

## CAPÍTOL III

### DETERMINACIÓ DE MESCLES DE LEVODOPA I BENSERAZIDA

---

#### III.1. OBJECTIU

L'objectiu del treball contingut en aquest capítol és el desenvolupament de mètodes espectrofotomètrics per a l'anàlisi simultani de compostos de la família de les catecolamines que es troben com a principis actius en preparats farmacèutics, basats en el registre dels espectres UV-Visible i la utilització de les tècniques de calibració multivariables. Aquest objectiu és doble:

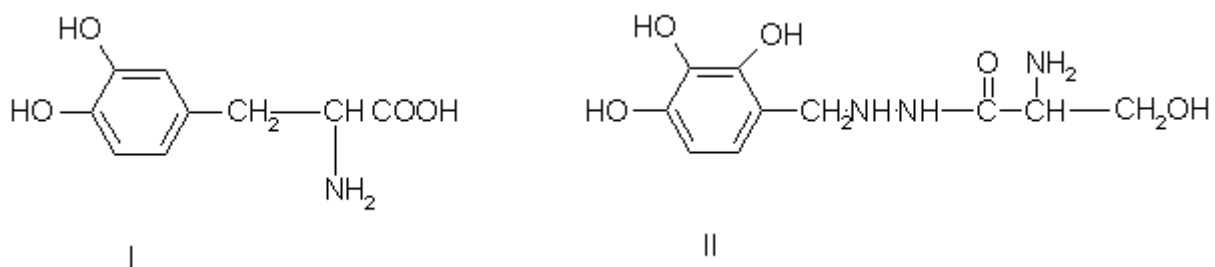
El desenvolupament d'un mètode directe basat en el registre dels espectres d'absorbància UV de les mesclures i l'aplicació de la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS).

El desenvolupament d'un mètode cinètic diferencial per reacció dels analits amb un agent oxidant. En aquest cas s'aplica la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS) i la regressió Parcial per Mínims Quadrats Multi Via (nPLS), als espectres d'absorbància UV-Visible dels productes formats per a diferents temps de reacció.

### III.2 INTRODUCCIÓ

La levodopa o L-Dopa (I) [(-)-3-(3,4-dihidroxifenil)-L-alanina], compost de la família de les catecolamines, és un important neurotransmissor utilitzat pel tractament de desordres neuronals tal com els que es donen en la malaltia de Parkinson [Stryer, 1988]. Després de la seva administració oral, la levodopa s'absorbeix ràpidament a través dels budells al nivell de l'intestí prim i es distribueix àmpliament en els teixits, transformant-se mitjançant un procés de descarboxilació en dopamina i posteriorment en altres metabolits.

Diferents indústries farmacèutiques han comercialitzat preparats que contenen levodopa conjuntament amb benserazida (II) [DL-Serina 2-[(2,3,4-trihidroxifenil)metil] hidrazina] o carbidopa [àcid L(-)-hidrazino-3,4-dihidroximetilhidrocínamic)]. Aquestes espècies potencien l'acció de la levodopa ja que inhibeixen el procés de descarboxilació i allarguen així el seu efecte terapèutic. La relativa freqüència amb que es presenten junts en diferents preparats, fa interessant desenvolupar mètodes ràpids i precisos pel control analític simultani tant de la levodopa com de l'agent potenciador en formulacions farmacèutiques.



Esquema 3.1

La majoria dels mètodes descrits en la bibliografia per a la determinació de mescleres de catecolamines en preparats farmacèutics es basen en les tècniques de separació, sobretot mitjançant cromatografia HPLC de fase inversa [Hamid, 1979; British Pharmacopeia, 1993; Smela, 1991]. L'aplicació de les tècniques espectrofotomètriques, en general molt adequades en la indústria farmacèutica per la seva gran simplicitat, rapidesa i precisió, és relativament escassa degut al considerable solapament espectral que les espècies presenten. En la determinació

simultània de levodopa (I) i benserazida (II) s'ha descrit l'utilització de l'espectrofotometria de primera derivada [Hassib, 1990], on (I) es determina de forma selectiva a 267 nm i (II) a 232 nm a partir d'un sistema d'equacions on s'elimina la contribució de (I). També s'han descrit mètodes espectrofotomètrics diferencials utilitzant com a reactius  $\text{GeO}_2$  [Davidson, 1985] i àcid bòric [Yucesoy, 1990], que es basen en la mesura de la diferència d'absorbància de les dissolucions preparades en presència i en absència de  $\text{GeO}_2$  o àcid bòric a dues longituds d'ona diferents.

Els mètodes cinètico-espectrofotomètrics diferencials basats en la velocitat de reacció, malgrat no hagin estat utilitzats massa en l'anàlisi de mescles en preparats farmacèutics, poden ser una bona alternativa als mètodes directes per a la quantificació simultània dels analits d'internés ja que permeten diferenciar la contribució de cada un dels analits en base a la diferent velocitat de reacció amb un mateix reactiu i també eliminar les interferències dels altres components presents en les mostres els quals absorbeixen a la mateixa longitud d'ona, però que no reaccionen. Però a pesar de la seva gran potencialitat a resoldre sistemes de varies espècies molt semblants que presenten una gran superposició espectral, en la quantificació simultània de mescles de catecolamines han estat escassament utilitzats. Així, en la bibliografia es descriu un mètode cinètic per a la quantificació simultània de mescles de adrenalina i levodopa, on es segueix la formació dels aminocroms corresponents a 480 nm, a partir de l'oxidació amb  $\text{Na}_2\text{IrCl}_6$  [Pelizzetti, 1976]. En [Ridder, 1977; Llaveró, 1990] es quantifiquen mescles de adrenalina, noradrenalina i levodopa, seguint la descomposició per àcid ascòrbic dels aminocroms derivats de la oxidació amb  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ . En tots aquests treballs, els sistemes estudiants són simples i les reaccions utilitzades en l'anàlisi segueixen una cinètica de primer ordre o pseudo primer ordre respecte als analits. Els paràmetres necessaris per a la resolució de les mescles s'obtenen a partir de les reaccions de cada analit per separat i en aquestes condicions és molt important que no hi hagi la presència d'efectes d'interacció entre analits i que la cinètica del sistema estigui molt ben definida si es volen obtenir bons resultats.

