

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PARKİNSON İLACINDA BULUNAN LEVODOPA VE BENSERAZİD
ETKEN MADDELERİNİN KEMOMETRİK TAYİNİ**

Tahir ÖZER

**Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Güzide ERTOKUŞ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2020**



©2020 [Tahir ÖZER]

TEZ ONAYI

Tahir ÖZER tarafından hazırlanan "**Parkinson İlacında Bulunan Levodopa ve Benserazid Etken Maddelerinin Kemometrik Tayini**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Analitik Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Dr.Öğr.Üyesi Güzide ERTOKUŞ
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof.Dr. Fethiye GÖDE
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Dr.Öğr.Üyesi Tuğba SARDOHAN KÖSEOĞLU
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



Enstitü Müdürü Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR



TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Tahir ÖZER



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
ÇİZELGELER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Parkinson Hastalığı	1
1.2. Levodopa.....	2
1.3. Benserazid	3
1.4. UV ve Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri	4
1.4.1. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları	5
1.5. Kemometri.....	6
1.6. Anova.....	8
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	10
3. MATERYAL VE METOT	10
3.1. Materyal.....	15
3.2. Kullanılan Cihazlar	15
3.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazı.....	15
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	15
3.3.1. Kullanılan Çözeltiler.....	16
3.3.1.1. Stok Levodopa Çözeltisi.....	16
3.3.1.2. Stok Benserazid Çözeltisi.....	16
3.3.1.3. UV/VIS Spektroskopisi Yöntemi	16
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	18
4.1. İlaç etken maddelerinden elde edilen spektrumlar	18
4.2. Sentetik Karışımın Absorpsiyon Spektrumu.....	19
4.3. Kemometrik Hesaplamalar	20
4.4. Kemometrik Yöntemler İçin ANOVA Testi.....	24
4.5. Yöntem Validasyonu	24
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	27
KAYNAKLAR	29
ÖZGEÇMİŞ.....	33

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PARKİNSON İLACINDA BULUNAN LEVODOPA VE BENSERAZİD ETKEN MADDELERİNİN KEMOMETRİK TAYİNİ

Tahir ÖZER

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Güzide ERTOKUŞ

Levodopa ve Benserazid içeren parkinson ilacını analiz etmeye yönelik yapılan bu tez çalışmasında, Ultra-Viyole Görünür Bölge Spektroskopisi, kemometri yöntemi ile birlikte kullanılmıştır. Levodopa ve Benserazid etken maddelerinin UV spektrumları alınarak, çalışma yapılabilen saflıkta olduğu belirlenmiş ve analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yöntemimizde, **levodopa ve benserazid** için yüzde (%) geri kazanım değerleri ortalama olarak gerek sentetik karışım için, gerekse ticari numune için hesaplanmıştır. Her bir yöntem için de geri kazanımlar yüksek değerlerde bulunmuştur.

Kullanılan PLS ve PCR kalibrasyon yöntemlerinden elde edilen sonuçlara ANOVA testi uygulanarak yöntemlerin doğruluğu test edilmiştir. Geliştirilen yöntemler, tekrarlanabilir, duyarlı ve doğru sonuç veren yöntemlerden biri olup **levodopa ve benserazid** içeren ilaç numunelerinin analizinde önerilebilir.

Anahtar Kelimeler: Levodopa, Benserazid, Kemometri

2020, 32 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

CHEMOMETRIC DETERMINATION OF LEVODOPA AND BENSERAZIDE ACTIVE SUBSTANCES IN PARKINSON DRUG

Tahir ÖZER

**Suleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Güzide ERTOKUŞ

In this thesis study to analyze parkinson drugs containing levodopa and benserazide, Ultra-violet visible region spectroscopy was used together with the chemometry method. By taking UV spectra of **levodopa and benserazide** active materials, it was determined that the work can be done in purity and analysis studies were carried out.

In our method, the percent (%) recovery values for levodopa and benserazide were found for the synthetic mixture, as an average, for the commercial sample. Within each method, the recoveries were found at high values.

The results obtained from the PLS and PCR calibration methods used were tested for the accuracy of the ANOVA test. The methods developed are reproducible, sensitive and accurate, and may be suggested in the analysis of drug samples containing **levodopa and benserazide**.

Keywords: Levodopa, Benserazide, Chemometry.

2020, 31 pages

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Dr. Öğr. Üyesi Güzide ERTOKUŞ'a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, FYL-2018-6859 nolu proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan aileme sevgi saygılarımı sunarım.

Tahir ÖZER

ISPARTA, 2020



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Levodopanin Kimyasal Yapısı.....	3
Şekil 1.2. Benserazidin Kimyasal Yapısı.....	3
Şekil 1.3. UV-Görünür Alan Spektrofotometresinin Şematik Gösterimi	5
Şekil 1.4. Kemometrinin İlişkili Olduğu Disiplinler	7
Şekil 4.1. Benserazid Etken Maddesinin Absorpsiyon Spektrumu.....	18
Şekil 4.2. Levodopa Etken Maddesinin Absorpsiyon Spektrumu	18
Şekil 4.3. Benserazid Maddesinin Absorbans-Derişim Grafiği.....	19
Şekil 4.4. Levodopa Maddesinin Absorbans-Derişim Grafiği	19
Şekil 4.5. Levodopa- Benserazid Karışım Çözeltilerinin Absorpsiyon Spektrumu	20
Şekil 4.6. Kemometrik Verilerden Elde Edilen Özdeğerlerin Grafiği.....	21

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Formülleri	15
Çizelge 4.1. Levodopa ve Benserazid İçeren Kalibrasyon Seti	20
Çizelge 4.2. Sentetik Olarak Hazırlanan Karışımındaki İlaç Maddelerinin PLS Kalibrasyonu İle Hesaplanan Sonuçlar	23
Çizelge 4.3. Sentetik Olarak Hazırlanan Karışımındaki İlaç Maddelerinin PCR Kalibrasyonu ile Hesaplanan Sonuçlar	23
Çizelge 4.4. Kemometrik Yöntemlerin Hesaplanan Validasyon Parametreleri ...	25
Çizelge 4.5. İlaç Numunesindeki Sonuçlar	26



KISALTMALAR

PCA	Temel bileşen analizi
PCR	Bileşen regresyonu yöntemi
PLS	Kısmi en küçük kareler yöntemi
ppm	Milyonda bir değer
UV	Ultraviyole
BSS	Bağıl standart sapma
LOD	Gözlenebilme sınırı
LOQ	Tayin sınırı



1. GİRİŞ

1.1. Parkinson Hastalığı

Nöroloji kapsamında yer alan önemli bir hastalık grubu da hareket bozukluklarıdır. Hareket bozuklukları içinde en sık rastlanana ise Parkinson hastalığıdır (Türe vd. 2007).

