

III.5.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

III.5.3.1. OXIDACIÓ DE LA LEVODOPA I LA BENSERAZIDA

En dissolucions pures, tant la levodopa com la benserazida s'oxiden en presència de NaIO_4 originant diferents productes de reacció. Però malgrat la seva similitud estructural, el mecanisme de reacció no és el mateix per ambdues espècies.

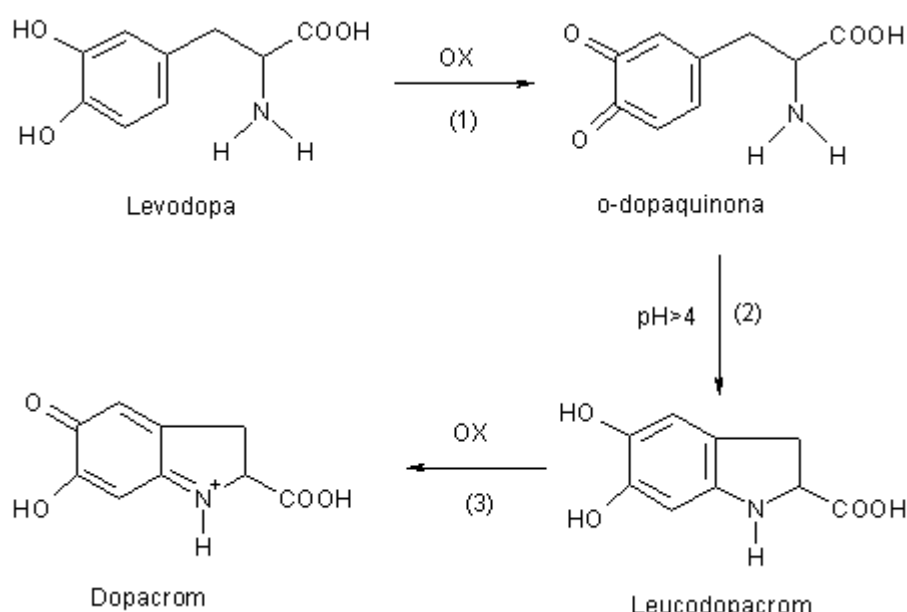


Figura 3.9. Esquema de les reaccions que tenen lloc per la levodopa en presència de NaIO_4 a pHs superiors a 4.

L'oxidació de la levodopa ($\lambda_{\text{màx}} = 280\text{nm}$) segueix un mecanisme ben establert i ha estat àmpliament aplicat amb finalitats analítiques, utilitzant una gran varietat d'agents oxidant, tals com NH_4VO_3 , HIO_4 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, KMnO_4 , Na_2IrCl_6 i molts d'altres [Pelizzetti, 1976; Salem, 1987; El-Kommos; 1990a; El-Kommos, 1990b]. El mecanisme de reacció es troba esquematitzat a la figura 3.9. Tenim que l'aminocrom ($\lambda_{\text{màx}} = 300,480\text{ nm}$) és el producte final resultant de la seqüència de tres reaccions. Inicialment, la levodopa s'oxida per a donar lloc a la corresponent o-benzoquinona ($\lambda_{\text{màx}} = 395\text{nm}$) i si el pH del medi de treball és superior a 4, aquesta espècie es cicla i es torna a oxidar per a transformar-se finalment en el aminocrom. Per tal de completar el procés, són necessaris dos mols de periodat sòdic per cada mol de levodopa. En presència d'un excés

d'agent oxidant, la oxidació de la levodopa és instantània per a donar lloc a la o-benzoquinona i el pas limitant de la velocitat de reacció és la ciclació (pas número 2 de la figura 3.9). En aquestes condicions, la velocitat de reacció segueix l'equació de primer ordre descrita per l'equació 1:

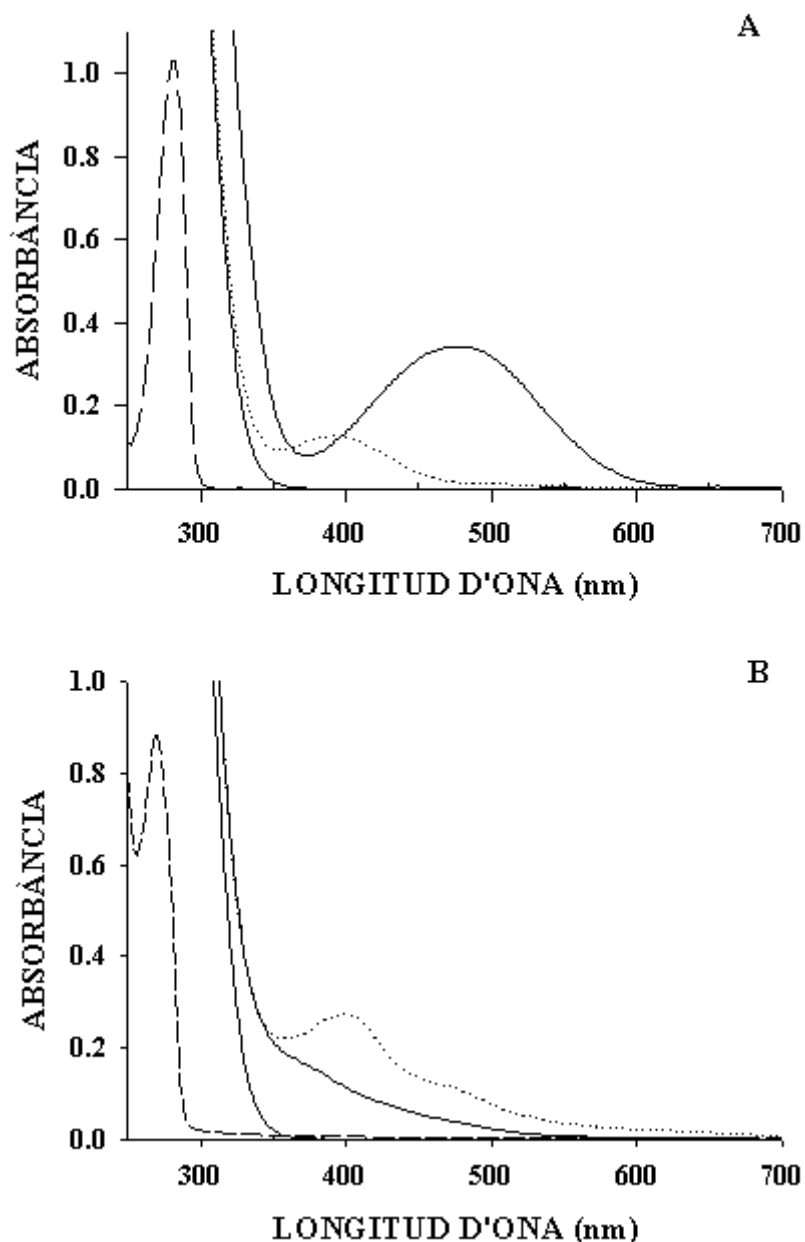


Figura 3.10 A-B. Espectres de la levodopa (A) i benserazida (B) $1 \times 10^{-4} M$ (---), del reactiu $1 \times 10^{-2} M$ (—) i dels productes a l'inici de la reacció (...) i als 10 min (—), pH de 4,5 i a $25^{\circ}C$.