En aquest capítol, es posen a punt dos mètodes espectrofotomètrics per a la determinació simultània de levodopa i benserazida en els quals s'utilitza la regressió parcial per mínims quadrats com a mètode de calibració multivariable; el primer mètode es basa en el registre dels espectres UV de mescles d'ambdues espècies, i el segon és un mètode cinètic basat en el registre de la variació de l'absorbància en funció del temps, dels productes de reacció de la levodopa i la benserazida amb un agent oxidant, el periodat sòdic  $\text{NaIO}_4$ . En aquest segon mètode també s'ha

utilitzat la regressió Parcial per Mínims Quadrats Multi Via, ja que donat que les dades obtingudes són tridimensionals sembla lògic suposar que un bon model per a tractar-les ha d'ésser també tridimensional.

Els resultats obtinguts en aplicar els mètodes proposats a l'anàlisi de diferents mostres farmacèutiques, es comparen amb els trobats per HPLC, utilitzada com a tècnica de referència.

### III.3. EXPERIMENTAL

#### III.3.1. REACTIUS I DISSOLUCIONS

Es preparen dissolucions estoc dels components purs, levodopa i benserazida.HCl (Sigma), en HCl 0,1 M per pesada directa. Les dissolucions estoc un cop preparades es protegeixen de la llum i es guarden a 4-5°C a la nevera. En aquestes condicions la levodopa és estable durant 15 dies i la benserazida durant 2 dies. Les diferents dissolucions de treball es preparen cada dia per dilució d'aquestes dissolucions estoc en HCl 0,1 M.

L'àcid clorhídric 0,1 M es prepara per dilució a partir de l'àcid clorhídric concentrat (Panreac).

Per a l'anàlisi cinètic es prepara cada dos dies una dissolució de reactiu NaIO<sub>4</sub> 0,21 M per pesada directe i s'utilitza un tampó àcid acètic-acetat potàssic 0,2 M (pH de 4,5) preparat a partir d'una dissolució d'acetat de potàssic (Panreac) i d'àcid acètic (Probus). Tots els reactius utilitzats són de grau analític i les seves dissolucions són preparades amb aigua bidestil·lada, que es desaireja mitjançant el pas d'un corrent de nitrogen durant uns minuts. Això es fa per evitar l'oxidació de la levodopa i la benserazida per l'oxigen atmosfèric que pogués estar dissolt.

Per a la determinació cromatogràfica s'utilitza metanol per HPLC (Carlo Erba) i tampó fosfat 0,05 M (pH=2,5) preparat a partir de dihidrogen fosfat potàssic KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) i àcid fosfòric.

S'analitzen mostres, comprades a la farmàcia, del preparat farmacèutic Madopar® 250 (Laboratoris Roche, Madrid, Spain) de dos lots de producció diferents del mateix any.

El preparat farmacèutic es presenta en forma de comprimits de color rosat, amb un contingut nominal de 200 mg de levodopa i 50 mg de benserazida, i excipients no especificats fins a completar un pes d'aproximadament 560 mg/comprimit.

#### III.3.2. TRACTAMENT DE LA MOSTRA

Per tal de determinar el contingut mig per lot de Madopar® 250, es pesen 20 comprimits de cada lot, es trituren i s'homogenitzen. Un cop fet això, s'agafen diferents porcions d'aproximadament 0,38 g de la mescla per cada lot, pesades amb precisió, i es tracten en HCl 0,1 M per dissoldre els

principis actius. La solució es porta a un volum final de 200 ml (dissolució A), i els excipients insolubles s'eliminen per filtració. S'agafen 10 ml d'aquesta dissolució i es porten a un volum de 100 ml amb HCl 0,1 M (dissolució B).

La determinació espectrofotomètrica d'ambdues espècies es realitza sobre la dissolució B, a partir del registre de l'espectre dels analits o dels seus productes de reacció. Per la determinació cromatogràfica, i donada la diferència de concentracions existents entre ambdós analits, la benserazida es determina injectant al cromatògraf la dissolució A, mentre que la levodopa es quantifica injectant la dissolució B.

L'anàlisi es realitza sobre 5 porcions de cada lot, pesades i tractades en dies diferents.

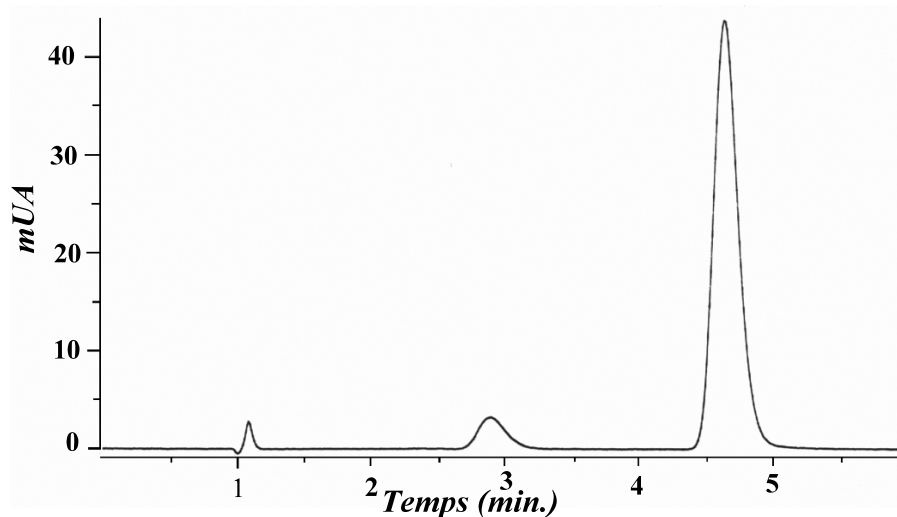
### III.3.3. PROCEDIMENT CROMATOGRÀFIC

Es posa a punt un mètode cromatogràfic per tal de trobar les concentracions de levodopa i benserazida en les mostres de Madopar, i així poder utilitzar aquests resultats per a comprovar l'exactitud dels mètodes espectrofotomètrics en la quantificació d'aquestes mostres.

Inicialment es busquen les condicions cromatogràfiques més adients per a la separació de mescles de levodopa i benserazida, basant-nos per a fer les primeres proves amb les dades trobades a la bibliografia sobre la resolució de mescles de compostos similars. A partir de la realització d'un conjunt d'experiències, on es modifica tant la composició com el pH de la fase mòbil, s'escullen les següents condicions:

- Una columna de fase reversa C<sub>18</sub> Spherisorb ODS-2 (15 cm de longitud, 0,46 cm de diàmetre intern, dimensió de partícula de 5 μm, Tracer)
- Fase mòbil: Tampó fosfat 0,05 M, pH de 2,5
- Cabal: 1 ml/min
- Volum d'injecció: 20 μl.
- Detecció: 278 nm i 268 nm, corresponents als màxims d'absorbància de la levodopa i la benserazida respectivament.

