20 mcg/ml ve 0.5-14 mcg/ml konsantrasyonlar arasında Beer Kanununa uymaktadır (Şek. 6).

Bulunan ortalama değerlerden hesaplanan E % 1,1 cm, benzhidrazid için 646, p-nitrobenzhidrazid için 724 ve p-aminobenzhidrazid için 798 dir.

### Uygulanan Yöntemde Kullanılan Üç belirtece Göre Duyarlık

Geliştirilen yöntemde duyarlık konsantrasyon ile absorpsiyonun



Şek. 6. Ölçü eğrileri (1. Benzhidrazid, 2. p-nitrobenzhidrazid, 3. p-aminobenzhidrazid ile)

ilişisini araştırmak için değişik konsantrasyonlarda yapılan 10 ar ölçme üzerinden belirlendi. Duyarlıklar standart sapma, değişme katsayısı ve güven sınırları (% 95 olasılık) ile belirtildi (Tablo IV).

#### Uygulanan Yöntemde Kullanılan Üç Belirtece Göre Doğruluk

Geliştirilen yöntemde doğruluk Tablo 4 teki değerler üzerinden hesap edildi. Ortalama bağıl hata ve standart hata ile bildirildi (Tablo V)

#### Yönteme Zarar Veren Maddeler

Yönteme zarar veren maddelerin saptanması için yapılan çalışmalar aşağıda belirtilen-dört ana esas üzerinde toplanmıştır.

##### 1. Genel olarak yönteme zarar veren maddeler

Levodopa ile benzhidrazid, p-nitrobenzhidrazid veya p-aminobenzhidrazid arasında meydana gelen reaksiyon bazik ortamda (pH 12.4) yürümektedir. Bu koşulu ortadan kaldıran maddeler, örneğin asitler tayine zararlıdır.

Tablo IV. Üç belirtece göre duyarlık

Alınan Miktar (mcg/ ml)	Benzhidrazid ile		p-nitrobenzhidra- zid ile		p-aminobenzhid- razid ile	
	bulunan (mcg)	kazanılan 0/0	bulunan (mcg)	kazanılan 0/0	bulunan (mcg)	kazanılan %
0.5	0.525	105.20	0.525	105.00	0.514	102.80
0.8	0.789	98.63	0.787	98.38	0.802	100.25
1	0.991	99.10	1.008	100.80	1.015	101.50
2	1.981	99.05	1.975	98.75	2.030	101.50
4	4.009	100.23	3.950	98.75	4.048	101.20
6	5.929	98.82	6.022	100.37	6.003	100.05
8	7.895	98.69	7.938	99.79	7.970	99.63
10	1.003	100.03	10.000	100.00	9.912	99.12
12	11.950	99.58	12.086	100.72	12.055	100.46
14			13.992	99.94	13.947	99.62
15	15.186	101.24				
16			15.967	99.79		
18			18.080	100.44		
20			19.917	99.59		
% ortalama		100.06		100.18		100.61
Standart sapma		1.99		1.63		1.17
Değişme katsayısı		1.99		1.63		1.16
Güven sınırları % 95 olasılık için			±1.43		±1.17	±0.84

\*10 deneyin ortalaması

Tablo V. Üç belirtece göre doğruluk

Belirteç	Ortalama bağlı hata %	Standart hata
Benzhidrazid	0.06	0.199
p-nitrobenzhidrazid	0.18	0.143
p-aminobenzhidrazid	0.61	0.117

2. Benzer formüldeki maddelerden fenol, deney koşullarında reaksiyonu bozmamaktadır. Katekol, adrenalin ve noradrenalin ise deney koşullarında levodopa gibi reaksiyon vermekte ve ortamda bulunduğu zaman geliştirilen miktar tayini metodunu bozmaktadır.

3. Yapılan araştırma sonuçlarına göre, geliştirilen metodla kan ve idrarda levodopa miktar tayini yapmak daha ileri bir ayrılma ve temizleme işlemi uygulamadan mümkün değildir.