$$\frac{d[\text{Aminocrom}]}{dt} = k^{act} \times [\text{Levodopa}] \quad (1)$$

A la figura 3.10 A es mostra l'espectre d'absorbància de la levodopa i del reactiu a les concentracions de $1 \times 10^{-4} \text{M}$ i $1 \times 10^{-2} \text{M}$ respectivament, i els espectres del productes resultant de la mescla d'ambdues espècies a l'inici del registre cinètic i als 10 minuts de reacció.

A partir de 6 dissolucions pures de levodopa en l'interval de concentracions comprès entre $(0,5-5) \times 10^{-4} \text{M}$ i amb l'addició d'una concentració de NaIO_4 de $1 \times 10^{-2} \text{M}$, es comprova que la cinètica d'aquesta reacció és realment de primer ordre, i es troba un valor de temps de semireacció de 83 ± 11 segons.

El mecanisme d'oxidació de la benserazida ($\lambda_{\text{màx}} = 270 \text{nm}$) no està establert i només disposem de l'informació proporcionada per algunes proves experimentals realitzades en fer reaccionar la benserazida amb l'agent oxidant NaIO_4 . El que veiem és que en afegir NaIO_4 , la benserazida s'oxida pràcticament de forma instantània per a donar lloc a la corresponent quinona ($\lambda_{\text{màx}} = 406 \text{nm}$), necessitant dos mols de periodat sòdic per cada mol de benserazida per completar la seva oxidació. Quant l'oxidant s'afegeix només en un lleuger excés respecte la concentració de benserazida, s'observa també l'aparició d'una o varies espècies colorejades amb màxims d'absorció a 490 i 524 nm (figura 3.11). Però tots aquests productes de reacció es descomponen per a transformar-se en espècies incolores. En presència d'un excés d'agent oxidant, l'oxidació de la benserazida és instantània i es transforma majoritàriament en la quinona corresponent, però la descomposició d'aquesta també es produeix molt ràpidament de forma que s'observa sempre en l'interval de longituds d'ona d'estudi, una disminució de l'absorbància amb el temps. Aquest comportament cinètic es mostra a la figura 3.12, on es representa la variació de l'absorbància en el temps a la longitud d'ona del màxim d'absorció de la quinona per diferents concentracions de NaIO_4 . Es pot veure que quan s'afegeix la meitat de la quantitat estequiomètrica d'agent oxidant ($1 \times 10^{-4} \text{M}$), el valor d'absorbància es aproximadament la meitat del valor màxim, i que es manté estable durant el temps mesurat. Quan la concentració afegida és l'estequeiomètrica s'assoleix l'absorbància màxima amb pocs segons però la quinona es descompon lentament. Per concentracions més altes d'agent oxidant, no s'assoleix l'absorbància màxima i la velocitat de descomposició augmenta, indicant que la quinona ja ha començat a desaparèixer de forma notable.

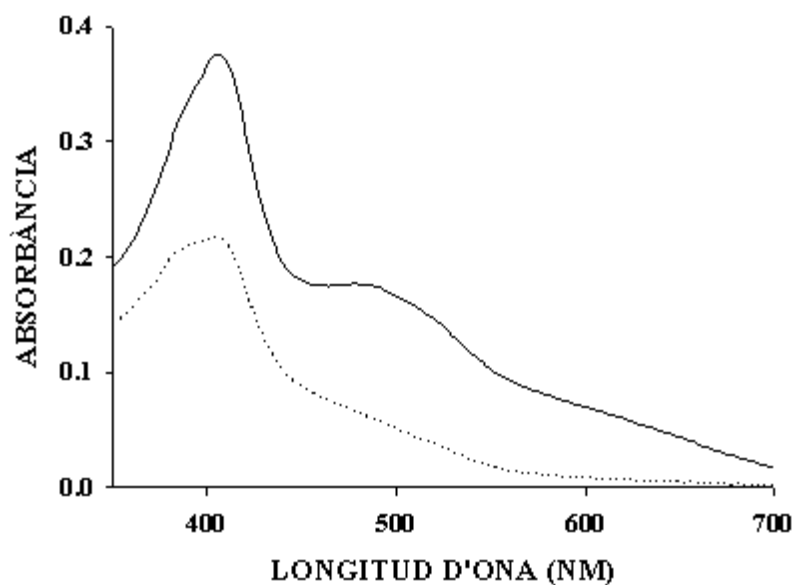


Figura 3.11. Espectres dels productes que es formen a l'inici de la reacció de la benserazida 1×10^{-4} amb NaIO_4 1×10^{-4} (...) i 2×10^{-4} (—), pH de 4,5 a 25 °C.

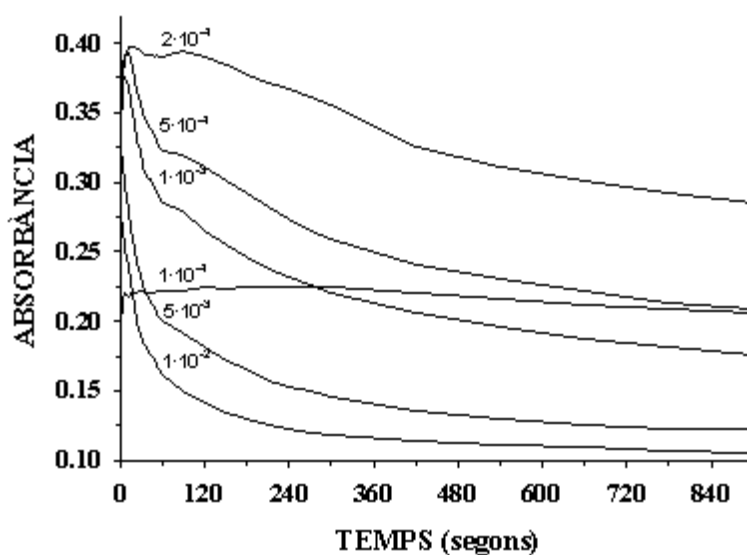


Figura 3.12. Pèrils cinètics a 406 nm per la benserazida 1×10^{-4} M per a diferents concentracions de NaIO_4 , pH de 4,5 a 25 °C.