En aquestes condicions els pics es troben ben resolts i no presenten cua, essent el temps de retenció de 2,8 minuts per la benserazida i de 4,5 minuts per la levodopa. A la figura 3.1 es mostra un cromatograma d'una de les dissolucions B, a partir del qual es determina el contingut de levodopa.

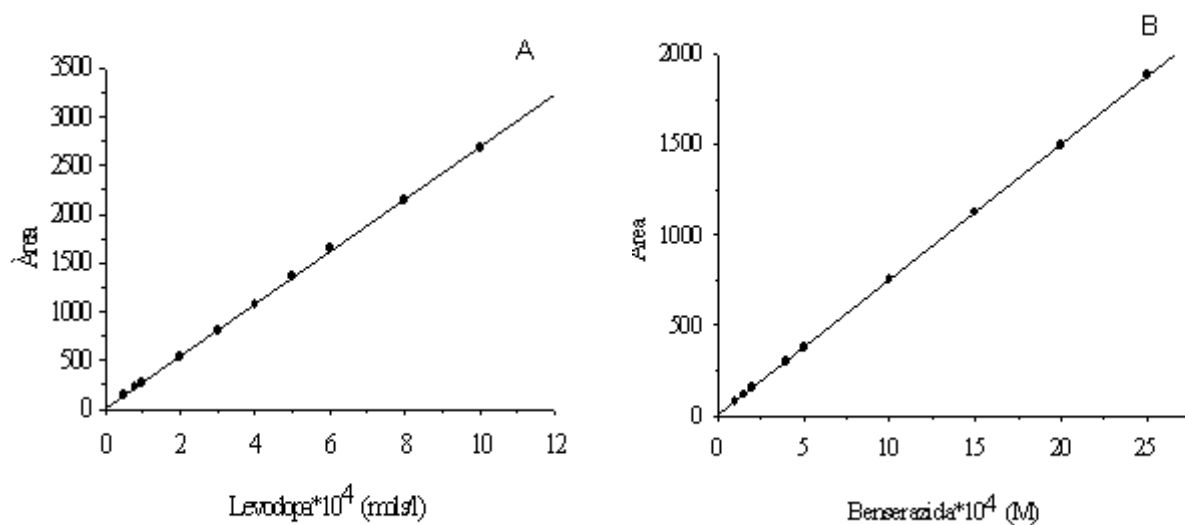


**Figura 3.1.** Cromatograma d'una mostra de Madopar.

Llavors, es passa a verificar l'interval de concentracions en què hi ha una relació lineal entre l'àrea del pic i la concentració, i es preparen les rectes de calibració amb dissolucions que contenen concentracions diferents de cada un dels analits, de manera que la concentració central sigui pròxima a la concentració teòrica en el fàrmac. Totes les mostres s'injecten al cromatògraf per triplicat, després d'haver estat filtrades mitjançant un filtre de xeringa de 0,22  $\mu$ m de diàmetre de porus, i es registren els cromatogrames a les longituds d'ona dels màxims d'absorbància de cada una de les espècies. Els intervals de concentració d'aquestes rectes són:  $5 \times 10^{-5}$ - $1 \times 10^{-3}$  M per la levodopa i  $1 \times 10^{-4}$ - $2,5 \times 10^{-3}$  per la benserazida .

A les figures 3.2 A-B es mostren les rectes de calibració àrea-concentració construïdes per a cada un dels analits i a la taula 3.1 es mostren els paràmetres calculats per aquestes rectes, així com el coeficient de regressió corresponent.

Un cop fet això, s'analitzen els dos lots del preparat farmacèutic Madopar®, a partir de l'injecció per triplicat de les dissolucions A i B de les mostres tractades. Els valors de contingut mig de levodopa i benserazida trobats, no difereixen dels especificats ni tampoc d'un lot a un altre.



Figures 3.2 A-B. Rectes de calibració àrea-concentració per la levodopa a 278 nm (A) i benserazida a 268 nm (B).

Taula 3.1. Paràmetres calculats per a les rectes de calibració obtingudes per HPLC.

Analit	Pendent	Ord. origen	R
Levodopa (278 nm)	$(268 \pm 3) \times 10^4$	$4 \pm 20$	0,99995
Benserazida (268 nm)	$(751 \pm 4) \times 10^3$	$1 \pm 5$	0,99998



### III.4. MÈTODE UV

#### III.4.1 INTRODUCCIÓ

En aquest apartat es descriu un mètode per a la determinació simultània espectrofotomètrica UV de levodopa i benserazida, basat en el registre dels espectres UV i utilitzant com a mètode de calibració la regressió parcial per mínims quadrats (PLS).

El PLS en principi sembla un mètode molt adequat per aplicar en aquest sistema, on es presenten dues problemàtiques difícils d'abordar per altres tècniques de calibració; per una banda tenim que els espectres es troben molt solapats en tot l'interval de longituds d'ona, i per l'altra, que la relació absorbància-concentració no és lineal en una zona de l'espectre, on tenim alts valors d'absorbància. Aquest últim problema es podria evitar disminuint l'interval de concentracions de treball, però degut a que la benserazida contribueix molt poc al senyal de la mescla, no es va veure adequada la dilució de la mostra.

El PLS permet fer ús de tota la informació útil proporcionada per l'espectre de la mescla, per tal de modelar i extreure la contribució de cada analit mitjançant una correcta calibració, i la utilització d'un número de components principals addicionals per a corregir la desviació de la linealitat a valors alts d'absorbància.

En aquest capítol, es posa de manifest la gran exactitud i gran precisió, que el mètode desenvolupat posseeix.

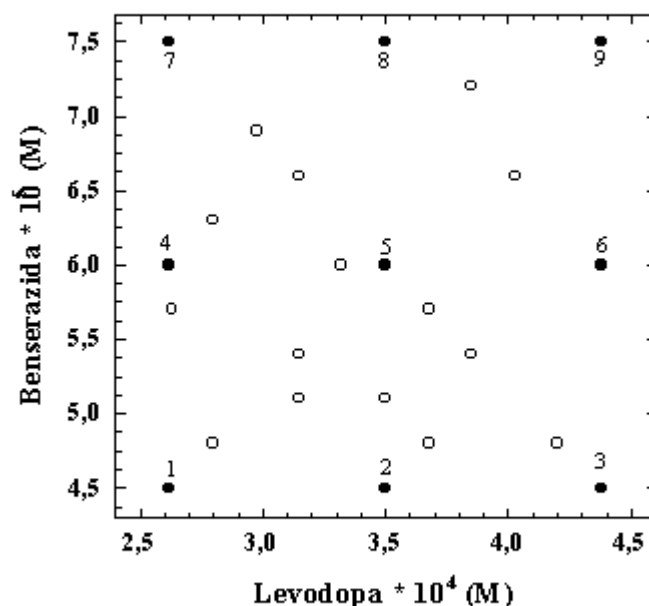
#### III.4.2. PREPARACIÓ DE LES MESCLES AL LABORATORI

Per tal de disposar de mescles de concentració coneguda, adequades per a construir els models de calibració, es preparen diferents mescles de levodopa i benserazida per dilució en HCl 0,1 M de les dissolucions estoc dels components purs.