Parkinson hastalığı, yavaş ilerleyen bir hastalık olup, beyinde dopamin salgılayan hücrelerin hasarı sonucu dopamin eksikliği olarak ortaya çıkar. Parkinson hastalığının belirtileri kademeli olarak ortaya çıktığı için erken teşhisi zordur ve Alzheimer hastalığından sonra ikinci en yaygın nörolojik hastalıktır. Parkinson hastalarında sabit halde titreme, hareketlerde yavaşlama, kaslarda sertlik ve denge kaybı belirtileri görülür. Bu belirtilere ek olarak ruhsal değişiklikler, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları ve depresyon belirtileri gözlenir ve bu belirtiler zamanla kötüleşebilir. Konuşma bozuklukları parkinson hastaları arasında çok yaygındır. Hastaların yaklaşık % 90'ında bu belirti görülür (Eskidere, 2012).

Erken evrede birçok hasta levodopa veya dopamin agonistleri ile tedavi edilir. Genel olarak dopamin agonistleri genç yaştaki hasta grubunda, orta derecede hastalık düzeyinde tercih edilir. Levodopa hastalığı ilerlemiş daha ağır motor semptomları olan yaşlı hasta gruplarında tercih edilir. Hastaların yaklaşık %40'ında, levodopa tedavisinin beşinci yılında motor değişiklikler ve diskinezi gelişir. Parkinson hastalığı ilerledikçe, hastalar günlük işlerini yapabilme yeteneklerini kaybeder. Kaslarda oluşan atrofi ve kontraktürü önlemede medikal tedavi yanında egzersiz tedavisinin de çok yararı vardır (Tüzün vd. 2010).

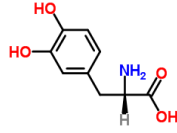
Parkinson hastalığı, medikal tedaviden yeterince yarar sağlanamadığı dönemde cerrahi tedaviden önemli ölçüde yarar gören bir hastalıktır. Bu cerrahi tedaviler

deneyimli merkezlerce uygulandığında yüksek etkinlikli ve düşük riskli uygulamalardır (Savaş, 2008).

1.2. Levodopa

Levodopa (L-3,4-dihidroksi-fenilalanin) dopamine metabolize olan aromatik amindir. Oral yolda kullanılan antiparkinson etkili bir ilaçtır. Tedaviye ilk sunulduğu 1960 yılında Parkinson hastalığının tedavisinde bir devrim niteliğinde olan ve Parkinson hastalığının tedavisi bakımından halen bir altın standart olarak kabul edilmektedir. Araştırmalar Parkinson hastalığı belirtilerinin corpus striatum'da dopamin tükenmesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Dopamin kan-beyin engelini aşamaması nedeniyle Parkinson hastalığında dopamin tedavisi etkisizdir. Ancak, dopaminin metabolik ön maddesi levodopa kan-beyin engelini aşar ve bazal gangliyonlarda dopamine dönüşür. Levodopanin Parkinson hastalığı belirtilerine karşı bu mekanizma ile etkili olduğu düşünülmektedir. Levodopa oral olarak uygulandığında beyin dışında kalan dokularda hızla dopamine dönüştüğünden, verilen dozun ancak bir kısmı değişime uğramadan santral sinir sistemine ulaşır. Bu nedenle yeterli etki elde edebilmek için yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu dozlarda da sıklıkla bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen etkiler ortaya çıkar. Bu etkilerin bir bölümü periferde yani ekstraserebral dokularda oluşan dopamine bağlıdır. Levodopa bu nedenle karbidopa veya benserazid gibi aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla kombine preparatları şeklinde kullanılır.

Levodopa (Şekil 1.1), beyaz veya açık krem renkli, kokusuz, kristalize bir tozdur. Nemli ortamda havadaki oksijenden etkilenecek hızla okside olur ve kararır. Suda az çözünür; 1 M HCl çözeltisinde serbestçe çözünür; pratik olarak alkol, kloroform ve eterde çözünmeyen aromatik bir aminoasit türevidir (Demircigil,2010). Molekül ağırlığı 197.2 g/mol Formülü $C_9H_{11}NO_4$ 'tür (Krishna, 2014).



Şekil 1.1. Levodopanin Kimyasal Yapısı

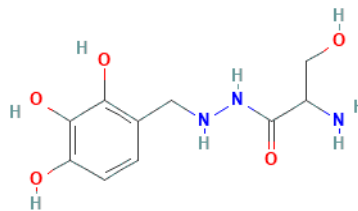
1.3. Benserazid

Benserazid, levodopa ile birlikte kullanılan tek başına herhangi bir antiparkinson etkisi göstermeyen bir ilaçtır. Periferik bir dekarboksilaz inhibitörü olduğu için levodopa'nın periferde dopamin'e dönüşmesini engeller. Levodopa gibi kan-beyin bariyerini aşmaz (Üstünes 2009).

Levodopa oral olarak uygulandığında beyin dışında kalan dokularda hızla dopamin'e dönüştüğünden, verilen dozun ancak bir kısmı değişime uğramamış şekilde santral sinir sistemine ulaşır. Bu nedenle yeterli etki elde edebilmek için yüksek dozlarda uygulanması gerekir. Bu dozlarda da sıklıkla bulantı ve kardiyak aritmiler gibi istenmeyen etkiler ortaya çıkar. Bu etkilerin bir bölümü periferde oluşan dopamin'e bağlıdır. Bu nedenle benserazid gibi bir aromatik amino asit dekarboksilaz inhibitörü bir ilaçla levodopa'nın kombine kullanımı gerekmektedir.

Bu kombinasyon tek başına yüksek dozlarda uygulanan levodopa'dan daha etkili olup çok daha iyi tolere edilebilir.

Benserazid (Şekil 1.2), beyaz renkte suda çok iyi çözünen aromatik amino asit dekarboksilasyon inhibitörüdür (Demircigil,2010). Formülü $C_{10}H_{15}N_3O_5$ ve molekül ağırlığı 257.24 g/mol'dür.