En aquestes condicions, el mecanisme de reacció es desvia del comportament de pseudoprimer ordre respecte a l'analit, que normalment té lloc quan es treballa amb un gran excés de reactiu front a l'analit d'estudi. Una gràfica del logaritme de la velocitat inicial vers el logaritme de la concentració de benserazida és una línia recta amb un pendent de 0,85.

A la figura 3.10 B es mostra l'espectre d'absorbància de la benserazida i del reactiu a las concentracions de $1 \times 10^{-4} \text{M}$ i $1 \times 10^{-2} \text{M}$ respectivament, i els espectres del productes resultants de la mescla d'ambdues espècies a l'inici del registre cinètic i als 10 minuts de reacció.

III.5.3.2. ESTUDI DE LES CONDICIONS EXPERIMENTALS. OPTIMITZACIÓ

Les condicions experimentals s'estudien sobre dissolucions pures $1 \times 10^{-4} \text{M}$ de cada analit, amb l'objectiu d'escollir aquelles en què l'exactitud i la precisió en la resolució de les mescles sigui el millor possible. És a dir, es busca que l'evolució espectral dels productes derivats de l'oxidació de cada un dels analits, sigui el més diferent possible en un temps curt d'anàlisi, i que alhora aquesta contribució per part d'ambdós analits al senyal mesurat sigui suficient per tal de ser quantificats correctament.

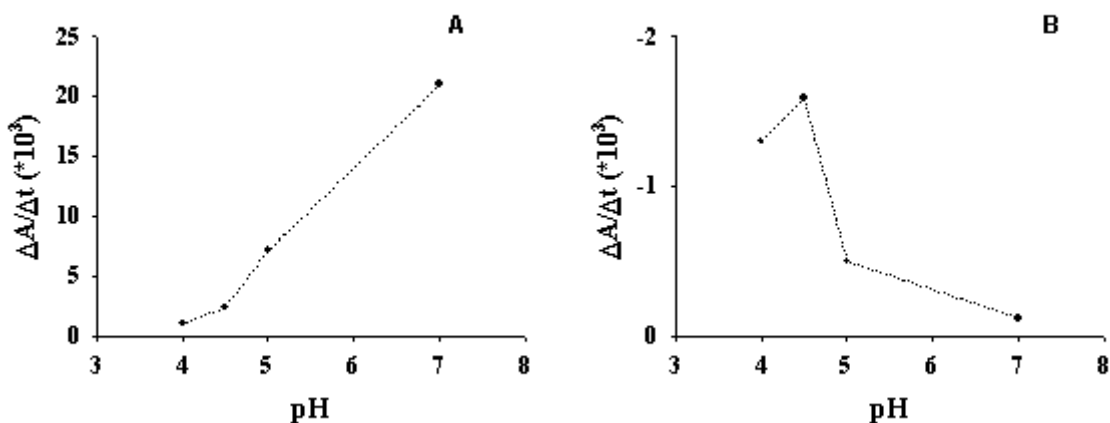
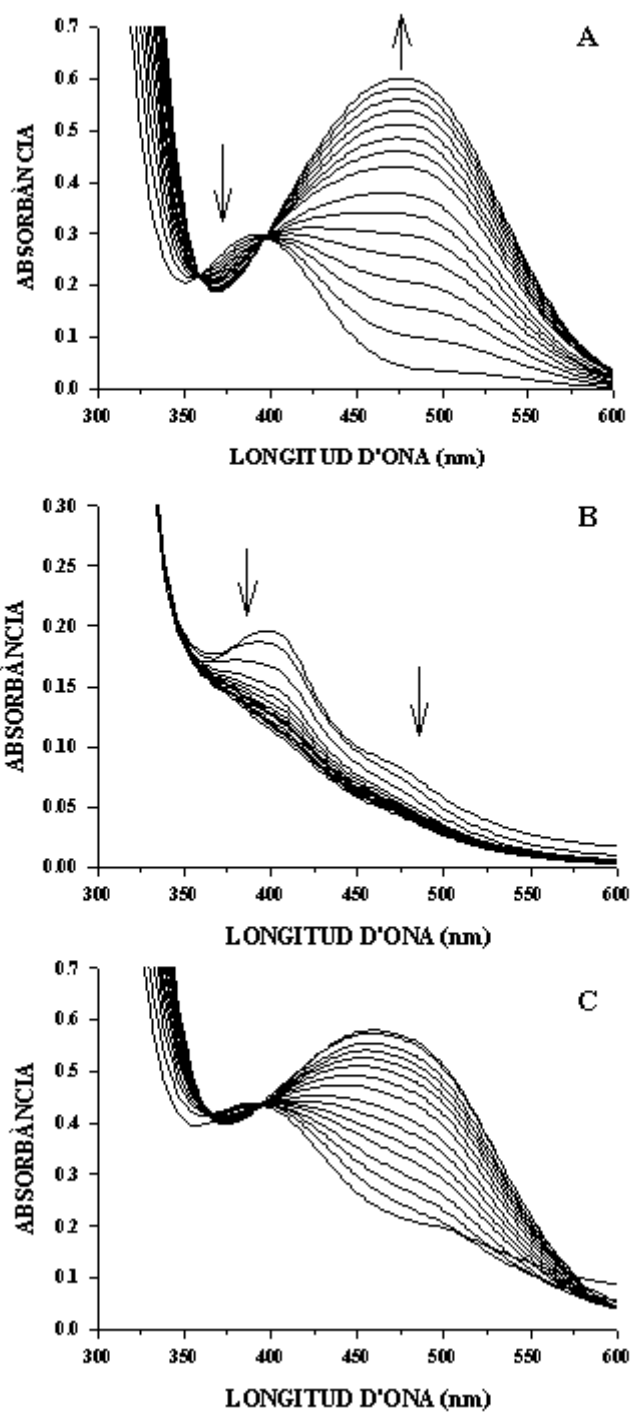


Figura 3.13. Representació de la variació de l'absorbància entre t_0 i els 10 s inicials de la reacció amb NaIO_4 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ de: (A) la levodopa a 480 nm i (B) la benserazida a 406 nm, pH 4,5 a 25°C.