4. Farmasötik preparatlara levodopanin farmakolojik etkisini potansiyalize etmek için ilâve edilen benserazid, yöntem koşullarında reaksiyon vermemekte ve reaksiyonu bozmamaktadır

## Yöntemin Farmasötik Preparatlara Uygulanması

Levodopanin farmasötik preparat olarak tablet ve kapsülü vardır. Çalışmalarda on tablet tozu veya kapsül içeriği, iyice karıştırıldıktan sonra 100 mg levodopa ya tekabül eden madde, miligramın onda birine kadar, doğru olarak tartılır. 1000 ml lik bir ölçü balonuna aktarılır, 1 ml N HCl ve 300 ml su karışımı ile 10 dakika çalkalanır, su ile 1000 ml ye tamamlanır. Süzülür. Süzüntünün 10.0 ml si su ile 100.0 ml ye tamamlanır. Çalışmada "bundan 10.0 ml alınıp su ile 100.0 ml ye seyreltilir...." deyiminden başlayarak metot uygulanır. Sonuçlar tablo VI'dadır.

## ÖZET

Bu çalışmada Levodopanin miktar tayini için yeni bir spektrofotometrik analiz metodu geliştirilmiştir.

Levodopa benzhidrazid, p-nitrobenzhydrazid veya p-aminobenzhidrazidle alkali ortamda kırmızı-turuncu renk vermektedir; bu renk yardımı ile spektrumun görünen alanında aşağıdaki gibi çalışılarak miktar tayini yapılmıştır.

Levodopanin seyreltik hidroklorik asidli 0.5-20 mcg/ml lik çözeltisinin 10.0 ml si üzerine 0.5 ml beliteç çözeltisi konur; belirteç olarak benzhidrazid kullanıldığında 0.40 ml 0.3N sodyum hidroksit, p-nitro ve p-aminobenzhidrazid için  $\mp 5$  a/h sodyum hidroksit çözeltisi ilâve edilir. (pH:12.4). Bekletme süresi oda sıcaklığında-absorbansın ölçüldüğü dalga boyu  $E\%_{j_2_{ee}}$  ve Beer Kanununa uygun konsantrasyonlar belirtece göre değişmekte olup, benzhidrazid, p-nitro p-aminobenzhidrazid sıra ile 35 dakika, 480 nm, 646, 0.5-15 mcg/ml; 10 dakika, 490 nm, 724, 0.5-20 mcg/ml ve 40 dakika, 490 nm, 798, 0.5-15 mcg/ml dir. Ölçmeler aynı şekilde hazırlanmış, levodopa ihtiva etmeyen şahit karşısında yapılır.

Geliştirilen yöntemin duyarlık (değişme katsayısı, standart sapma ve  $\mp 95$  olasılıkla güven sınırları) ve doğruluğu (bağıl hata ve standard hata) üç belirteç içinde değişik konsantrasyonlarda onar ölçüm üzerinden hesap edilmiştir.

Bulgulara göre p-nitrobenzhydrazid, reaksiyon süresi, Beer Kanununa uyan konsantrasyonunun sınırının genişliği, duyarlık ve doğruluk

**Tablo VI. Metodun farmasötik preparatlara uygulanmasıyla alınan sonuçlar**

<b>İlacın adı</b>	<b>Bildirilen Miktar</b>	<b>100 mg. Levodopaya ekivalan toz miktarı</b>	<b>Benzhidrazidle</b>		<b>p-nitrobenzhidrazidle</b>		<b>p-aminobenzhidrazidle</b>	
			<b>Miktar (mcg)</b>	<b>%</b>	<b>Miktar (mcg)</b>	<b>%</b>	<b>Miktar (mcg)</b>	<b>%</b>
<b>Levodopa Tablet</b>	<b>Levodopa 500 mg</b>	150 mg	511.0	102.2	507.5	101.5	507.6	101.5
<b>Dopason Tablet</b>	<b>Levodopa 250 mg</b>	130 mg	253.5	101.4	252.2	100.9	252.0	100.8
<b>Eldopa Kapsül</b>	<b>Levodopa 250 mg</b>	113 mg	243.7	97.5	244.4	97.8	247.0	98.8
<b>Madopar Kapsül</b>	<b>Levodopa 100 mg Benserazid 25 mg</b>	150 mg	102.9	102.9	102.1	102.1	101.5	101.5

