



Parkinson Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Levodopa ve Benserazid Etken Maddelerinin Kemometrik Tayini

Güzide Pekcan Ertokuş^{1*} , Tahir Özer¹ 

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science & Art, Süleyman Demirel University, 32260
Isparta – Turkey

Geliş / Received: 18/02/2020, Kabul / Accepted: 30/08/2020

Öz

Bu çalışmada, Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan ilaç numunesindeki levodopa ve benserazid maddelerinin spektrofotometrik olarak kemometrik metotlarla tayini gerçekleştirilmiştir. Deneysel çalışmada maddelerin spektrofotometrik özellikleri belirlendikten sonra her bir maddenin uygun oranlarıyla karıştırılmasıyla yapay karışımların spektrum verileri incelenmiştir. En son aşamada tablet numunesi analizi yapılmıştır. Kemometrik yöntemlerden, temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) ve kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS), sentetik karışım ve tablet numunesindeki miktar tayininde başarı ile uygulanmıştır. Hesaplanan veriler, istatistik olarak incelendiklerinde hem hesaplanan geri kazanım değerleri yüksek hem de standart sapmalar yeterince küçüktür. Uygulanan kemometrik yöntemler yardımıyla elde edilen sonuçlar son derece hızlı, basit ve güvenilir sonuçlardır.

Anahtar Kelimeler: Levodopa, Benserazid, PLS, PCR.

Chemometric Determination of Levodopa and Benserazide Agents Used in the Treatment of Parkinson's Disease

Abstract

In this study, spectrophotometric determination of levodopa and benserazide substances in the drug sample used in the treatment of Parkinson's disease was performed by chemometric methods. After determining the spectrophotometric properties of the substances in the experimental study, in this study, the determination of levodopa and benserazide substances in the drug sample used in the treatment of Parkinson's disease was performed by spectrophotometric chemometric methods. After determining the spectrophotometric properties of the substances in the experimental study, the spectrum data of the artificial mixtures were examined by mixing each item with the appropriate ratios. At the last stage, tablet sample analysis was done. Among the chemometric methods, the principal component regression method (PCR) and the partial least squares method (PLS) have been successfully applied in the quantification of the synthetic mixture and tablet sample. When the calculated data are analyzed statistically, both the calculated recovery values are high and the standard deviations are small enough. The results obtained with the help of the applied chemometric methods are extremely fast, simple and reliable results.

Keywords: Levodopa, Benserazide, PLS, PCR.

1. Giriş

Parkinson hastalığı, nörolojik bir rahatsızlık olup, dopamin üreten beyin hücrelerinin zamanla kaybıyla ortaya çıkan bir rahatsızlıktır (Sima vd., 2013; Aslan ve Karahalil, 2019). Parkinson hastalığı, erken evrede dopamin agonistleri ile tedavi edilir. Tedavi yönteminde levodopa ve yanında benserazid, karbidopa gibi etken maddeler kullanılır. Levodopa, (L -3,4-dihidroksi-fenilalanin) dopamine dönüşen aromatik bir amindir (Dinç vd., 2007). Levodopa etken maddesi, beyin dışında kalan dokularda hızla dopamine dönüştüğünden; benserazid, karbidopa gibi amino asit dekarboksilaz inhibitörü ile kombine edilir (Nagaraja vd., 2001; Kaur vd., 2009). Bu çalışmada levodopa ve benserazid kombinasyonu kemometrik yöntemle incelenmiştir. Çok bileşenli sistemlerde aktif bileşenin hızlı ve kolay aynı zamanda güvenilir tayininde ön ayırma işlemi bazen sıkıntılı olmaktadır. Kemometri ile herhangi bir ön ayırma işlemi yapılmadan, güvenilir, hızlı bir şekilde nicel tayin yapılmıştır (Yongnian ve Gong, 1997). Ultra viyole spektrofotometrisinden elde edilen verilerdeki, absorptans ve derişim arasındaki ilişkiden faydalanılarak kemometrik model uygulanmıştır (Aktaş ve Sarıdağ, 2017). Bu çalışmada kullanılan levodopa ve benserazid maddeleri için literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, spektrofotometrik metotlarla (Madrakian ve Mohammadnejad, 2007; Culzoni vd., 2008; Uslu ve Özkan, 2002) elektrokimyasal metotlarla (Zapata-Urzuva vd., 2010; Shonhi vd., 2018; Rabinca vd., 2017; Demircigil vd., 2011; Savan ve Erdoğan, 2017) ve kromatografik metotlarla (Muzzi vd., 2008; Ahmad vd., 2012; Wollmer ve Klein, 2017) incelendikleri görülmüştür.