Les mescles que s'utilitzen per a la calibració, es preparen seguint un disseny factorial  $3^2$  escollint com a valor central del disseny una mescla que conté levodopa i benserazida a una relació de concentracions igual a la que es troba en el fàrmac, i que alhora el valor de l'absorbància de la mescla a 280 nm sigui d'aproximadament 1. Els nivells extrems del disseny s'escullen de forma que es corresponguin a  $\pm 25$  % de la concentració en el nivell central per a cada analit. D'aquesta

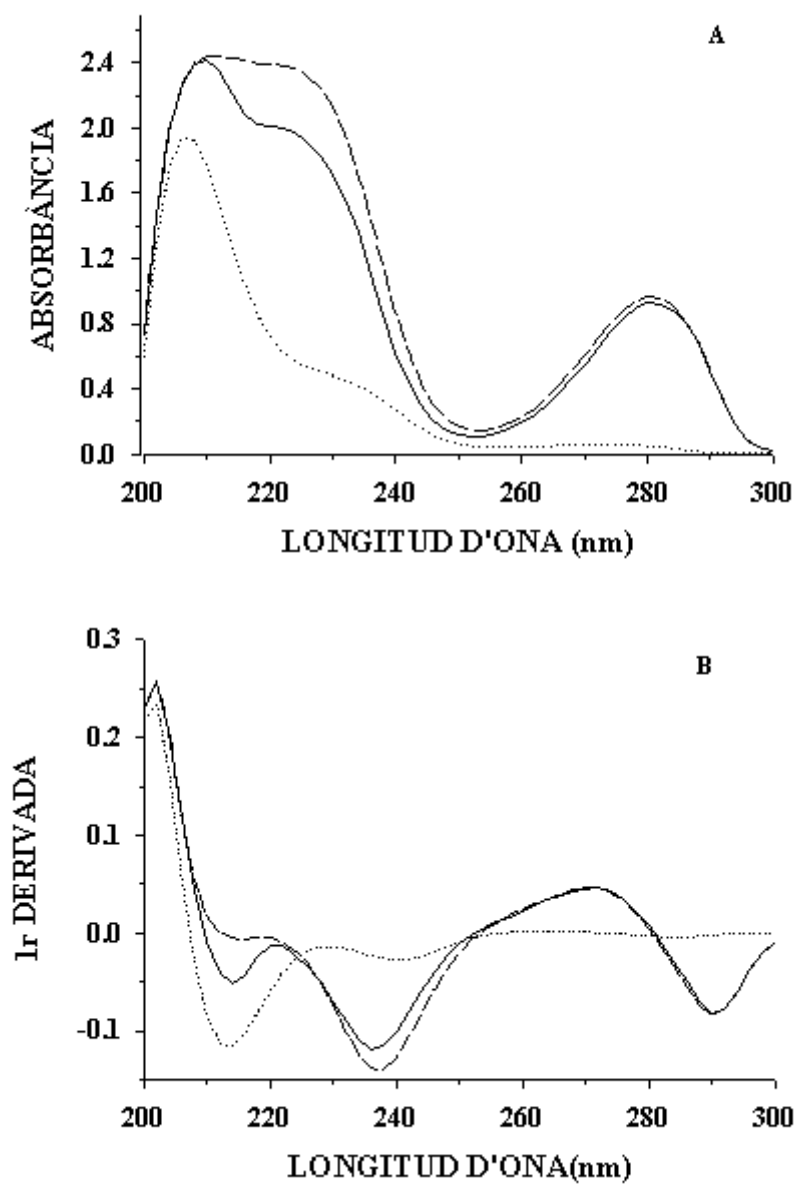
manera, les concentracions es troben entre  $2,6 \times 10^{-4} \text{M}$  i  $4,4 \times 10^{-4} \text{M}$  per la levodopa, i entre  $4,5 \times 10^{-5} \text{M}$  i  $7,5 \times 10^{-4} \text{M}$  per la benserazida. En aquestes condicions tenim que la concentració del nivell inferior de la benserazida està molt pròxima al límit de detecció per una calibració clàssica univariant.

Per tal d'avaluar la capacitat predictiva dels models de calibració assajats es preparen unes altres 15 mescles, amb concentracions compreses dins del rang de les mostres de calibració. A la figura 3.3 es mostra la composició de les diferents mostres en els dos conjunt. Totes les mescles es preparen per duplicat, en dies diferents i en un ordre aleatori.



**Figura 3.3.** Composició de les mescles de calibració (●) i predicció (○).

A les figures 3.4 A-B es mostren els espectres d'absorbància i de primera derivada dels components purs i de la mescla corresponent al punt central del disseny de calibració. Es nota un fort solapament espectral i una alta contribució de la levodopa al valor de l'absorbància total.



**Figura 3.4. A-B.** Espectres UV (A) i de 1r derivada (B) de la levodopa  $3,5 \times 10^{-4}$  M (—), de la benserazida  $6 \times 10^{-5}$  M (...) i de la mescla d'ambdues espècies(---), en HCL 0,1 M.

### III.4.3. PROCEDIMENT D'ANÀLISI

Un cop preparades les mostres, es registren els seus espectres UV entre 200 i 300 nm a intervals de 2 nm mitjançant l'espectrofotòmetre UV-Visible de díodes en línia Hewlett-Packard model HP-8452A, i es calculen els espectres de primera derivada mitjançant el software de l'equip.

A partir dels espectres UV, es construeixen els diferents models de calibració utilitzant l'algoritme PLS1 (o PLS) incorporat en el programa Unscrambler versió 6.1.