bakımından benzhidrazid ve p-aminobenzhidrazide üstünlük göstermiştir.

Geliştirilen yöntem düşük konsantrasyonlarda çalışmaya olanak verdiği için literatürde bildirilen diğer spektrofotometrik yöntemlerden üstündür. En azından onlardan herhangi biri yerine kullanılabilir.

Yöntem farmasötik preparatlara başarı ile uygulanmış, buna karşılık kan ve idrarda doğrudan doğruya levodopa tayinine olanak vermemiştir.

#### SUMMARY

In this work a new spectrophotometric method for quantitative determination of levodopa has been developed.

The red - orange color produced by the reaction between levodopa and benzhydrazide, p-nitrobenzhydrazide or p-aminobenzhydrazide in alkaline media is used for spectrophotometric determination in the visible region.

In this method, 0.5 ml hydrazide reagent is added to 10 ml of levodopa solution diluted with hydrochloric acid, 0.40 ml of 0.3N sodium hydroxide solution is added for benzhydrazide, 0.70 ml of 5 w/v sodium hydroxide solution is added for p-nitro or p-aminobenzhydrazide. The waiting period, wavelengths,  $E_{1\%}^{1\text{cm}}$  and the concentrations in accordance Beer's Law are dependent to the reagents used. Data obtained are 35 mins, 480 nm, 646, 0.5-15 mcg / ml for benzhydrazide, 10 mins, 490 nm, 724, 0.5-20 mcg/ml for p-nitrobenzhydrazide and 40 mins, 490 nm, 798, 0.5-14 mcg/ml for p-aminobenzhydrazide respectively. The solutions should be allowed to keep at room temperature for all three reagents. Measurements are made against the reagent blanks, prepared under the same conditions.

The variability (standart deviation, confidence limites with 0.95 probability) and reliability (standart error, and relative error) of this method have been calculated for three reagents at different concentrations using ten samples for each experiment.

It is found that p-nitrobenzhydrazide is reliable from other reagents to the reaction time, the limits of concentrations of levodopa

for quantitative determinations. In this respect it is an improvement over existing spectrophotometric procedures.

We have used this method successfully for levodopa determination in pharmaceutical material. But we should say that this method is not directly applicable to biological material such as urine and blood.

#### L I T E R A T U R

1. Evans, W.C., Raper, H.S., *Biochem. J.*, 31, 2155 (1973).
2. Heinrich, P., Schuler, W., *Helv. Chem. Acta*, 30, 320 (1948).
3. Larve, T.A., Blakley, E.R., *Anal. Chem. Acta* 31, 400 (1964).
4. Maggi, N., Cometti, Ü., *J. Pharm. Sci.*, 61, 924 (1972).
5. Chrostil, J., *Anal. Cliem.* 47, 2293 (1975).
6. Emerson, E., *J. Org. Chem.*, 8, 417 (1943).
7. Ettinger, M.B., Ruchhoft, C.C., Lishka, R.J., *Anal. Chem.*, 23, 1783 (1951).
8. Rosenblatt, D.H., Demek, M.M., Epstein, J., *J. Anal. Chem.*, 26, 1955 (1954).
9. Möhler, E.F., Jacob, L.N., *Anal. Chem.*, 25, 1369 (1957).
10. Emerson, E., Beegle, L.C., *J. Org. Chem.*, 8, 433 (1943).