Per a començar, s'estudia la influència del pH de reacció en el rang de 4-7, ja que a pHs inferiors no té lloc la formació de l'aminocrom derivat de la levodopa. En el cas de la levodopa

la velocitat de formació d'aquest aminocrom augmenta amb el pH, i tenim que a un pH de 7 la seva formació és pràcticament instantània. Això a favora l'utilització de pH alts de treball, ja que amb un temps molt curt d'anàlisi s'aprecia un gran increment d'absorbància de la banda de 480 nm corresponent a l'aminocrom format (figura 3.13 A). En canvi, per la benserazida la situació que es dona és molt diferent, ja que en augmentar el pH, la sensibilitat en la seva determinació disminueix. Tenim que en augmentar el pH, l'absorbància de la quinona o espècies colorejades derivades d'una primera etapa d'oxidació, és cada cop menor, i alhora és més lenta la seva desaparició, fins al punt que a pH 7 l'absorbància mesurada al voltant de 400 nm és molt petita i quasi no s'aprecia cap canvi al llarg del temps de registre utilitzat (figura 3.13 B). Amb tot això, s'agafa una solució de compromís i s'escull un pH de treball de 4,5. En aquestes condicions les reaccions tenen lloc de forma ràpida i s'aconsegueix la màxima sensibilitat possible per la benserazida. Aquest punt és especialment important ja que dels dos analits, la benserazida és el que es troba en defecte respecte a la levodopa en el fàrmac comercial. A part, és millor treballar a aquest pH perquè les dues espècies són oxidades a valors alts de pH per l'oxigen atmosfèric, que es pot dissoldre en el medi de reacció.

El segon paràmetre que s'estudia és la concentració de reactiu del medi, i s'assagen les concentracions de $1 \times 10^{-3} \text{M}$ i $1 \times 10^{-2} \text{M}$. S'utilitzen només aquestes concentracions, on el reactiu es troba en excés, per no augmentar més la complexitat del sistema. Per la levodopa, tal i com s'esperava, l'evolució de l'aminocrom és independent de la concentració de reactiu, essent les cinètiques completament idèntiques. En canvi, per la benserazida, els diferents processos que tenen lloc depenen molt de la concentració del reactiu. S'escull treballar amb la major concentració, ja que malgrat el valor de l'absorbància de les espècies colorejades formades és menor, es produeix una major disminució de l'absorbància en els dos primers minuts de reacció.



Figures 3.14 A-C. Variació espectral dels productes de reacció de la levodopa (A), la benserazida (B) i la mescla d'ambdues (C).

3.5.3.3. ANÀLISI DE LEVODOPA I BENSERAZIDA EN MESCLES PREPARADES AL LABORATORI

Un cop escollides les condicions experimentals més idònies per a dur a terme la reacció, es passa a l'estudi i determinació de levodopa i benserazida en mescles. Per a la determinació de mescles d'ambdós compostos, s'utilitza tota la informació continguda en l'evolució espectral amb el temps, en els diferents processos de degradació que tenen lloc en presència de NaIO_4 . A les figures 3.14 A-C, es mostra la variació amb el temps de l'espectre d'absorbància de 300 a 600 nm durant els dos primers minuts de l'inici de la reacció, d'una mescla $2,4 \times 10^{-4} \text{M}$ en levodopa i $7,8 \times 10^{-5} \text{M}$ en benserazida i de dissolucions pures de cada analít en les mateixes condicions experimentals. Com es pot veure, la levodopa presenta una gran contribució a l'absorbància total i petites variacions en la seva concentració modifiquen notablement el valor de l'absorbància de la mescla de reacció. La contribució de la benserazida a l'absorbància global és molt menor, però presenta un comportament cinètic diferent al de la levodopa, i els productes de reacció d'ambdues espècies presenten espectres força diferents.

De l'estudi dels espectres i perfils cinètics tant de les espècies pures com de les mescles s'observa que l'aparició de nous productes que absorbeixen a la zona de 500-700 nm, els quals són probablement els productes resultants d'una reacció creuada. Aquestes noves espècies aparegudes, també es descomponen ràpidament per a donar lloc a espècies no colorejades. A les figures 3.15 A-B es veu clarament la presència d'aquestes noves espècies, on es mostra l'espectre d'absorbància a l'inici de la reacció i als 20 segons, de dissolucions pures de levodopa $2,4 \times 10^{-4} \text{M}$ i benserazida $7,8 \times 10^{-5} \text{M}$, l'espectre resultant de la suma d'aquestes dues espècies i l'espectre de la mescla d'ambdues espècies en les mateixes condicions. Aquesta forta interacció, provoca que el comportament dels analítis en la mescla no es correspongui al comportament de cada analít per separat, i introdueix una desviació de la linealitat del sistema ja que ara l'absorbància total de la mescla deixa de ser funció lineal de la concentració de cada analít (situació que es dona en les reaccions de pseudoprimer ordre) i passa a dependre també d'altres termes en que participen les concentracions d'ambdós analítis.