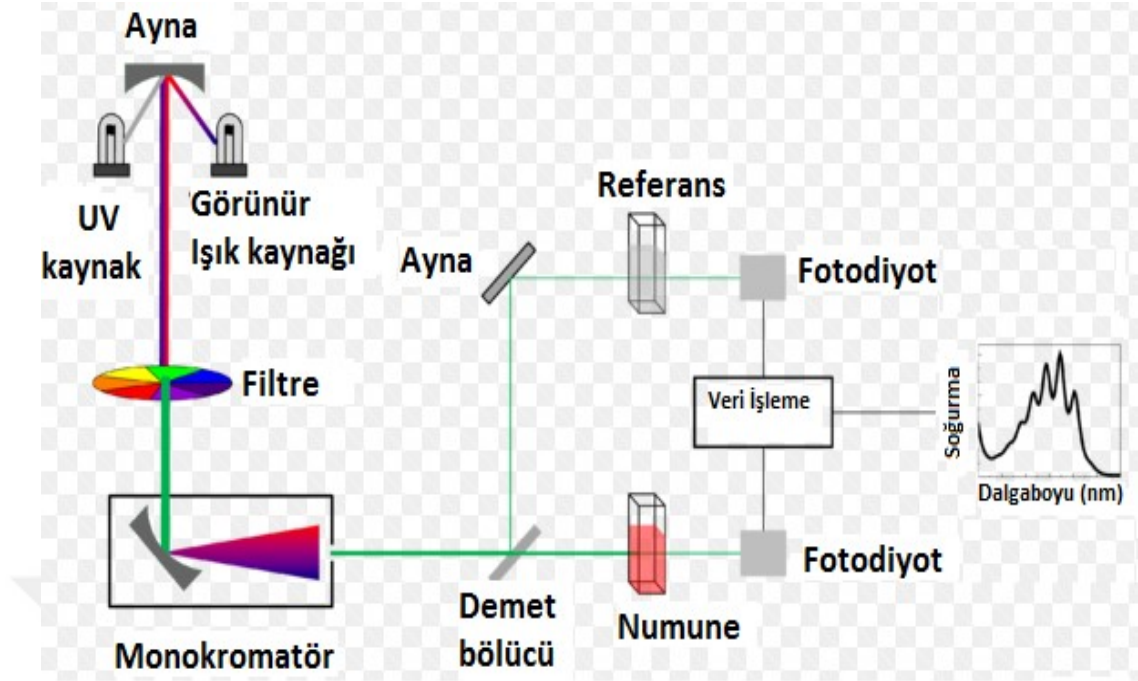
Şekil 1.2. Benserazidin Kimyasal Yapısı

1.4. UV ve Görünür Bölge Absorpsiyon Spektrofotometreleri

Maddelerin ışığı absorplamasını incelemek için kullanılan cihazlara absorpsiyon spektrometresi veya absorpsiyon spektrofotometresi adı verilir. Bir spektrofotometre düzeneği ışık kaynağı, dalga boyu seçicisi(monokramatör) ve dedektörden oluşur.

Işık kaynağından gönderilen ışık demetleri monokramatör yardımıyla tek bir dalga boyuna ayarlanarak incelenecek örnek kabı üzerine gönderilir. İncelenecek örnek spektrometre ile fotometre arasına, küvet olarak adlandırılan, genellikle sert plastikten ya da quartz'dan yapılan özel tüp içine yerleştirilir. Farklı örnekler farklı dalga boylarını absorbladıkları için öncelikle bu aralığın örneğimize uygun olması gerekir. Küvete gönderilen ışık demetinin örnek üzerinden yansımaları veya absorblanması sonucu oluşan azalmalar optik sinyal olarak dedektöre gelir. Dedektörde elektrik sinyaline çevrilen optik sinyal bir kaydedici ile ölçülür.

UV ve görünür bölge spektroskopisi genellikle çözeltideki moleküller veya inorganik iyon ve komplekslerin ölçümünde kullanılır.



Şekil 1.3. UV-Görünür Alan Spektrofotometresinin Şematik Gösterimi

Dalga boyu 110 nm – 1000 nm arasındaki UV ve görünür bölge ışınları ile çalışılabilen cihazlara UV ve Görünür Bölge Spektrofotometreleri denir (Şener, 2006).

1.4.1. UV ve görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisinin uygulamaları

Nitel Analiz: Analizi yapılacak olan bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra uygun bir çözücünde çözülerek spektrumu alınır. Bu spektrum bilinen bileşiklerin aynı koşullarda çekilmiş spektrumları ile karşılaştırılır. Bilinmeyen madde spektrumu kendisinininkine tam olarak uygun maddedir. Bu yöntem nitel analiz için çok uygun bir yöntem değildir. Çünkü moleküllerin absorpsiyon bantları oldukça geniştir ve bazı kromoforların absorpsiyon bantları birbiri ile örtüşebilir.

Nicel Analiz: Işının absorplamasına dayanan analiz yöntemleri nicel analiz için oldukça yarar sağlayan ve güvenilir yöntemlerdir. Bu yöntemlerin klasik yöntemlere göre önemli avantajları vardır. Analiz süresi kısa olduğundan sonuç çabuk alınır. Oldukça duyarlı ve hızlı bir yöntemdir.

Her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu olduğu için seçiciliği yüksektir. Çoğunlukla bir karışımdaki maddeler, saflaştırılıp çözücü içinde çözülme işlemine gerek kalmaksızın analizleri yapılabilir.

Hem organik hem de anorganik pek çok molekül UV ve görünür bölge ışınları absorpladığından uygulama alanı oldukça geniştir (Şener, 2006).

1.5. Kemometri

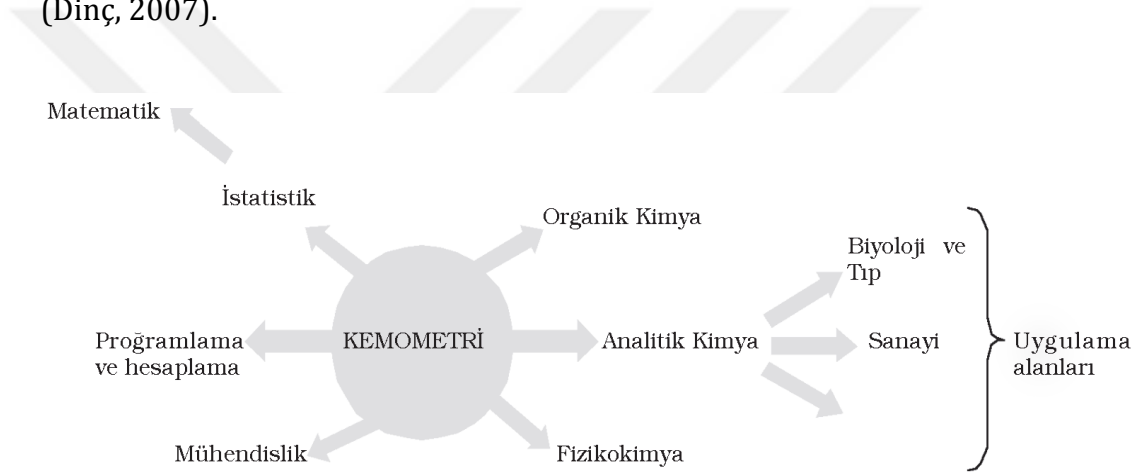
Kemometri kelime olarak, 1970'li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimya uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürüldü ve 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapıldı (Dinç, 2007).