Per la construcció dels diferents models PLS1 s'utilitza el mètode de validació creuada [Martens, 1989], amb un número de segments de cancelació igual al número de mostres que constitueixen la matriu de calibració, deixant sempre a fora els dos replicats de cada mostra [Haaland, 1988]. S'escull com a número de factors significatius el menor que presenti un  $MSECV_j$  no significativament diferent del mínim  $MSECV$ , seguint el criteri de significació el proposat per Haaland i Thomas [Haaland, 1988].

Per a una fàcil comparació i interpretació dels resultats obtinguts en cada un dels models provats, es calcula l'error estàndard relatiu de predicció ( $RSEP\%$ ), la reproduïbilitat límit R i la desviació estàndard relativa mitja ( $ARSD\%$ ) pel conjunt de mostres de calibració i de predicció.

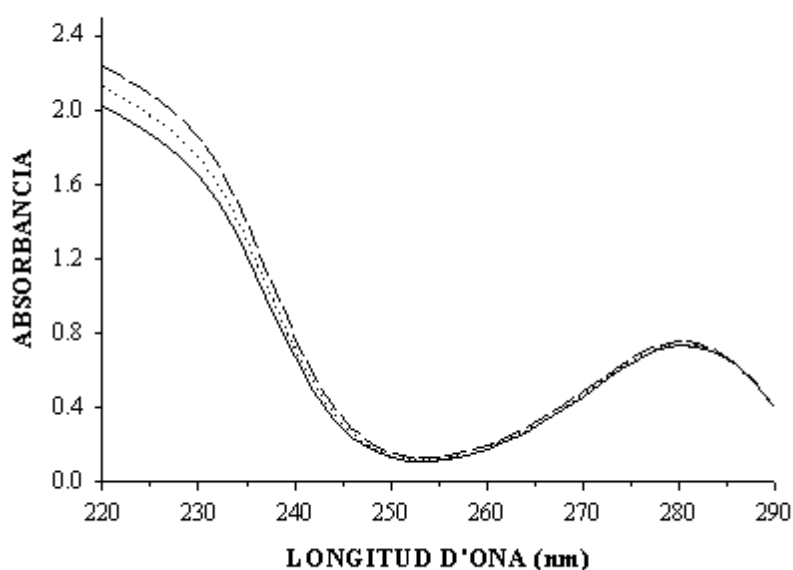
### III.4.4. RESULTATS I DISCUSSIÓ

#### III.4.4.1. ANÀLISI DE MOSTRES PREPARADES AL LABORATORI

Encara que el PLS sigui un mètode d'espectre complert, capaç de corregir l'elevada colinealitat existent entre els valors d'absorbància mesurats a diferents longituds d'ona, tenint en compte que la calibració es realitza a partir d'un número relativament petit de mostres, la precisió dels resultats pot ser afectada per les longituds d'ona i pel mode espectral utilitzat. Malgrat hagin estat descrites varies alternatives per aquesta selecció [Bangalore, 1996; Bershtein, 1988; Centner, 1996], en la pràctica i per sistemes amb un nombre reduït de components, els espectres dels quals són coneguts i un nivell de soroll espectral baix- situació en que es dona en el present treball- és més simple assajar varis intervals espectrals, escollits en funció dels espectres dels components. En general, la eliminació de longituds d'ona que no contenen informació analítica rellevant (p.ex. longituds

d'ona a on l'analit en qüestió no absorbeix), es tradueix en una millor precisió. A part, l'ús dels espectres de derivada, pot corregir problemes de deriva o desplaçaments de la línia base, incrementant la precisió.

Aquest estudi d'optimització de les condicions, així com per a estimar l'exactitud i la precisió esperable en la quantificació de noves mostres no pertanyents al conjunt de calibració, es realitza utilitzant les mescles preparades al laboratori descrites anteriorment.



**Figura 3.5.** Espectres de mesclures que contenen levodopa  $2,6 \times 10^{-4}$  M i benserazida;  $4,5 \times 10^{-5}$  M (—),  $6 \times 10^{-5}$  M (....),  $7,5 \times 10^{-5}$  M (---).

Tal com es pot veure a la figura 3.4 A, ambdós compostos presenten una banda amb un màxim d'aproximadament, 280 nm i un espatlla sobre 230 nm. Però donada la dilució i la relativa baixa absortivitat, la banda de la benserazida a 280 nm no s'aprecia. Així d'entrada es pot assajar l'interval que conté la informació espectral completa 220-290 nm o només una de les bandes. Però ens trobem amb el següent problema; mentre que la banda centrada a 280 nm presenta uns valors d'absorbància que són lineals respecte la concentració de cada un dels analits, l'espalla a 230 nm agafa valors d'absorbància molt elevats (fins a 2,6), a on ja no existeix una relació lineal entre l'absorbància i concentració. Llavors, malgrat que des d'un punt de vista clàssic, la cosa més

lògica seria eliminar aquesta part de l'espectre, pel cas de la benserazida això dona lloc a resultats molt dolents, ja que pràcticament tota la informació relativa a aquests composts es troba en aquesta zona. A la figura 3.5 es veu clarament que per a les mesclures que contenen diferents concentracions de benserazida i idèntica concentració de levodopa, l'absorbància de la banda centrada a 280 nm pràcticament no es modifica i en canvi sí que es nota un augment en l'absorbància per a concentracions creixents de benserazida a la zona al voltant de 230 nm.

Després d'assajar diferents models, es veu que la levodopa, donada la seva major aportació a l'espectre de la mescla, es quantifica sempre bé sigui quin sigui l'interval espectral utilitzat, mentre que la benserazida es quantifica lleugerament millor quan s'utilitza l'espectre complet. El número de factors PLS significatius trobats és de 2 per la levodopa i 3 per la benserazida.

Mitjançant la visualització dels scores dels diferents models per la levodopa (figura 3.6 A-B), es pot veure clarament la no linealitat que s'introdueix al sistema quan es passa d'utilitzar només els valors d'absorbància de la banda centrada a 280 nm a utilitzar tot l'espectre, encara que en aquest últim cas siguin també 2 els factors significatius. A la figura 3.6 A tenim que la distribució de les mostres de calibració en l'espai dels dos primers factors reproduïx la l'estructura de la matriu de calibració (figura 3.3), on cada factor descriu la contribució de cada analit en la mescla; el primer la concentració de levodopa i el segon la concentració de benserazida. En canvi, a la figura 3.6 B es pot veure que la distribució uniforme s'ha perdut i ara les mostres amb concentració més elevada de levodopa (mostres que presenten una més alta absorbància a la zona de 220-250 nm) tenen tendència a agrupar-se en l'espai. En aquest cas, el segon factor descriu la contribució de la benserazida i també modela la desviació de la linealitat del sistema.