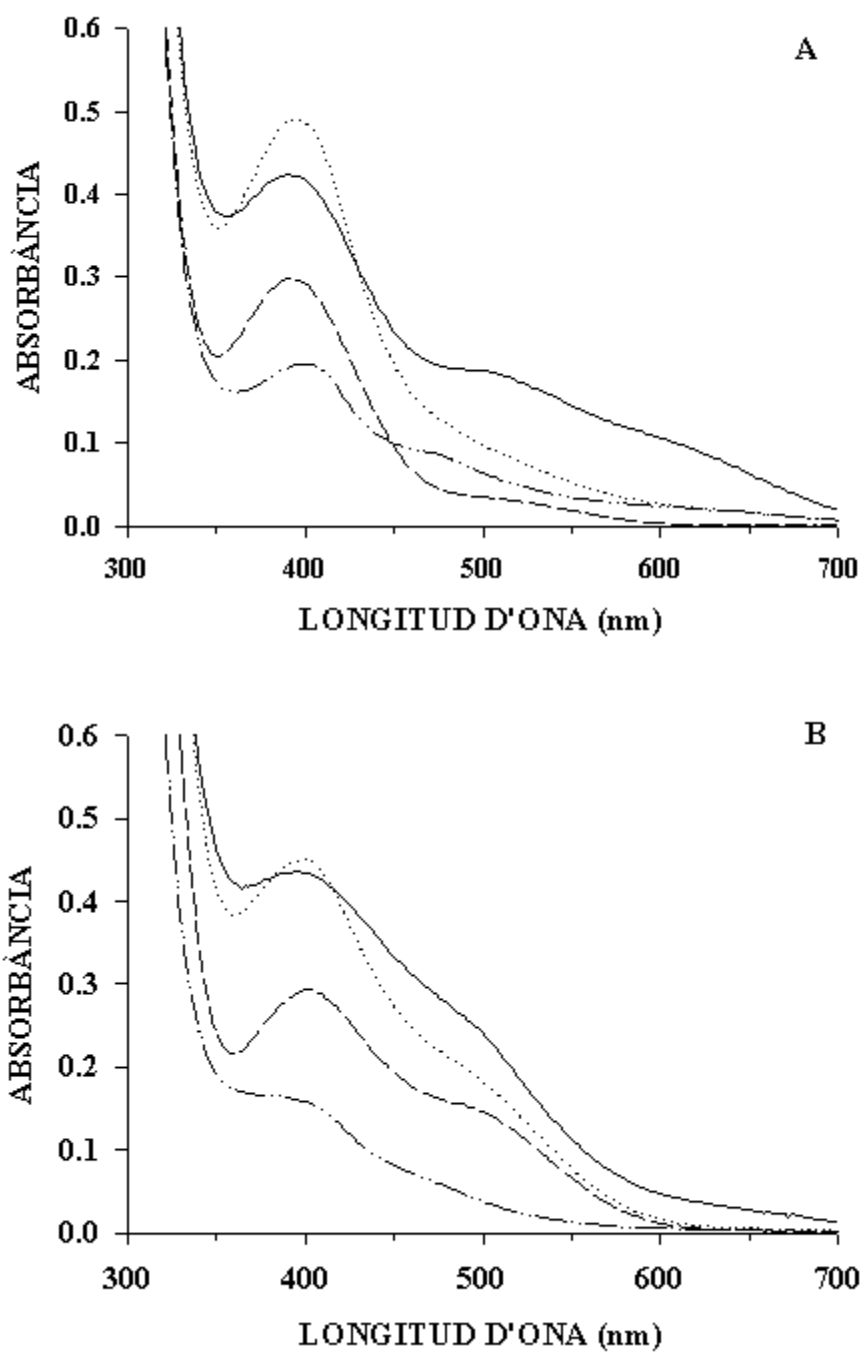


Figura 3.15 A-B. Espectres a l'inici (A) i als 20 s (B) de reacció de la levodopa (---), la benserazida (- -), l'espectre teòric resultant de la suma dels dos anteriors (....), i l'espectre real de la mescla (—).

A la figura 3.16 es mostren els perfils cinètics durant tot el temps de registre on s'observa que la presència d'aquesta interacció origina que el perfil corresponent a una mescla d'analits sigui clarament diferent a la suma dels perfils que presenten aquest quan es troben sols, a igualtat de condicions experimentals.

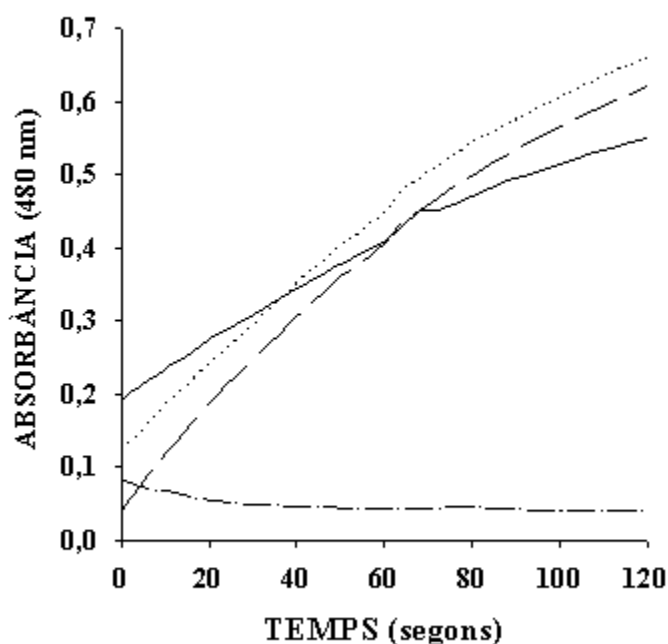


Figura 3.16. Perfils cinètics a 480 nm per la levodopa (---), la benserazida (- -), el teòric resultant de sumar els dos perfils anteriors (....), i el perfil real de la mescla (—).

En aquestes condicions, no es poden utilitzar moltes de les tècniques de calibració que normalment s'apliquen en la resolució cinètica de mescles. En aquest treball s'utilitza el PLS, i el nPLS, on es construeix el model de calibració a partir de mostres similars a les mostres que es vol quantificar, i que per tant, reproduïxen el seu mateix comportament. A partir de la informació proporcionada per aquestes mostres que contenen els analits a unes concentracions conegudes i en diferents proporcions, es construeix un model empíric on s'utilitza un nombre de factors addicionals als teòrics suposant un comportament lineal del sistema, i es pot modelar la presència

d'interaccions en els sistemes de forma general sense la necessitat de conèixer el model matemàtic que segueix el sistema cinètic, cosa que pot ser difícil i laboriosa d'establir en molts casos.

Com ja s'ha indicat anteriorment, malgrat que el PLS i el nPLS siguin mètodes d'espectre complet, capaços de corregir l'elevada colinearitat que existeix, especialment en el cas del registre cinètic, entre els valors de l'absorbància mesurada a diferents longituds d'ona i també a diferents temps, i que es disposa de relativament poques mostres pel procés de calibració, la precisió dels resultats pot ser afectada per les variables experimentals i pel mode espectral utilitzat. Així doncs, per a dur a terme la construcció dels diferents models, cal fer un bon disseny del conjunt de mostres utilitzades en la calibració, i escollir del gran nombre de variables registrades, les que contenen informació rellevant del sistema. Aquesta selecció de les variables experimentals es fa empíricament assajant varis intervals espectrals, escollits en funció dels espectres dels diferents productes de reacció, i varis intervals de temps, des de temps molt curts de registre fins a temps més llargs on la reacció per ambdues espècies ha tingut lloc de forma important, i així poder veure fins a quin moment l'evolució espectral dels productes formats ja no aporta una millora en els resultats. A part, també s'assagen models construïts amb els espectres de primera derivada, per a veure si es poden corregir els desplaçaments de la línia base que tenen lloc en el registre d'algunes mostres, i s'assagen models PLS1 i nPLS1 escalats per la benserazida per a veure si és possible donar més importància la seva contribució a la mescla i obtenir així millors resultats.

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

A diferència del treball anterior, ara disposem d'un nombre molt gran de variables experimentals (3500 valors d'absorbància que contenen l'evolució espectral de les diferents espècies presents), i per tant el número de possibles combinacions de variables per a construir els diferents models és molt superior.