Kemometri, faydalı bilgilerin maksimum toplanmasına ve çıkarılmasına izin vermek için analitik verilere istatistiksel ve matematiksel yöntemlerin uygulanmasıdır. Kemometrik tekniklerin, seçilen spektroskopik, elektrokimyasal ve kromatografik yöntemlerin çok boyutlu kalibrasyonunu sağlayan araçlar olarak kullanıldığı gösterilmiştir. Bu yaklaşımın esas olarak UV-Vis ve IR'ye yakın (NIR) spektrumlarının yorumlanması için ve diğer araçsal yöntemlerle elde edilen veriler için uygulanması, özellikle farmasötik analizde, karmaşık karışımlardaki aktif maddelerin tanımlanması ve nicel analizini mümkün kılar. Bu tür analitik çalışmalar, deney tasarlamada, aletleri kalibre etmede ileri yöntemlere ihtiyaç duyulmasına yol açan ileri kimyasal aletlerin ve veri işlemlerin kullanılması ile gerçekleştirilir ve elde edilen verileri analiz eder (Gindy, 2012).

Kemometri; analitik kimya, adli tıp, biyoloji, gıda kimyası, çevre kimyası, arkeoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır. Fizikokimyacılar ve madde bilimciler, sinyal işleme ve çok değişkenli verilerin analizinde kemometrik yöntemleri kullanmaktadırlar (Şekil 1.4). Organik kimyacılar ve farmasötik kimyacılar,

reaksiyon koşullarının optimizasyonu, deneysel tasarım ve ilaç tasarımı gibi alanlarda kemometri yöntemlerini kullanmaktadırlar (Dinç, 2007).

Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik (descriptive and inference statistics), sinyal işleme (signal processing), deneysel tasarım (experimental design), modelleme (modeling), kalibrasyon (calibration), optimizasyon (optimization), yapı tanıma (pattern recognition), sınıflandırma (classification), yapay akıl yöntemleri (Artificial intelligence methods), resim işleme (image processing), bilgi ve sistem kuramı (information and system theory) gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır (Dinç, 2007).



Şekil 1.4. Kemometrinin İlişkili Olduğu Disiplinler (Dinç, 2007)

Yukarıdaki şemadan da anlaşılacağı üzere kemometrik çalışmalarda, analitik kimyacıların ve diğer ilgili disiplinlerin ihtiyaçları doğrultusunda uygulamalı matematik ve istatistik bilgisine sahip olmaları gerekliliği açıktır. Burada programlama ve hesaplama çok önemlidir. Kemometrik uygulamalar kompleks hesaplamalar içermektedir. Bu hesaplamaları elle veya basit hesap makinalarıyla gerçekleştirmek mümkün olmadığı için bilgisayar programlarına ihtiyaç duyulur. Kemometrik hesaplamalarda genellikle EXCEL, MATLAB ve diğer paket programlar kullanılmaktadır (Dinç, 2007).

1.6. Anova

Varyans analizi kullanılarak grup ortalamaları arasındaki farklılığın veya farklı analitik yöntemler ile elde edilen analiz sonuçlarının ortalamalarının arasındaki farklılığın önemli olup olmadığına bakılabilir. Bir araştırmada k tane işlemin (veya k tane yöntemin) n tekrarının sonunda elde edilen veriler bir tabloda özet haline getirilir. Sonra kontrol ve karşıt hipotezi aşağıdaki şekilde kurulur.

H_0 : İşlemlerin temsil ettiği popülasyon ortalamaları arasındaki fark tesadüften ileri gelmektedir. İşlem ortalamaları arasındaki gözlenen fark sıfır kabul edilebilir:

$$\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots = \mu_k \text{ dir.}$$

H_1 : En az iki muamele grubunun ortalaması arasında gözlenen fark tesadüften ileri gelmektedir. En az iki işlem grubunun incelenen özellik üzerine olan etkileri birbirinden farklıdır, bu durumda da aralarındaki fark istatistiksel olarak önemli olmaktadır.

Karşıt hipotez kurulurken en az iki işlem arasındaki farkın önemli olduğu söylenilmektedir. Çünkü kontrol hipotezi yapılan analiz sonucuna göre reddedilmesi için denemede dikkate alınan k tane işlemin birbirinden farklı olması gerekmez. En az iki işlem arasındaki farklılık kontrol hipotezinin reddedilmesine sebep olabilir.

Yapılan hipotez kontrolü sonucunda karşıt hipotez kabul edilmiş ise bu en az iki grup ortalaması arasındaki farklılığın önemli olduğu “çoklu karşılaştırma yöntemleri” kullanılarak araştırılır.

Gruplar arası, gruplar içi serbestlik dereceleri ve gruplar arası- gruplar içi kareler toplamı hesaplanır (Dinç, 2009).

ANOVA, araştırmalarda en sıklıkla kullanılan istatistiksel tekniklerdendir. Ortalamalar arasındaki farkın anlamlılığını test etmek için t-testi ve çoklu

gruplar için kullanılan ANOVA, varyans analizinin başlıca tekniğidir (Köse, 2014).



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Coello ve arkadaşları, 2000 yılında yapılan çalışmada asidik bir ortamda KIO ile oksidasyon reaksiyonlarından levodopa ve benserazidin eşzamanlı kinetik-spektrofotometrik tayini için bir yöntem geliştirmişlerdir. Her iki tür de anında okside olur ve 400 nm'ye yakın maksimum absorbans değerleri sunan bileşiklere yol açmaktadır. Oksitleyici madde fazlalığında, levodopa türevi, karşılık gelen aminokromu oluşturulur (480 nm), benserazid türevi ise renksiz bileşikleri elde etmek için ayrıştırılır. 500-700 nm bölgesinde absorpsiyon bantları ile yeni bileşiklerin ortaya çıkması, ayrıca, bir I ve II karışımına oksitleyici ajan eklendiğinde de görülmektedir. Bu bileşikler ayrıca renksiz ürünlerin ayrışmasını ve oluşmasını sağlamaktadır. Sistemin karmaşıklığına rağmen incelenen, bi-lineer kısmi en küçük kareler (PLS) ve üç yollu kısmi en küçük kareler (nPLS) ile kalibrasyon, her iki analitin levodopa için % 0.7 ve benserazid için % 0.7 sırasına duyarlılıkla ölçülmesine izin vermektedir. PLS ayrıca, ortaya çıkan olayların nitel yorumunu sağlamaktadır. Önerilen yöntem, ticari, farmasötik preparasyon, madopar'a analitik referans tekniği olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) uygulanmıştır.