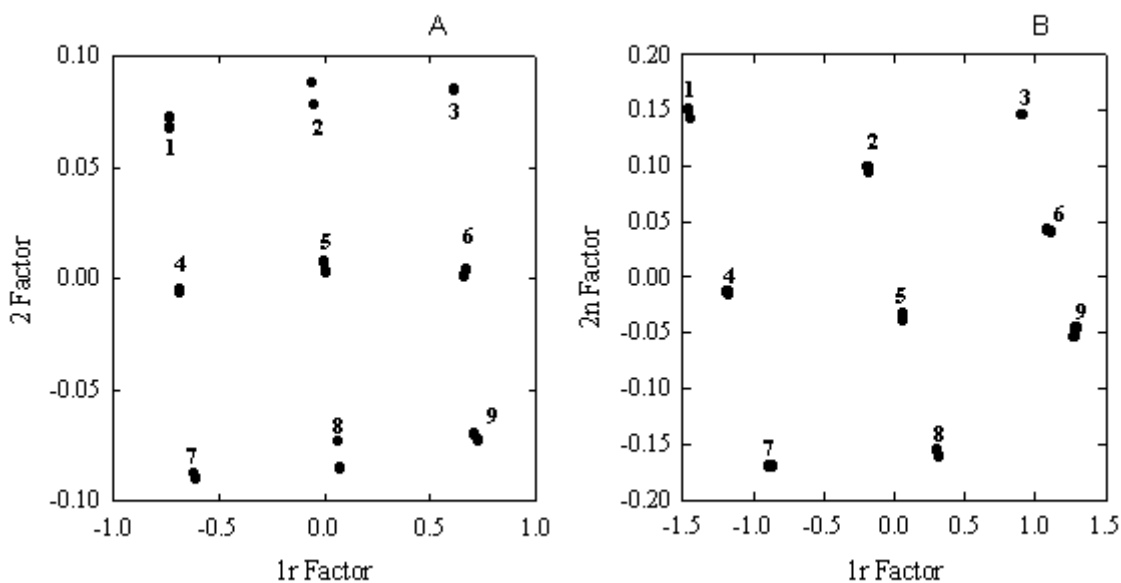
A la taula 3.2 es mostra l'error estàndard relatiu de predicció (RSEP%), la reproduïbilitat límit (R) i la desviació estàndard relativa mitja (ARSD%) obtinguts al quantificar el conjunt de mostres de calibració i de predicció per les dues espècies mitjançant aquests models PLS1. En ambdós modes experimentats (absorbància i primera derivada) els resultats són absolutament equivalents.

S'observa que la levodopa es quantifica amb molt bona exactitud (RSEP 0,5 %) i la benserazida amb una exactitud lleugerament inferior (RSEP 1 %) encara que molt bona també,

però això és lògic tenint en compte la seva baixa contribució a la absorbància de la mescla. Com també es pot veure a la taula, destaca que la reproduïbilitat del mètode analític és molt bona i equivalent al valor del RSEP el que indica que el model de calibració està ben ajustat i que les diferències existents en la determinació dels analits són degudes a la reproduïbilitat del mètode d'anàlisi.

A les figures 3.7 A-B es mostren els resultats de forma gràfica representant la concentració de cada component trobada mitjançant PLS1 front a la concentració real que hi ha en cada mescla. A la taula 3.3 es troben els paràmetres de la regressió de la recta per les mostres de calibració i per les de predicció. Tant per a les mostres de calibració com per les de predicció, el valor del pendent és molt proper a 1 i l'ordenada a l'origen a 0, i per tant el mètode és correcte.

La qualitat dels resultats obtinguts, posa de manifest les avantatges de la utilització del PLS com a tècnica de calibració, front als mètodes clàssics convencionals.



**Figura 3.6. A-B.** Distribució de les mostres de calibració en l'espai dels dos primers factors utilitzant diferents intervals espectrals en la construcció de models PLS1 per la levodopa; els valors d'absorbància de la banda centrada a 270 nm (A), i l'espectre complet (B).

**Taula 3.2.** RSEP%, R i ARSD% obtinguts al quantificar el conjunt de mostres de calibració i de predicció per les dues espècies utilitzant models PLS1 amb les dades d'absorbància (220-290 nm) i de primera derivada ( 220-296 nm ).

	Absorbància (220-290)						Primera derivada (220-296)					
	Levodopa <sup>a</sup>			Benserazida <sup>b</sup>			Levodopa <sup>c</sup>			Benserazida <sup>c</sup>		
	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD
Calibració	0,27	$2 \times 10^{-6}$	0,23	0,76	$1,5 \times 10^{-6}$	0,87	0,22	$2 \times 10^{-6}$	0,2	0,71	$1,5 \times 10^{-6}$	0,87
Predicció	0,48	$4 \times 10^{-6}$	0,47	0,82	$1,4 \times 10^{-6}$	0,85	0,44	$4 \times 10^{-6}$	0,41	0,87	$1,6 \times 10^{-6}$	0,97

Número de Factors PLS utilitzats: a = 2, b = 3, c =4

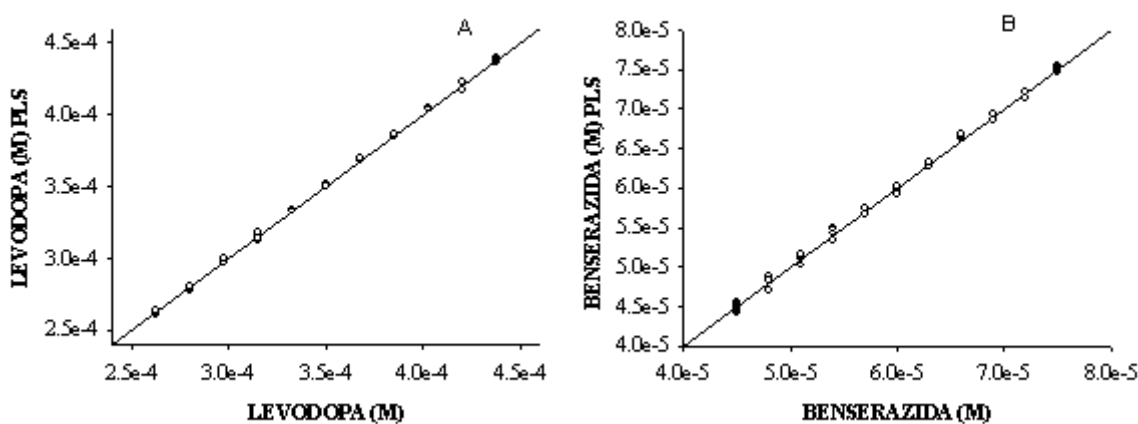


**Taula 3.3.** Paràmetres de la recta concentració PLS vers concentració real de levodopa i benserazida, per a les mostres de calibració i predicció.