Com era d'esperar, l'utilització de tot l'interval de longituds d'ona, en el qual hi ha informació relativa a les dues espècies, dona millors resultats, i únicament s'eliminen els valors inferiors a 328 nm, ja que aquests agafen valors d'absorbància massa grans i presenten molt de soroll. Pel que fa al temps de registre, es veu que per valors superiors a un minut no s'obtenen

millors ja que el producte d'oxidació de la benserazida ja s'ha descomposat pràcticament del tot, i òbviament les dades a temps superiors no contenen informació discriminant.

Un fet destacable és que s'obtenen pràcticament els mateixos resultats per aplicació de PLS1 i de nPLS1. En ambdós casos els millors resultats per la quantificació de la levodopa s'obtenen utilitzant els espectres de primera derivada (348-580 nm) mentre que per la benserazida s'obtenen amb els espectres d'absorbància (328-600 nm), i curiosament quan s'escalen les dades els resultats obtinguts són força pitjors. Això segurament es deu al fet que en escalar les dades, les diferències existents entre els duplicats de les mostres degudes a petites variacions de les constants de velocitat, es veuen engrandides i agafen major importància. El número de factors significatius trobats és de 3 per la levodopa i de 4 per la benserazida. En ambdós casos el número de factors significatius supera al número d'anàlits presents a les mostres i això malgrat en part es pugui atribuir a la presència de desplaçaments de la línia base que es donen puntualment per algunes de les mostres, sobretot s'atribueix a l'efecte de l'interacció present al sistema que provoca desviació de la linealitat, i la qual introdueix una nova font de variabilitat de les dades.

A la taula 3.5 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 i nPLS1.

S'observa una gran similitud als resultats obtinguts pel mètode d'anàlisi directe, on la levodopa es quantifica amb molt bona exactitud (RSEP = 0,7 %) i la benserazida amb una exactitud lleugerament inferior (RSEP = 1,5 %) encara que molt bona també. La reproduïbilitat del mètode analític és també molt bona.

Però el valor RSEP proporciona només una visió global de la exactitud dels resultats i per a obtenir una idea de com el mètode prediu en cada mostra la concentració de cada analít, es representen les concentracions afegides front a les trobades. A les figures 3.17 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 preparada al laboratori, on es veu que per tot el conjunt de mostres, la levodopa es quantifica amb un error relatiu inferior al 1,5 % i la benserazida inferior al 3%.

A la taula 3.6 es troben els paràmetres de la recta de regressió per les mostres de calibració i per les de predicció on els valors de l'ordenada en l'origen i del pendent mostren que no existeixen errors sistemàtics.

Els resultats derivats de l'aplicació dels models nPLS no es mostren ja que són pràcticament idèntics.

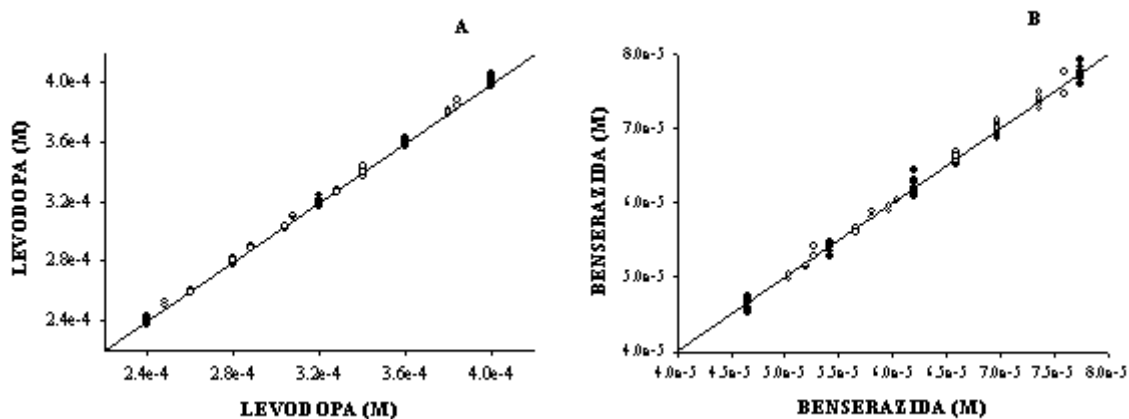


Figura 3.17 A-B. Concentració trobada per PLS1 per la levodopa (A) i la benserazida (B), vers la real en les mostres de calibració (●) i predicció (○).

Taula 3.5. Valors del RSEP%, R i ARSD% pel conjunt de calibració i predicció per les dues espècies obtinguts amb models PLS1 i nPLS1 amb dades de 1r derivada per la levodopa (348-580 nm) i dades d'absorbància per la benserazida (328-600 nm). Número de Factors: a = 3, b = 4

	model PLS bilineal						model PLS trilineal (nPLS)					
	Levodopa ^a			Benserazida ^b			Levodopa ^a			Benserazida ^b		
	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD	%RSEP	R(M)	%ARSD
Calibració	0,67	$5,3 \times 10^{-6}$	0,58	1,38	$1,6 \times 10^{-6}$	0,92	0,66	$5,1 \times 10^{-6}$	0,57	1,45	$1,7 \times 10^{-6}$	0,96
Predicció	0,61	$4,0 \times 10^{-6}$	0,44	1,13	$2,4 \times 10^{-6}$	1,32	0,57	$3,8 \times 10^{-6}$	0,41	1	$2,2 \times 10^{-6}$	1,22

Taula 3.6. Paràmetres de la recta concentració PLS vers concentració real de levodopa i benserazida, per a les mostres de calibració i predicció.

	Levodopa			Benserazida		
	Ordenada Origin	Pendent	Coefficient de correlació, r	Ordenada Origin	Pendent	Coefficient de correlació, r
Calibració	$(0 \pm 4) \times 10^{-6}$	$1,00 \pm 0,01$	0,9992	$(0 \pm 2) \times 10^{-6}$	$0,99 \pm 0,02$	0,997
Predicció	$(4 \pm 5) \times 10^{-6}$	$0,99 \pm 0,02$	0,9991	$(0 \pm 2) \times 10^{-6}$	$1,01 \pm 0,03$	0,996

III.5.3.4. COMPARACIÓ DELS MÈTODES DE CALIBRACIÓ EMPRATS

A partir de les dades mostrades a la taula 3.5 es veu que tant la reproduïbilitat com la capacitat predictiva dels dos mètodes de calibració són pràcticament anàlogues. És en la interpretació dels loadings, on les majors possibilitats del nPLS es veuen manifestades.