Demircigil, 2010 yılında yapılan çalışmada Parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan levodopa- karbidopa ve levodopa-benserazid ikili karışımlarını analiz edilmiştir. Bu ilaç etken maddelerinin birlikte kullanımı daha etkin bir tedaviyi sağlamaktadır. Her iki grupta yer alan bu ikili ilaç karışımının aynı anda analizi için en uygun ortam ve elektrokimyasal yöntemler incelenmiş, yeni, basit, hızlı, duyarlı ve herhangi bir ayırma işlemine gerek duyulmayan seçici analiz yöntemleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu amaca ulaşabilmek için son zamanlarda büyük gelişme kaydeden elektrokimyasal teknikler kullanılmıştır. Bu çalışmada elektrokimyasal analizler temel alınmış ve ölçülen değerler voltamogram oranları türev voltametrisi teknikleri ile değerlendirilerek karışım içerisindeki etkin maddelerin hiçbir ayırma işlemi gerekmeksizin miktar tayinlerini yapılmıştır. Geliştirilen yöntemlerin bu ikili etken madde

karışımlarını aynı anda içeren ilaç dozaj formlarından etken maddelerin aynı anda analizine uygulanabilirliği araştırılmıştır.

Dinç ve arkadaşları, 2007 yılında yapılan çalışmada levodopa-benserazid tabletlerin eşzamanlı analizleri ve çözünme testleri, herhangi bir kimyasal ayırma basamağı kullanmadan, sürekli dalgacık dönüşümü (CWT) ve klasik türev spektrofotometrisi (DS) ile gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen iki spektrofotometrik çözünürlük, orijinal UV spektrumunun dönüşümüne dayanmaktadır. USP simüle edilmiş mide suyunda 1-80 /g / mL ve 5-240 µg / mL konsantrasyon aralığında levodopa ve benserazidin orijinal absorpsiyon spektrumları 250-310 spektral aralığında kaydedilmiştir. İstenen kalibrasyon grafiklerini elde etmek için en uygun sinyal işleme ve araştırılan ilaçların güvenilir şekilde belirlenmesi için çeşitli dalgacık aileleri ve farklı spektrofotometrik türev siparişleri test edilmiştir. Yöntemlerin optimize edilmiş koşulları altında, altıncı düzende (SYM6 – CWT) $a = 128$ ve $\Delta \lambda = 10$ ile ilk türev dönüşümü kullanan dalgacıklar ve çözünme testleri için en uygun sinyal işleme yöntemleri olarak belirlenmiştir. Her ilaç için kalibrasyon fonksiyonları, CWT ve türev genlikleri değerleri ölçülerek elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin validasyonu, araştırılan ilaçların çeşitli sentetik karışımlarının analiz edilmesiyle doğrulanmıştır. Sentetik karışımlarda BEN ve LEV tayininde, ortalama geri kazanım değerleri DS için % 99,1 ile % 104,7 ve CWT için % 100 ile % 102,9 arasında bulunmuştur. Geliştirilen her yaklaşım, ticari tabletlerinde levodopa ve benserazidin eşzamanlı belirlenmesi ve çözülme testine başarıyla uygulanmış ve iyi bir uyum gözlenmiştir.

Uslu ve Özkan, 2002 yılında yapılan çalışmada L- dopa (LD) ve benserazid (BEN) in ikili karışımları, ilk önce spektrum türev spektrofotometresi spektrumları ile analiz etmişlerdir. Prosedürler doğru, tahribatsız ve herhangi bir ayırma basamağı gerektirmemiştir. Bu yöntem, ilk önce oran spektrumunun türevine, ikili karışımın emme spektrumunun bileşenlerden birinin standart bir spektrumuna bölünmesi ve ardından oran spektrumunun birinci türevinin hesaplanmasıyla bağlıdır. Oranın ilk türevi LD için 287.7 nm'de ve BEN için

251.4 nm'de belirlenmiştir. LD için 10 ile 70 ug/mL ve BEN için 5 ile 50 ug/mL konsantrasyon aralığında uyulmuştur. Bu yöntem sentetik karışımlarda ve farmasötik preparatlarda iki ilacın tespitinde başarıyla uygulanmıştır.

Xie ve arkadaşları, 2015 yılında yapılan çalışmada alternatif dörtlü dekompozisyona (AQLD) dayalı enzim indüklü uyarma-emisyon-kinetik üçüncü dereceden kalibrasyon yöntemini kullanarak insan plazma matrislerinde iki hedef analit, tirozin (Tyr) ve levodopa (Ld) eşzamanlı tayini için bir yöntem geliştirilmiştir. Tyr ve Ld'nin bir katalizör olarak polifenol oksidaz kullanılarak oksidasyon reaksiyonlarından ustaca yararlanılmıştır. Dört yollu bir veri dizisi, bir grup örnek için uyarım-emisyon matrisi floresansının kinetik evrimi tarafından oluşturulmuş ve bunu dört yönlü veri ayrıştırma izlemiştir. Önerilen yöntem, tatmin edici sonuçlarla plazma örnek analizlerinde uygulanabilmiştir. İnsan plazmasında gerçek Tyr konsantrasyonu $8.80 \pm 0.54 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak belirlendi, ancak sunulan örnekte Ld bulunamamıştır. Referans metot olarak tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak yapılan F-testi ve t testi, bu iki yöntem arasında anlamlı fark olmadığını gösterilmiştir. Tatmin edici sonuçlar, bu üçüncü dereceden kalibrasyon yönteminin, özellikle bilinmeyen spektral enterferansları ve mevcut ciddi kolinerite problemlerini içeren karmaşık sistemlerde, doğru nicel analizler yapma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Yücesoy, 1994 yılında yapılan çalışmada levodopa ve benserazidin kombine preparatlarından bir arada tayini için spektrofotometrik yöntemler geliştirmiştir. Yöntem, levodopanin 0.1 N HCl'deki çözeltisinin birinci türev spektrumunda 271.6 nm de (I), ikinci türev spektrumunda 239.4nm de (II) ve benserazidin 0.1 N HCl deki çözeltisinin ikinci türev spektrumunda 219.4 nm de ölçümüne dayanmaktadır. Söz konusu bileşiklerin standart ilavesi yöntemiyle % geri kazanımları levodopa için % 100.6 (I) ve % 99.2 (II), benserazid için ise % 100.2 dir. Bu etken maddeleri (4:1) oranında içeren

Madopar kapsüllerinin analizinde bağıl standart sapma levodopa için % 1.41 (I) ve % 1.16 (II), benserazid içinse % 1.49 bulunmuştur.