	Levodopa			Benserazida		
	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient de correlació, r	Ordenada Origen	Pendent	Coefficient de correlació, r
Calibració	$(0 \pm 3) \times 10^{-6}$	$1,001 \pm 0.009$	0,9998	$(0 \pm 1,2) \times 10^{-6}$	$1,00 \pm 0.02$	0,9991
Predicció	$(-1 \pm 4) \times 10^{-6}$	$1,005 \pm 0.011$	0,9998	$(0.1 \pm 1,3) \times 10^{-6}$	$1,00 \pm 0.02$	0,998

**Taula 3.4.** Contingut mig de levodopa i benserazida (mg/comprimit) i el seu corresponent interval a  $\alpha = 0,05$  (n=5), obtingut mitjançant HPLC i el mètode desenvolupat tant en el mode d'absorbància com de primera derivada.

	Levodopa			Benserazida		
	HPLC	PLS		HPLC	PLS	
		Absorbància	1a Derivada		Absorbància	1a Derivada
Lot 1	$204 \pm 2$	$206 \pm 2$	$205 \pm 2$	$49 \pm 2$	$48 \pm 2$	$48 \pm 2$
Lot 2	$202 \pm 2$	$202 \pm 1$	$200 \pm 1$	$50 \pm 3$	$54 \pm 3$	$54 \pm 3$



**Figura 3.7 A-B.** Concentració trobada a partir dels models PLS per la levodopa (A) i la benserazida (B), vers la concentració real en les mostres de calibració (●) i de predicció (○).

#### III.4.4.2. ANÀLISI DE LEVODOPA I BENSERAZIDA EN COMPRIMITS DE MADOPAR®

Després de comprovar que el mètode proposat per la determinació simultània de levodopa i benserazida proporciona molt bons resultats quan s'aplica a mostres preparades al laboratori, s'aplica a l'anàlisi del preparat farmacèutic Madopar® de dos lots de producció diferents.

A la taula 3.4 es mostra el contingut mig (en mg per comprimit) en cada lot, amb el seu interval de confiança per un nivell de significació del 95 % per l'aplicació dels models PLS1 sobre els espectres d'absorbància i de primera derivada, així com els obtinguts per HPLC.

La comparació dels valors mitjos i la seva precisió mitjançant els tests estadístics *t* i *F*, mostra que per un nivell de significació del 95 % no hi ha diferència significativa entre el resultat espectrofotomètric i el cromatogràfic.

#### III.4.5. CONCLUSIONS

El mètode d'anàlisi proposat per la quantificació simultània espectrofotomètrica de levodopa i benserazida es caracteritza per la seva gran simplicitat i pel curt temps d'anàlisi, i s'ha aplicat a mostres del fàrmac comercial Madopar obtenant-se resultats comparables al mètode cromatogràfic.

S'obté una molt bona exactitud i precisió tant per la levodopa com la benserazida, malgrat la seva baixa contribució d'aquesta última a l'espectre de la mescla, la elevada superposició dels seus respectius espectres d'absorbància, i la presència de desviacions de la linealitat originades al treballar amb elevats valors d'absorbància on la llei de Beer-Lambert no es compleix.

### III.5. MÈTODE CINÈTIC

#### III.5.1. INTRODUCCIÓ

En aquest apartat es descriu un procediment per a la determinació simultània cinètico-espectrofotomètrica de levodopa (I) i benserazida(II) a partir de la reacció d'oxidació amb el periodat sòdic  $\text{NaIO}_4$  en medi àcid.

En les condicions de treball, ambdós analits s'oxiden instantàniament per originar uns compostos que presenten màxims d'absorbàcia pròxims a 400 nm. En presència d'un excés d'oxidant, el derivat de la levodopa evoluciona segons una cinètica de primer ordre per a formar un compost colorejat ( $\lambda = 480$  nm), mentre que el derivat de la benserazida es descomposa per a donar lloc a compostos incoloros desviant-se d'un mecanisme de pseudoprimer ordre. Per altra banda el comportament dels dos analits en les mescles, és diferent al comportament d'aquests en estat pur. En les mescles s'observa interacció entre les espècies que dona lloc a l'aparició de nous productes que absorbeixen en la regió de 500-700 nm, els quals també es descomponem en excés d'agent oxidant.

Pel processament de les dades s'utilitza la regressió Parcial per Mínims Quadrats (PLS), així com la regressió per Mínims Quadrats Parcials Multi Via (nPLS). Tant el PLS com el nPLS, els qual construeixen models empírics a partir de la informació proporcionada per les mescles, permeten quantificar correctament varis analits amb pronunciat solapament espectral i petites diferències cinètiques, ja que són capaços d'utilitzar tota la informació discriminant continguda en el senyal cinètic multivariable (tant la diferència cinètica dels diferents processos que tenen lloc, com l'espectral entre els productes formats) per tal de separar la contribució individual de cada analit en la mescla.

Per tal de poder aplicar el PLS convencional a la matriu de dades cinètico-espectrofotomètriques obtinguda del registre de les diferents mescles, és necessari desdoblar-la i convertir-la en una matriu de dues dimensions o vies de la forma ( $t_{11}, t_{21}, \dots, t_{n1}, \dots, t_{1j}, \dots, t_{1m}, t_{2m}, \dots, t_{nm}$ ). En aquest desdoblament les mesures registrades a varis temps són col·locades de manera seqüencial una darrera l'altra per a formar una única fila per a cada mostra en la nova matriu de dades bidimensional. És evident que per a cada mostra la absorbància mesurada a  $\lambda_i$  i

$t_j$  es troba relacionada amb la absorbància mesurada a  $t_{j+1}$  i  $t_{j+1}$ , però aquesta informació es perd quan les dades són desdoblades, i s'obtenen matrius amb variables molt correlacionades les quals donen lloc a models difícils d'interpretar. Aquest problema pot ser superat si s'utilitza el mètode de regressió Multi Via nPLS desenvolupat per Bro [Bro, 1996], el qual manté l'estructura tridimensional de les dades, i permet l'obtenció de models més simples i fàcils d'interpretar, en els quals es reflexen les dues fonts de variabilitat dels paràmetres registrats (la longitud d'ona i el temps).