La principal característica de l'algoritme nPLS és que es manté l'estructura tridimensional de la matriu de dades, i en fer la descomposició en components principals, s'originen components trilinears. Enlloc d'un vector score i un vector loading com passa amb el PLS bilinear, en aquest nou model trilinear generat cada component consisteix d'un vector score i dos vectors loadings, un pel segon ordre de mesura (en aquest cas l'espectral) i un pel tercer ordre de mesura (la cinètica de reacció).

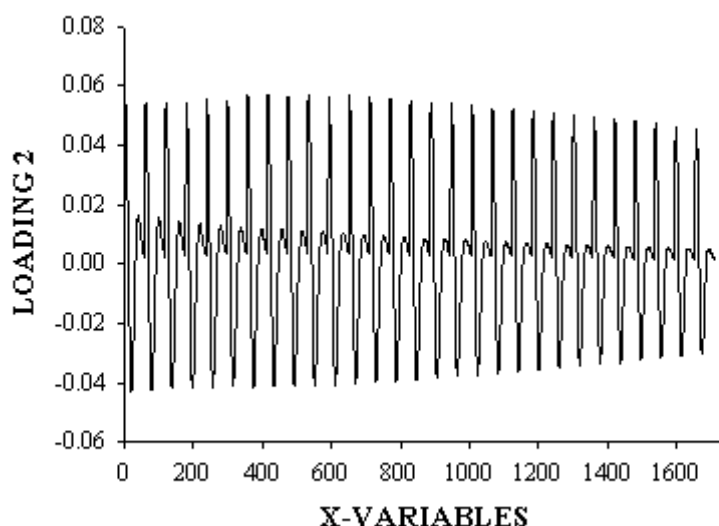


Figura 3.18. Gràfic del loading pel segon PC del model PLS de la benserazida. Aquest explica un 88% de la variança de la concentració.

Això vol dir que mentre que el PLS genera un conjunt de loadings que són combinació dels dos ordres de mesura de les dades, el model nPLS dóna de forma separada els loadings per a cada un d'ells, i la seva interpretació és més immediata i més segura.

A la figura 3.18 es mostra el loading del segon factor per al model PLS1 per la benserazida. Resulta molt difícil treure informació útil sobre el sistema a partir d'una simple observació visual de la figura. En aquest cas, cada registre es troba associat amb 69 valors diferents de longitud d'ona i cada longitud d'ona es troba alhora associada amb els 30 registres cinètics. A les figures 3.19 A-B es mostren els loadings dels factors que expliquen la major part de la variància de la matriu de concentracions de la levodopa (1r 93%) i la benserazida (2n 76%) en els models nPLS1. És evident que aquests loadings expliquen l'evolució cinètica d'ambdues espècies, amb un creixement de l'absorbància en un cas, i amb una disminució en l'altre.

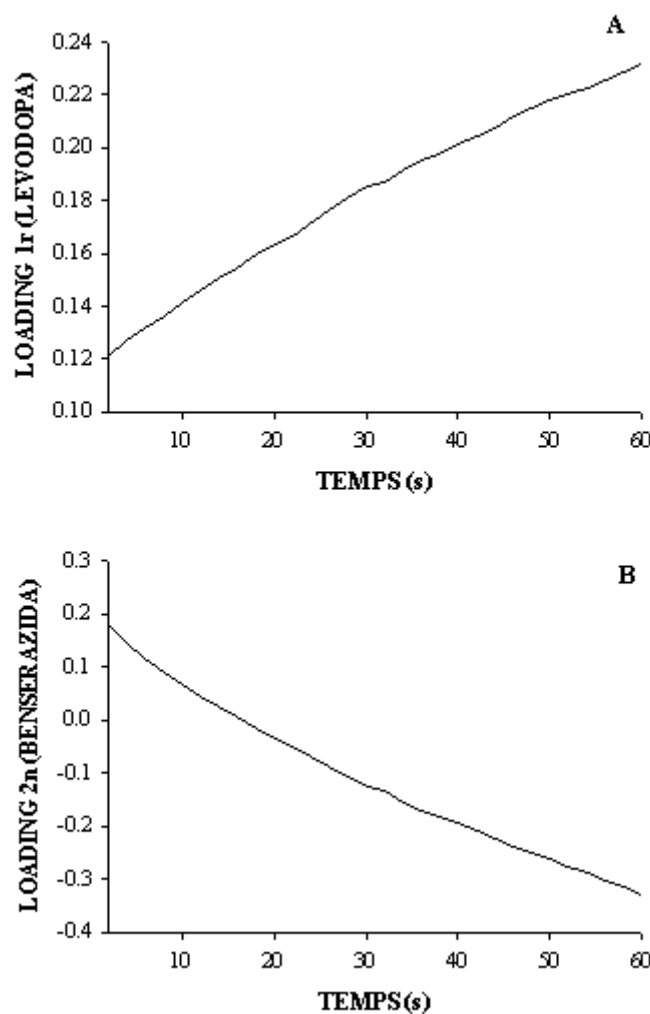


Figura 3.19. Gràfics dels loadings cinètics pels models nPLS. Levodopa (A), 93 % de la variància; benserazida (B), 76 %.

Per altra banda, el tercer loading (Figura 3.20) és pràcticament el mateix pels dos analits. Una possible interpretació és que aquest tercer component està explicant l'evolució de les espècies produïdes/generades en la reacció creuada. Aquestes espècies són quantitativament de poca importància per la predicció de la levodopa (la variància explicada de la matriu de la concentració és del 2 %), però molta més per la benserazida, la qual es troba en considerable defecte en el sistema (variància explicada del 11,1 %).

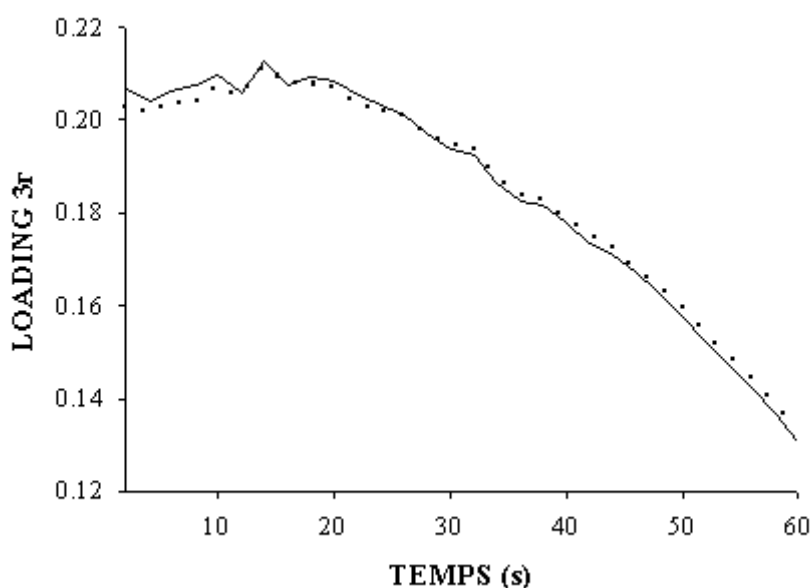


Figura 3.20. Gràfics dels loadings pel tercer factor dels models nPLS. Levodopa (—); benserazida (...).