Zapata ve arkadaşları, 2010 yılında yapılan çalışmada camsı bir karbon elektrotu üzerinde diferansiyel darbe voltametrisine (DPV) ve farmasötik formülasyonlarda levodopa, karbidopa ve benserazidin eşzamanlı tespiti için kısmi en küçük kareler (PLS-1) algoritmasına dayanan analitik bir metodoloji geliştirilmişlerdir. Elektrokimyasal veriler için bazı çift doğrusallık sapma kaynakları tartışılmış ve analiz edilmiştir. Çok değişkenli model, üçlü bir kalibrasyon modeli olarak geliştirilmiş ve üretici özelliklerine göre, eksipiyanların varlığında bağımsız bir ilaç karışımları seti ile oluşturulmuştur. Önerilen yöntem, levodopa-karbidopa (10: 1) ve levodopa-benserazid (4: 1) karışımlarını içeren iki ticari formülasyonun hem tahliline hem de homojenlik içeriğine uygulanmıştır. Sonuçlar, yüksek performanslı sıvı kromatografisine dayanan referans farmakopesi yöntemi uygulanarak elde edilenlerle tatmin edici ve istatistiksel olarak karşılaştırılabilmiştir. Sonuç olarak, PLS-1 algoritması ile işlenen DPV verilerine dayanarak önerilen metodoloji, yardımcı maddeler varlığında bu ilaçlar için üçlü bir kalibrasyon modeli kullanarak farmasötik formülasyonlarında eşzamanlı olarak levodopa, karbidopa ve benserazid miktarını belirleyebilmiştir. Ayrıca, model, esnek kemometrik PLS-1 yaklaşımı tarafından göz önünde bulundurulmuş olan, işlenmiş verilerde hafif potansiyel kaymaların varlığında bile başarılı görünmektedir. PLS-1 algoritması ile işlenen DPV verilerine dayanarak önerilen metodoloji, yardımcı maddeler varlığında bu ilaçlar için üçlü bir kalibrasyon modeli kullanarak farmasötik formülasyonlarında eşzamanlı olarak levodopa, karbidopa ve benserazid miktarlarını ölçülebilmıştır. Ayrıca, model, esnek kemometrik PLS-1 yaklaşımı tarafından göz önünde bulundurulmuş olan, işlenmiş verilerde hafif potansiyel kaymaların varlığında bile başarılı görünmektedir. PLS-1 algoritması ile işlenen DPV verilerine dayanarak önerilen metodoloji, yardımcı maddeler varlığında bu ilaçlar için üçlü bir kalibrasyon modeli kullanarak farmasötik formülasyonlarında eşzamanlı olarak levodopa, karbidopa ve benserazid miktarlarını ölçülebilmıştır. Ayrıca, model, esnek

kemometrik PLS-1 yaklaşımı tarafından göz önünde bulundurulmuş olan, işlenmiş verilerde hafif potansiyel kaymaların varlığında bile başarılı görünmektedir.

Wang ve arkadaşları, 2005 yılında yapılan çalışmada levodopa (L-dopa) ve benserazid (BS) ve safsızlığının (*R, S*) -2-amino-3-hidroksipropanohidrazid'in (Ro-) hızlı ve etkili bir şekilde ölçülmesi için amperometrik saptamaya sahip yeni bir yöntem, kılcal elektroforez geliştirmişlerdir. Uygun ayırma ve amperometrik algılama koşulları araştırıldı ve optimize edilmiştir. Optimum CZE tespiti koşulları, çalışma tamponu olarak pH 5.3'te 40 mm fosfat çözeltisi, 17 kV ayırma gerilimi, karbon-disk çalışma elektrotu, tespit potansiyeli olarak 0.95 V (Ag / AgCl'ye göre) ve 17 s'de 8 s numune enjeksiyonu kullanılmıştır. Doğrusal aralıklar L-dopa için 1.25 ila 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 1.2×10^{-1} ila 25.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ BS ve 1.0×10^{-2} ila 4.4×10^{-1} $\mu\text{g mL}^{-1}$ sırasıyla 0.9994, 0.9951 korelasyon katsayıları ile Ro-04-1419 için, ve 0.9933. L-dopa, BS ve Ro-04-1419 için tespit limitleri sırasıyla 0.38, 0.02 ve 0.004 mLg mL^{-1} dır. Ortalama geri kazanımlar L-dopa için% 100.2, BS için% 102.4 ve Ro-04-1419 için% 90.8 dır. Bu yöntem ko-beneldopa granüllerine ve tabletlerine başarıyla uygulanmıştır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Materyal

Bu çalışmada, ultra-viyole spektrofotometrisi ve kemometri yöntemleriyle Parkinson tedavisinde kullanılan ilaç etken maddeleri olan levodopa ve benserazidin miktar tayini yapılmıştır. Elde edilen veriler, kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. Önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan ilaç tablet numunesinde ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, Minitab 17 programı ile hesaplanmıştır.

3.2. Kullanılan Cihazlar

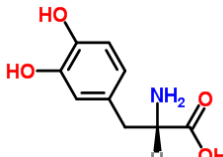
3.2.1. UV-Görünür Bölge Spektrofotometre Cihazı

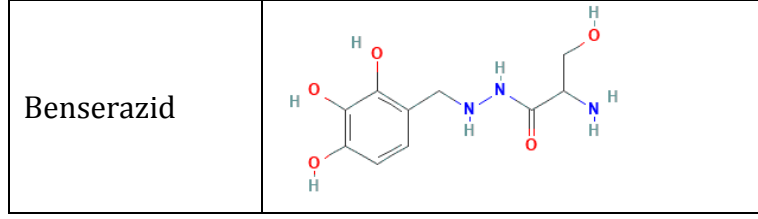
Ultra-viyole spektrumları, bilgisayar tarafından kontrol edilen 1 cm uzunluğundaki hücre ile donatılan Uv 1700 pharماسpec shimadzu spektrofotometresi kullanılarak belirlenen spektrum değerleri Parkinson ilaçlarındaki levodopa ve benserazid miktarını belirlemek için kemometrik metoda uygulanmıştır.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde analitik saflıkta olan kimyasallar kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan kimyasallar Çizelge 3.1' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasallar ve Formülleri

BİLEŞİĞİN ADI	BİLEŞİĞİN FORMULÜ
Levodopa	



3.3.1. Kullanılan Çözeltiler

Çalışmada spektrofotometrik ölçümler için, levodopa ve benserazidin 25 mg/250 mL 0,1 M HCl olacak şekilde stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözücü olarak kullanılan çözelti, 0,1 M HCl çözeltisidir.

3.3.1.1. Stok Levodopa Çözeltisi

Levodopa maddesinden 0,0248 g tartılarak bir miktar çözücüde çözüldükten sonra son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.1.2. Stok Benserazid Çözeltisi

Benserazid maddesinden 0,0249 g tartılarak bir miktar çözücüde çözüldükten sonra son hacim 250 mL'ye tamamlanmıştır.