Bu çalışmada literatüre kazandırılmak istenilen, daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde klasik yöntemlerin yanında istatistiğin kullanıldığı kemometrik yöntemlerdir (Kısmi en küçük kareler-PLS ve Temel bileşen regresyonu-PCR) (Dinç , 2009). Böylelikle daha güvenilir ve daha hassas metotlar elde edilmesi amaçlanmaktadır.

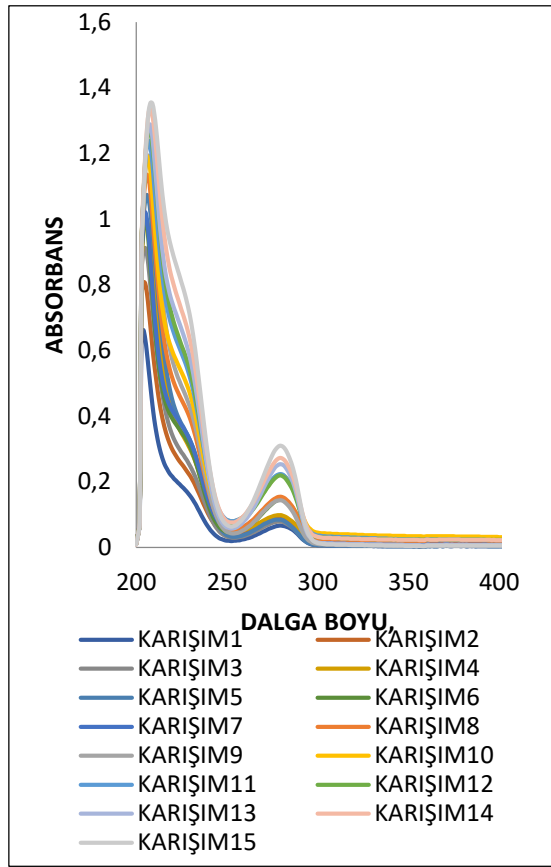
2. Materyal ve Metot

Çalışmada kullanılan bütün kimyasal malzemeler analitik saflıktadır. Her bir ilaç etken maddesinin 100 ppm olacak şekilde 0,1 M HCl in çözücü olarak kullanıldığı ortamda çözeltileri hazırlanmıştır. Deneyin diğer aşamalarında yer alan hem tekli çözeltiler hem de sentetik karışımlar, her bir maddenin ayrı ayrı hazırlanmış 100 ppm'lik çözeltilerinden hazırlanır. Çalışmamızda kemometrik kalibrasyon yönteminde UV Spektrofotometrik absorptans değerleri kullanılmıştır. UV Spektrofotometri ölçümleri için UV 1700 Pharmaspec cihazı (Shimadzu, Kyoto, Japan) kullanılmıştır. Cihazdan okunan absorptans değerlerini kemometrik olarak değerlendirmek için elimizde lisansı bulunan Minitab 17 (Minitab, 2019) kullanılmıştır. Ticari ilaç olarak Madopar (Deva®) kullanılmıştır. İlaç etken maddelerinin önce tek tek sonra 4.0-20.00 µg/mL derişim aralığında sentetik karışım çözeltileri (Tablo1.) hazırlanarak spektrumları (Şekil 1.) alınmıştır. Sentetik karışımlarda, maddelerin birbiri yanında derişim değışimleri incelenmiştir. İlaç numunesinin analizi için paketteki tüm tabletler agat havanda ezilerek karıştırılmıştır. Bu homojen karışımdan bir tablet ağırlığında tartılmış ve çözücü ile çözeltisi hazırlanarak absorptans okumaları yapılmıştır.