III.5.3.5. 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, es va aplicar a l'anàlisi del preparat farmacèutic Madopar® de dos lots de producció diferents.

A la taula 3.7 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 i nPLS1, així com els obtinguts per HPLC.

Tal com es fa amb el mètode espectrofotomètric directe, es comparen els valors mitjos i la seva precisió mitjançant els test estadístics t i F , i es veu que per un nivell de significació del 95 % no hi ha diferència significativa entre el resultats obtinguts pel mètode cinètic i els obtinguts pel mètode cromatogràfic.

Taula 3.7. Contingut mig de levodopa i benserazida (mg/comprimet) i el seu corresponent interval a $\alpha=0,05$ (n=5), obtingut mitjançant HPLC i el mètode cinètic desenvolupat, tant en l'aplicació dels models PLS1 com dels models nPLS1.

	Levodopa			Benserazida		
	HPLC	mètode cinètic		HPLC	mètode cinètic	
		PLS1	nPLS1		PLS1	nPLS1
Lot 1	204 ± 2	201 ± 1	201 ± 1	49 ± 2	52 ± 2	52 ± 2
Lot 2	202 ± 2	200 ± 1	200 ± 1	50 ± 3	51 ± 3	51 ± 2

III.5.4. CONCLUSIONS

S'ha posat a punt un mètode d'anàlisi cinètic per a la quantificació simultània de levodopa i benserazida, i malgrat la complexitat inherent a aquest sistema, s'han obtingut resultats molt bons en la quantificació de les dues espècies. La complexitat es deu a la presència d'interacció entre les espècies que provoca que el comportament d'aquestes en mesclures sigui diferent al comportament en estat pur, cosa que provoca per un cantó que el senyal mesurat no sigui funció lineal de la concentració dels dos analítics i per l'altra l'aparició de nous productes d'oxidació els quals també absorbeixen a la zona estudiada. Es tracta d'una situació difícil de resoldre per a la majoria de tècniques de calibració i aquí s'ha vist la superioritat del PLS com a tècnica de calibració multivariant que pot ser utilitzada com a tècnica de calibració general en aquests tipus de sistemes. La gran flexibilitat de la calibració PLS permet construir un model empíric a partir de les dades experimentals sense necessitat de conèixer el model matemàtic que descriu el complex comportament del sistema, i prediu amb una gran exactitud i precisió mostres similars a les utilitzades a la calibració. A més, permet l'utilització conjunta d'informació cinètica i espectral mesurada per un nombre gran de longituds d'ona, cosa que millora l'exactitud en la quantificació de les dues espècies i també la precisió del mètode cinètic ja que es suavitza l'efecte de petites variacions de les constants de velocitat entre experiments, produïdes per petits canvis en les condicions experimentals. Però degut a la naturalesa tridimensional de les dades cinètiques, és també interessant l'aplicació del mètode de calibració nPLS, el qual a part de presentar les mateixes avantatges discutides a dalt, manté l'estructura de les dades originals enlloc d'intentar ajustar-les a la natura bidimensional del model PLS convencional. Aquest mètode posseeix un potencial més gran d'interpretació qualitativa del fenomen mesurat i en els models obtinguts es reflexen les dues fonts de variabilitat dels paràmetres registrats (la longitud d'ona i el temps).

El mètode cinètic desenvolupat s'ha aplicat a la quantificació de mostres del fàrmac comercial Madopar, obtenint-se resultats que no difereixen dels trobats pel mètode cromatogràfic.

3.6. REFERÈNCIES

- Bangalore, A. S.; Shaffer, R. E., Small, G.W.; Arnold, M. A., *Anal. Chem.*, **68**, 4200, 1996.
- Bershtein, I. Y., *Fresenius Z Anal. Chem.*, **332**, 227, 1988.
- British Pharmacopeia, vol. II, p. 846, H.M. Stationary Office, London UK, 1993.
- Bro, R., *J. Chemometrics.*, **10**, 47, 1996.
- Centner, V.; Massart, D. L.; Jong, S.; Vandeginste, B. M.; Sterna, C., *Anal. Chem.*, **68**, 3851, 1996.
- Davidson, G.A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **3**, 235, 1985.
- El-Kommos, M. E.; Mohamed, F. A.; Khedr, A. S., *Talanta*, **37**, 625, 1990a.
- El-Kommos, M. E.; Mohamed, F. A.; Khedr, A. S., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 516, 1990b.
- Haaland, D. M.; Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, **60**, 1193, 1988.
- Hamid, S.T.; Walker J., *Anal. Chim. Acta*, **105**, 403, 1979
- Hassib, S. T., *Analytical Letters*, **23 (12)**, 2195,1990.
- Llavero, M. P.; Rubio, S.; Gómez-Hens, A.; Pérez-Bendito, D., *Anal. Chim. Acta*, **229**, 27, 1990.
- Martens, H.; Naes, T., *Multivariate Calibration.*, John Wiley & Sons, Chichester, 1989.
- Miller, J.C.; Miller, J.N., *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Limited Publishers, Londres, 1988.
- Pelizzetti, E.; Mestasti, E.; Pramauro, E.; Giraudi, G., *Anal. Chim. Acta*, **85(1)**, 161, 1976.
- Ridder, G. M.; Margerum, D. W., *Anal. Chem.*, **49(13)**, 2090, 1977.
- Salem, F. B., *Talanta*, **9**, 810, 1987.
- Smela, M. J.; Stromberg, R., *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 289, 1991.
- Stryer, L., *Biochemistry*, Freeman, New York, 3rd., 1988.
- Vandeginste, B.G.M.; Massart, D.L.; Buydens, L.M.C.; de Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics Part B*, p. 143, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- Yucesoy, C.; Gazi. *Univ. Eczacılar Derg.*, **7**, 43, 1990.