3.3.1.3. UV/VIS Spektroskopisi Yöntemi

Bu çalışmada, spektrofotometrik ölçümlerle levodopa ve benserazid maddelerinin, önce tek tek sonra farklı oranlarda hazırlanan sentetik karışımların spektrumları alınmıştır. Son işlem olarak da ticari olarak alınan tablet numunede ölçümler yapılmıştır. Elde edilen veriler, farklı kemometrik yöntemlerle değerlendirilmiştir. İlk basamakta, UV spektrofotometre cihazının kalibrasyonu (sıfırlama işlemi) yapılmıştır. Kalibrasyon işlemi önce her iki hücre boş bırakılarak havaya karşı yapılmıştır. Sonra aynı işlem bu kez her iki ışık yoluna kullandığımız çözücümüz ile hazırlanan kör numunesi konularak yapılmıştır. Bütün okumalarda hep kör bu şekilde hazırlanmıştır. Kör seçimi yapılırken girişim etkilerini yok etmek için, kör olarak çözücü tercih edilmiştir. En son basamakta ise, ticari tablet (Madopar) incelenir. İlaç numunesi hazırlanırken, pakette bulunan tüm tabletler agat havanda ezilerek inceltir ve

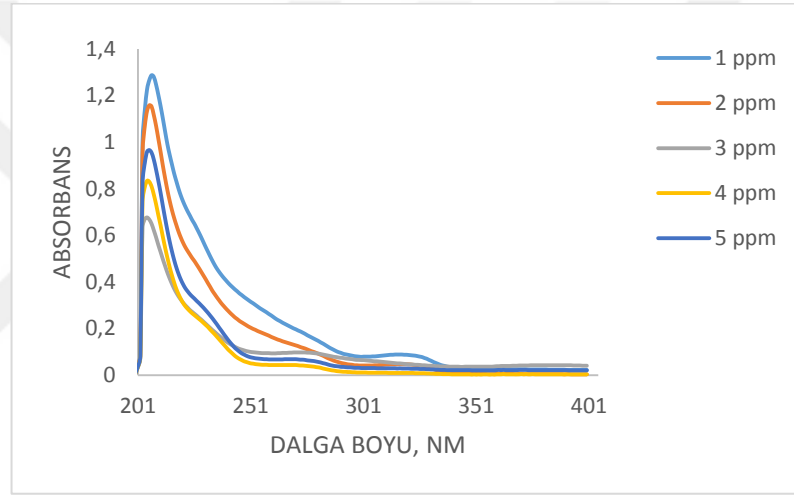
karıştırılır. Bir tablet ağırlığında tartım yapılarak, çözücüde çözülür, manyetik karıştırıcıda karıştırılarak homojen hale getirilir ve absorbands okuması yapılır.



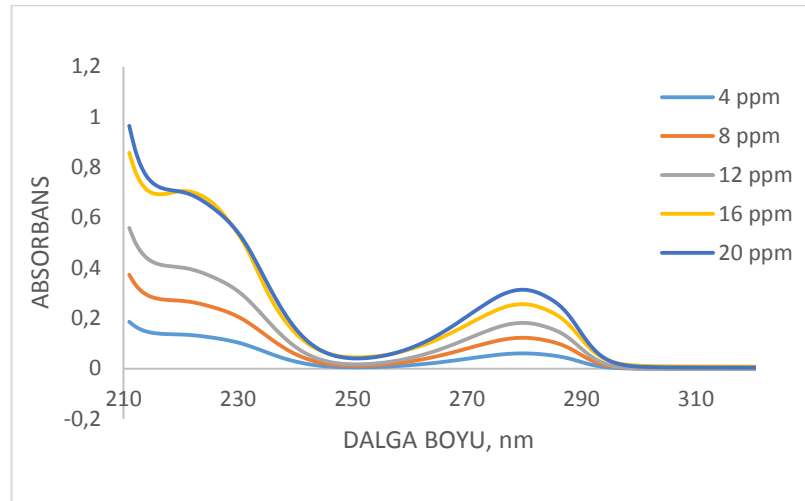
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. İlaç etken maddelerinden elde edilen spektrumlar

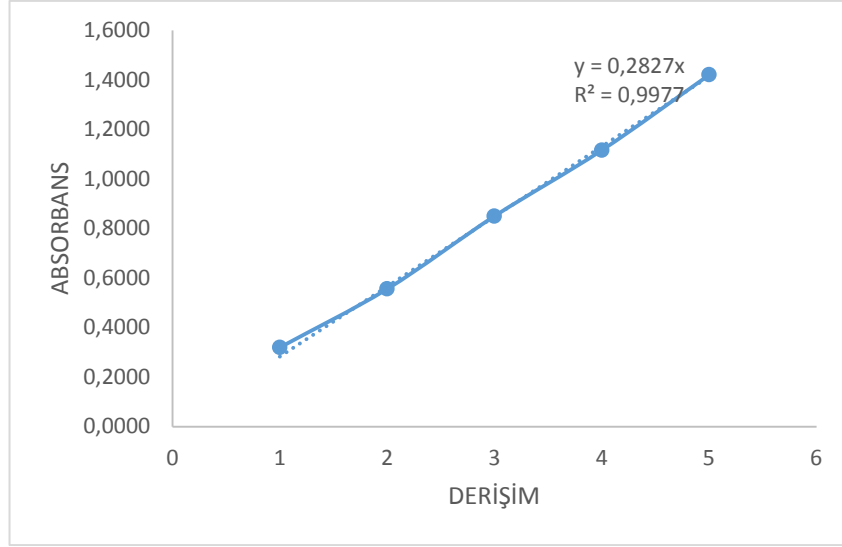
Her bir etken ilaç maddesinin 25 mg/250 mL olacak şekilde 0,1 M HCl'in çözücü olarak kullanılmasıyla 100 µg/mL (ppm)'lik çözeltileri hazırlanmıştır. İlaç etken maddelerinin, spektroskopik özelliklerini belirlemek için (levodopa için 4-20 µg/mL aralığında, benserazid için 1-20 µg/mL) aralığında hazırlanmıştır. Her maddenin absorbans-derişim arasındaki ilişki incelenmiştir (Benserazid:208 nm, Levodopa: 280 nm)(Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.).