Bulgular

Tablo 1. İlaç maddeleri için kalibrasyon seti

| No. | $\mu\text{g mL}^{-1}$ | | No. | $\mu\text{g mL}^{-1}$ | |
|-----|-----------------------|------------|-----|-----------------------|------------|
| | Levodopa | Benserazid | | Levodopa | Benserazid |
| 1 | 4 | 1 | 8 | 8 | 4 |
| 2 | 4 | 2 | 9 | 8 | 5 |
| 3 | 4 | 3 | 10 | 12 | 3 |
| 4 | 4 | 4 | 11 | 12 | 4 |
| 5 | 4 | 5 | 12 | 12 | 5 |
| 6 | 8 | 2 | 13 | 16 | 4 |
| 7 | 8 | 3 | 14 | 16 | 5 |
| | | | 15 | 20 | 5 |



Şekil 1. Levodopa- benserazid karışım çözeltilerinin absorpsiyon spektrumu

Her bir kemometrik yöntem için hesaplanan geri kazanım ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri tablo 2. ve tablo 3. de gösterilmiştir.

Keskinlik ve doğruluk değerleri kontrol edilmiştir. İlave edilen derişimlere karşı bulunan derişimler hesaplanırken, cross-validasyon işlemi uygulanmıştır. Böylelikle ilaç numunesinde hatanın önüne geçilmiştir (Porfire vd., 2015 ve Tarhan ve Kara, 2017).

Yöntemin geçerliliğini test etmek için, yöntemi kullanılarak tahminsel kalıntısız hata (karelerin tahmin (tavin) hatalarının toplamı :PRESS) ve kalibrasyonun standart hatası: SEC (Denklem 2.) ve tahminin kareler ortalamasının karekökü: RMSEC değerleri (Tablo 4.) hesaplanmıştır. Bu değerlerin sıfıra yakın olması kullanılan modelin tahmin gücünün iyi olduğunu göstermektedir (Uyanık, 2012). Gözlenebilirlik sınırı (LOD) ve tavin sınırı (LOQ) parametreleri birbiriyle ilişkilidir ancak farklı tanımlara sahiptir (Shrivastava ve Gupta, 2015). Bu değerler de validasyon parametreleri olarak hesaplanmıştır ve tablo 4. belirtilmiştir. Hesaplanan LOD değerleri için değerlendirme yapılırken $LOQ > LOD$ ve $LOQ = LOD$ dikkate alınmıştır (Armbruster ve Pty, 2008). Her maddenin absorpsiyon derişim arasındaki ilişki incelenmiştir (Benserazid:208 nm, Levodopa: 280 nm). Benserazid ve levodopa için, absorpsiyon derişim arasındaki doğrusal ilişki (Sharma, 2017) regresyon katsayısının (Miao vd., 2018) birine yakın olması ile doğrulanmıştır (Tablo 4.)

Kemometrik hesaplamalar için 200-350 nm arasındaki dalga boyu aralığındaki absorpsiyon değerleri kullanılmıştır.