Els mètodes d'anàlisi Multi Via estan essent mica en mica implementats en l'aplicació de dades cinètico-espectrofotomètriques, però malgrat de les avantatges potencials que poden presentar, no ha estat provat encara que proporcionin una millor capacitat predictiva en els sistemes cinètics.

### III.5.2. PROCEDIMENT CINÈTIC D'ANÀLISI

Per a la preparació de les diferents mescles, les diferents dissolucions de treball s'afegeix directament a la cel·la espectrofotomètrica mitjançant l'ús de micropipetes. S'afegeix en primer lloc 1 ml de tampó àcid acètic-acetat potàssic 0,2 M (pH 4,5), seguidament un volum apropiat comprès entre 300 i 500  $\mu$ l de cada una de les dissolucions estoc de levodopa i benserazida i en la majoria dels casos, es completa el volum a 2 ml mitjançant aigua bidestil·lada desairejada. Les concentracions finals de levodopa i benserazida es troben compreses entre  $(2,4-4,0) \times 10^{-4}$  M i  $(4,6-7,8) \times 10^{-5}$  M respectivament. La cubeta és col·locada aleshores a l'espectrofotòmetre, mantenint la temperatura a  $25,0 \pm 0,1$  °C i s'inicia l'agitació. Després d'un minut, es registra l'espectre de referència i llavors comença la reacció per l'addició, ja en últim lloc, de 0,1 ml de la dissolució de periodat sòdic essent la concentració final en cubeta de  $1 \times 10^{-2}$  M. La homogeneïtzació en la cel·la és instantània des del moment en què s'afegeix l'última gota de reactiu, moment que s'agafa com a temps inicial de reacció i en què es comença el registre de la cinètica.

L'espectre UV-Visible de la mescla es registra a intervals de 2 nm en el rang de longituds d'ona de 300-600 nm a intervals de 2 segons durant 1 minut i de 4 seg en el minut següent, utilitzant un temps d'integració de 0,3 segons.

### III.5.2.1. PREPARACIÓ DE LES MESCLES AL LABORATORI

Les mescles que s'utilitzen per a la calibració, es preparen seguint un disseny factorial  $5^2$  escollint com a valor central del disseny una mescla que conté levodopa i benserazida a una relació de concentracions igual que la que es troba en el preparat farmacèutic i que alhora el valor de l'absorbància a 480 nm sigui aproximadament 1 després dels dos minuts de reacció. Els nivells extrems del disseny s'escullen de forma que es corresponguin a  $\pm 25\%$  de la concentració en el nivell central per a cada analít.

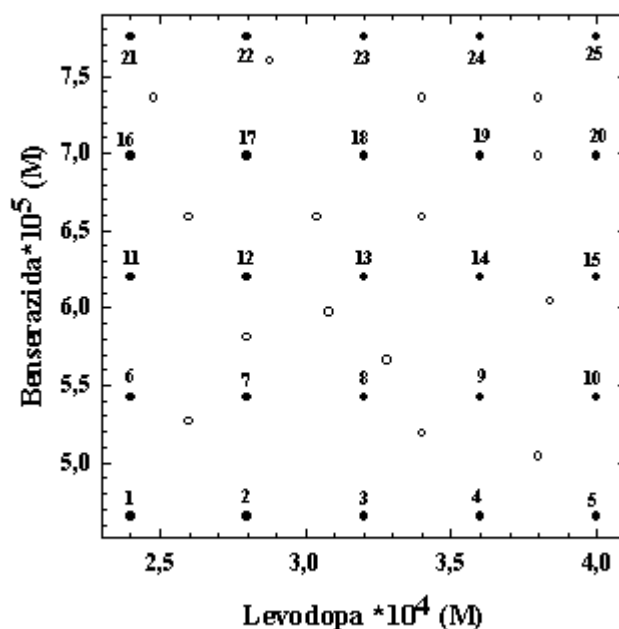


Figura 3.8. Composició de les mescles de calibració (●) i de predicció (○).

Per tal d'avaluar la capacitat predictiva dels models de calibració assajats es preparen unes altres 15 mescles amb concentracions compreses dins dels intervals de concentració definits per les mostres de calibració. Totes les mescles es preparen per duplicat, en dies diferents i seguint un ordre aleatori. A la figura 3.8 es mostra la composició de les diferents mostres en els dos conjunts.

### III.5.2.2. REGISTRE I PROCESSAMENT DE LES DADES

El registre dels espectres a diferents temps per a cada una de les mostres, es realitza en aquest treball mitjançant l'espectrofotòmetre UV-Visible de díodes en línia Hewlett-Packard model HP-8451 A, que porta incorporat un bany termostàtic i un sistema d'agitació intern. Del registre cinètic, s'obté per a cada mostra un vector que conté l'evolució espectral de les diferents espècies presents, el qual esta constituït per uns 7000 valors d'absorbància. Per tal de facilitar els càlculs, es redueix a la meitat aquest vector, escollint els valors d'absorbància cada 4 nm enlloc de cada 2 nm.

A partir de la matriu de dades cinètica-espectrofotomètrica obtinguda amb el conjunt de totes les mostres, es construeixen els diferents models de calibració utilitzant l'algoritme PLS1 incorporat en el programa Unscrambler versió 6.1 i utilitzant l'algoritme nPLS1 desenvolupat per Bro[Bro, 1998] el qual funciona des del Matlab. S'assagen diferents models per tal d'optimitzar el mode espectral (absorbància i primera derivada), el rang de longituds d'ona de treball, i el temps de registre cinètic, amb l'objectiu de minimitzar l'error de predicció de les mostres. Per a la construcció dels diferents models PLS1 s'utilitza el mètode de validació creuada amb un número de segments de cancelació igual al número de mostres que constitueixen la matriu de calibració, deixant sempre a fora els dos replicats de cada mostra. S'escull com a número de factors significatius el menor que presenti un  $MSECV_j$  no significativament diferent del mínim  $MSECV$ . En la construcció dels models nPLS1 no ens és possible utilitzar el mètode de validació creuada i el número de factors escollit és aquell en què al afegir-ne un nou, la variància explicada del conjunt de mostres de calibració no millora significativament [Vandeginste, 1998].

De la mateixa manera que es fa a el apartat anterior, per tal de facilitar la comparació i interpretació dels resultats obtinguts en cada un dels models provats, es calcula l'error estàndard relatiu de predicció (RSEP%), la reproduïbilitat límit R i la desviació estàndard relativa mitja (ARSD%) pel conjunt de mostres de calibració i de predicció.