Tablo 2. Kısmi en küçük kareler metodu-PLS ile hesaplanan sonuçlar

| No | Levodopa | | | Benserazid | | |
|----|--------------------|------------------|----------------|--------------------|------------------|----------------|
| | İlave Edilen (ppm) | Hesaplanan (ppm) | Geri Kazanım % | İlave Edilen (ppm) | Hesaplanan (ppm) | Geri Kazanım % |
| 1 | 4 | 3.89 | 97.25 | 1 | 1.01 | 101 |
| 2 | 4 | 3.87 | 96.75 | 2 | 1.99 | 99.5 |
| 3 | 4 | 3.56 | 89.00 | 3 | 2.97 | 99.00 |
| 4 | 4 | 3.94 | 98.50 | 4 | 3.59 | 89.75 |
| 5 | 4 | 3.65 | 91.25 | 5 | 4.67 | 93.40 |
| 6 | 8 | 7.89 | 99.75 | 2 | 1.94 | 97.00 |
| 7 | 8 | 8.00 | 100.00 | 3 | 3.06 | 102.00 |
| 8 | 8 | 8.05 | 100.63 | 4 | 3.97 | 99.25 |
| 9 | 8 | 7.89 | 98.63 | 5 | 4.88 | 97.60 |
| 10 | 12 | 11.97 | 99.75 | 3 | 2.97 | 99.00 |
| 11 | 12 | 11.85 | 98.75 | 4 | 3.96 | 99.00 |
| 12 | 12 | 12.04 | 100.33 | 5 | 4.97 | 99.40 |
| 13 | 16 | 15.96 | 99.75 | 4 | 3.94 | 98.50 |
| 14 | 16 | 15.97 | 99.81 | 5 | 4.96 | 99.20 |
| 15 | 20 | 19.98 | 99.90 | 5 | 5.01 | 100.20 |
| | | | Ortalama=98.00 | | | |
| | | | BSS=3.41 | | | |
| | | | | Ortalama =99.25 | | |
| | | | | BSS =3.04 | | |

Tablo 3. Temel bileşen regresyonu-PCR ile hesaplanan sonuçlar

| No | Levodopa | | | Benserazid | | |
|----|--------------------|------------------|----------------|--------------------|------------------|----------------|
| | İlave Edilen (ppm) | Hesaplanan (ppm) | Geri Kazanım % | İlave Edilen (ppm) | Hesaplanan (ppm) | Geri Kazanım % |
| 1 | 4 | 3.69 | 92.25 | 1 | 0.98 | 98.00 |
| 2 | 4 | 3.98 | 99.50 | 2 | 2.07 | 103.50 |
| 3 | 4 | 4.05 | 101.30 | 3 | 2.86 | 95.33 |
| 4 | 4 | 3.82 | 95.50 | 4 | 3.97 | 99.25 |
| 5 | 4 | 3.96 | 99.00 | 5 | 4.96 | 99.20 |
| 6 | 8 | 7.89 | 98.63 | 2 | 2.10 | 105.00 |
| 7 | 8 | 8.06 | 100.80 | 3 | 3.00 | 100.00 |
| 8 | 8 | 7.94 | 99.25 | 4 | 3.97 | 99.25 |
| 9 | 8 | 7.82 | 97.75 | 5 | 4.88 | 96.40 |
| 10 | 12 | 11.87 | 98.92 | 3 | 2.87 | 95.67 |

Parkinson Hastalığının Tedavisinde Kullanılan Levodopa ve Benserazid Etken Maddelerinin Kemometrik Tayini

| | | | | | | |
|----------------|----|-------|--------|---|------|-----------|
| 11 | 12 | 11.96 | 99.67 | 4 | 3.56 | 89.00 |
| 12 | 12 | 12.03 | 100.30 | 5 | 4.65 | 93.00 |
| 13 | 16 | 15.92 | 99.50 | 4 | 3.87 | 96.75 |
| 14 | 16 | 15.97 | 99.81 | 5 | 5.05 | 101.00 |
| 15 | 20 | 20.01 | 100.00 | 5 | 4.96 | 99.20 |
| Ortalama=98.80 | | | | | | Ortalama |
| BSS=2.25 | | | | | | =98.03 |
| | | | | | | BSS =3.97 |

Tablo 4. Validasyon Parametreleri

| PARAMETRE | METOT | Levodopa | Benserazid |
|----------------------|-------|----------|------------|
| Korelasyon Katsayısı | PLS | 0.991 | 0.990 |
| | PCR | 0.999 | 0.987 |
| R ² | PLS | 0.035 | 0.028 |
| | PCR | 0.030 | 0.039 |
| SEC | PLS | 0.026 | 0.021 |
| | PCR | 0.014 | 0.028 |
| PRESS | PLS | 0.042 | 0.037 |
| | PCR | 0.031 | 0.043 |
| RMSEC | PLS | 0.220 | 0.341 |
| | PCR | 0.066 | 0.396 |
| LOD | PLS | 0.666 | 1.033 |
| | PCR | 0.543 | 1.201 |
| LOQ | PLS | | |
| | PCR | | |

Tablo 5. İlaç numunesindeki sonuçlar

| NO | Levodopa (gram) | | Benserazid (gram) | |
|-----------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|
| | PLS | PCR | PLS | PCR |
| 1 | 0.101 | 0.092 | 0.024 | 0.023 |
| 2 | 0.098 | 0.096 | 0.023 | 0.024 |
| 3 | 0.097 | 0.097 | 0.024 | 0.025 |
| 4 | 0.089 | 0.095 | 0.026 | 0.027 |
| 5 | 0.092 | 0.098 | 0.023 | 0.025 |
| Ortalama | 0.0954 | 0.0956 | 0.024 | 0.0248 |
| Standart Sapma | 0.0048 | 0.0023 | 0.0012 | 0.0015 |

Madopar ilaç numunesinde her bir tablette, 100 mg levodopa, 25 mg benserazid bulunmaktadır.

Sonuç

Levodopa ve benserazid ilaç etken maddelerinin UV spektrumları alınarak, analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Levodopa ve benserazid için, kemometrik yöntem kullanılarak, yöntem istatistiksel olarak desteklenmiştir. Kemometrik yöntemlerden, kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ve temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) uygulanmıştır. Tabletlerden hazırlanan ilaç numunesine geçmeden önce yapılan deneysel tasarım esnasında hazırlanan sentetik modelde de sonuçlar kıyaslanmıştır. Yöntemimizde levodopa ve benserazid için % geri kazanım değerleri ortalama olarak sentetik karışım için bulunmuştur. Geri kazanım değerleri kabul edilebilir boyutta büyük, standart sapmalar da çalışmaya uygun olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemler, tekrarlanabilir, yüksek duyarlılık ve doğrulukta, hızlı sonuç veren yöntemler olup levodopa ve benserazid içeren farklı ilaç numunelerinin analizinde önerilebilir.

Teşekkür

Bu çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından "FYL-2018-6859" kodlu proje ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

Ahmad, M.Z., Hamid K.A., Effendi T.J.B. 2012. "A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of levodopa in rat plasma & its application in pharmacokinetic studies".

IEEE Symposium on Business, Engineering and Industrial Applications, 134-139.

Aktaş, A.H., Sarıdağ A.M. 2017. "Liquid chromatographic-chemometric techniques for the simultaneous HPLC determination of lansoprazole, amoksisilin and clarithromisin in commercial preparation". *Journal of Chromatographic Science*, 1-7.

Armbruster, D.A., Pty T. 2008. "Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation" . *Clin Biochem Rev*, 29, 49-52.

Aslan, S.N., Karahalil B. 2019. "Oksidatif stres ve Parkinson hastalığı". *Ankara Ecz., Fak., Derg.*, 43(1), 94-116.

Culzoni, M.J., Goicoechea, H.C., Ibanez, G.A., Lozano, V.A., Marsili, N.R., Olivieri, A.C., Pagani, A.P. 2008. "Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping A multivariate curve resolution-Alternating least-squares approach". *Analytica Chimica Acta*, 614, 46-57.

Demircigil, B.T., Doğan-Topal B., Özkan S.A. 2011. "Simultaneous determination of L-dopa and benserazide in binary mixtures using first derivative of the ratio-voltammetric methods based on their oxidation on solid electrode". *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 76, 1717-1736.

Dinç, E. 2009. "Kemometrik İşlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları". *Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları*, 13-17.

Dinç, E., Kaya, S., Doğanay, T. 2007. "Continuous wavelet and derivative transforms for the simultaneous

quantitative analysis and dissolution test of levodopa-benserazide tablets". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 991- 995.

Kaur, K., Malik, A.K., Singh, B., Godarzi, M. 2009. "Simultaneous spectrophotometric determination of carbidopa and levodopa by partial least squares regression, principal component regression and least squares support vector machine methods". *Thai J.Pharm.Sci.*, 33, 123- 136.

Madrakian, T., Mohammadnejad, M. 2007. "Simultaneous spectrophotometric determination of levodopa and carbidopa in pharmaceutical formulations and water samples by using mean centering of ratio spectra and H-point standard addition methods". *Chem. Pharm. Bull.*, 55(6), 865-870.

Miao J., Forget, B., Smith, K. 2018. "Predicting Correlation Coefficients for Monte Carlo Eigenvalue Simulations With Multitype Branching Process" . *Annals of Nuclear Energy*, 112, 307-321.

Muzzi, C., Bertocci, E., Terzuoli, L., Porcelli, B., Ciari, I., Pagani, R., Guerranti, R. 2008. "Simultaneous determination of serum concentration of levodopa, dopamine, 3-O-methyldopa and alpha-methyldopa by HPLC". *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 62(4), 253-258.

Nagaraja, P., Vasantha, R.A., Sunitha, K.R., 2001. "A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations". *Talanta*, 55, 1039- 1046.

Porfire, A., Muntean D., Achim M, Vlase L, Tomuta I, 2015. Simultaneous Quantification of Simvastatin and Excipients in Liposomes Using Near

Spectroscopy and Chemometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 107: 40-49.

Rabinca AA, Bulendra M, Tache F, Mihailciuc C, Ciobanu AM, Stefanescu DC, Ciucu AA, 2017. Voltametric method for simultaneous determination of L-dopa and benserazide. *Current Analytical Chemistry*, 13(3): 218-224.

Savan Kuyumcu E, Erdoğan G, 2017. Simultaneous determination of levodopa and benserazide using poly(3-methylthiophene) and a multi-walled carbon nanotube sensor. *Journal of Solid State Electrochemistry*, 21(8): 2209-2217.

Sharma D, Singh R, Garg R, 2017. Development and validation of stability indicating UV spectro-photometric method for the estimation of benzydamine hydrochloride in bulk and in pharmaceutical dosage form: a novel analytical technique for conducting in-vitro quality control tests. *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 9(2): 678-686.

Shonhi-Kalkhoran M, Faridbod F, Norouzi P, Ganjali MR, 2018. Praseodymium molybdate nanoplates/reduced graphene oxide nanocomposite based electrode for simultaneous electrochemical determination of entacapone, levodopa and carbidopa. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29(1): 20-31.

Shrivastava A, Gupta VB, 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientist*, 2 (1): 21-25.

Sima IA, Naşçu-Briciu RD, Sarbu C, 2013. Simultaneous determination of levodopa and carbidopa in pharmaceuticals by

principal component regression. *Revue Roumaine de Chimie*, 58(7-8): 705-710.

Tarhan I, Kara AAIH, 2017. Quantitative Determination of Free Fatty Acids in Extra Virgin Olive Oils by Multivariate Methods and Fourier Transform Infrared Spectroscopy Considering Different Absorption Modes. *International Journal of Food Properties*, 1-8.

Uslu B, Özkan SA, 2002. Determination of binary mixtures of levodopa and benserazide in pharmaceuticals by ratio-spectra derivative spectrophotometry. *Analytical Letters*, 35(2): 303-314.

Uyanık A, 2012. Analitik Kimyacılar İçin İstatistik ve Kemometri. *Pegem Akademi Yayıncılık*, 6. Baskı: 254-259.

Wollmer E, Klein S, 2017. Development and validation of a robust and efficient HPLC method for the simultaneous quantification of levodopa, carbidopa, benserazide and entacapone in complex matrices. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20: 258-269.

Yongnian N, Gong X, 1997. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Mixtures of Food Colorants. *Analytica Chimica Acta*, 354: 163-171.

Zapata-Urzua C, Perez-Ortiz M, Bravo M, Olivieri AC, Alvarez-Lueje A, 2010. Simultaneous voltametric determination of levodopa, carbidopa and benserazide in pharmaceuticals using multivariate calibration. *Talanta*, 82: 962- 968.