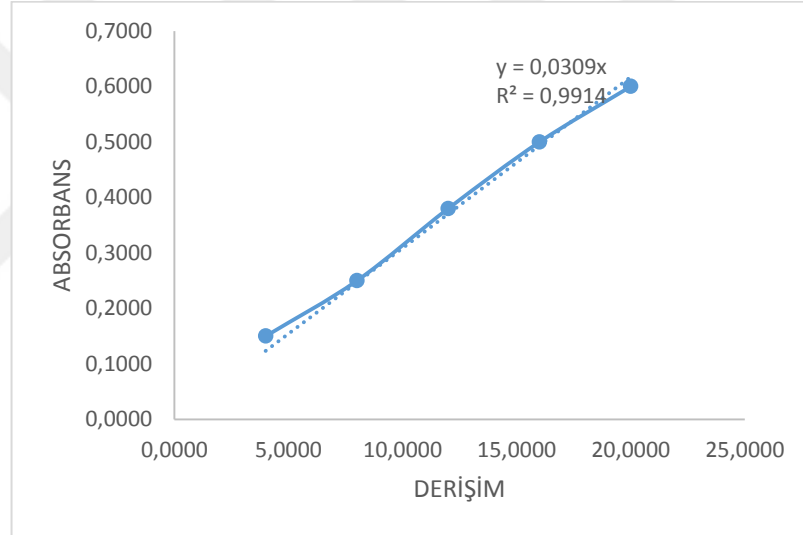
Şekil 4.1. Benserazid Etken Maddesinin Absorpsiyon Spektrumu



Şekil 4.2. Levodopa Etken Maddesinin Absorpsiyon Spektrumu



Şekil 4.3. Benserazid Maddesinin Absorbans-Derişim Grafiği



Şekil 4.4. Levodopa Maddesinin Absorbans-Derişim Grafiği

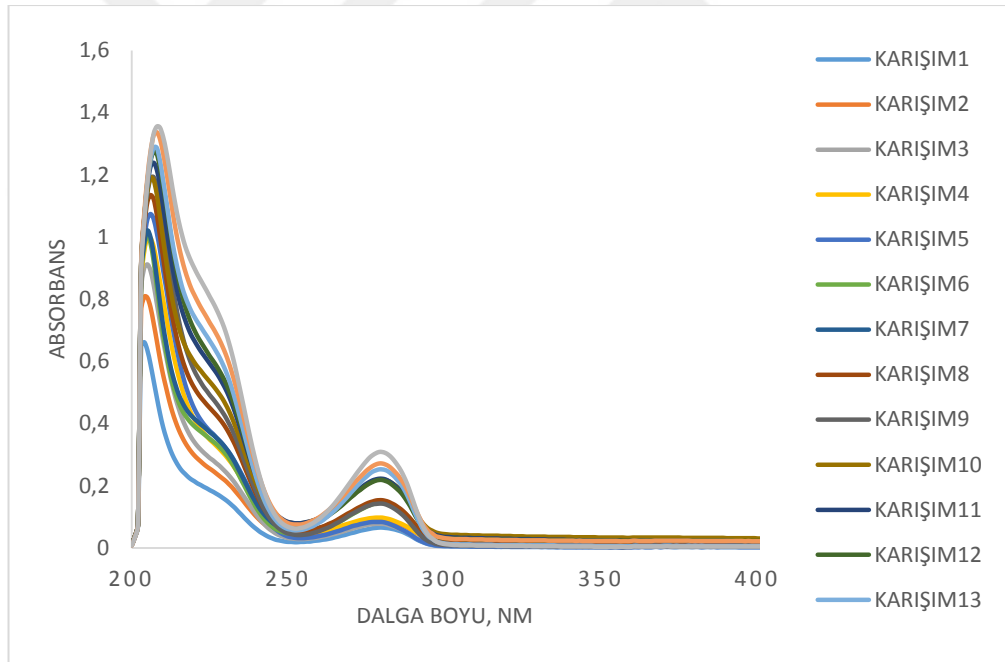
Benserazid ve levodopa için absorbans-derişim grafiklerinde, absorbans-derişim arasındaki doğrusal ilişki (Sharma, 2017) regresyon katsayısının (Miao, 2018) bire yakın olması ile doğrulanmıştır. Şekil 4.3. ve 4.4. de absorbans-derişim arasındaki ilişki görülmektedir.

4.2. Sentetik Karışımın Absorpsiyon Spektrumu

Benserazid ve levodopa dan 4-20 µg/mL aralığında (Çizelge 4.1.) 15 tane sentetik karışım çözeltisi hazırlanmıştır (Şekil 4.5.).

Çizelge 4.1. Levodopa ve Benserazid İçeren Kalibrasyon Seti

No	Levodopa µg/mL	Benserazid µg/mL
1	4	1
2	4	2
3	4	3
4	4	4
5	4	5
6	8	2
7	8	3
8	8	4
9	8	5
10	12	3
11	12	4
12	12	5
13	16	4
14	16	5
15	20	5



Şekil 4.5. Levodopa- Benserazid Karışım Çözeltilerinin Absorpsiyon Spektrumu

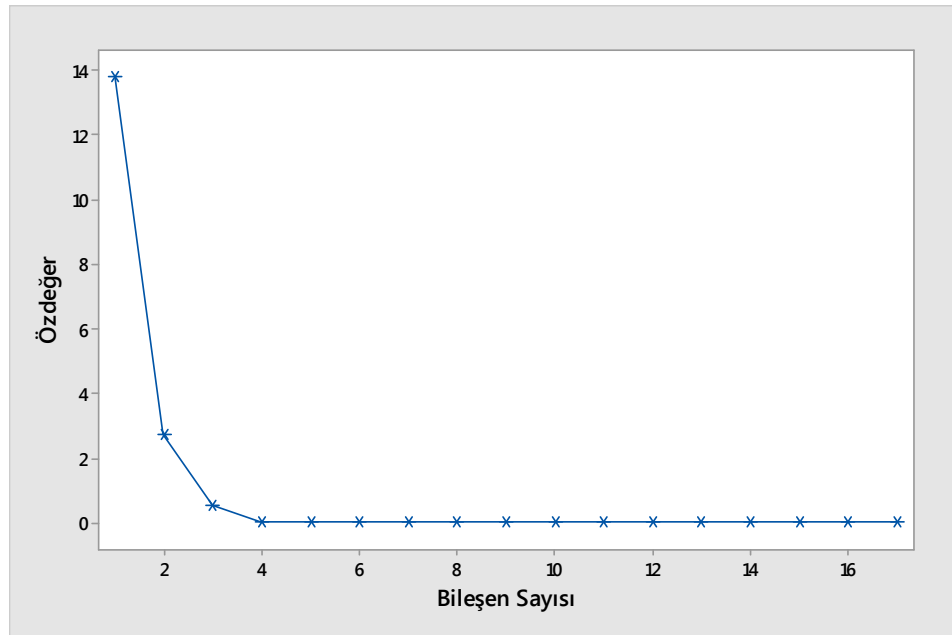
4.3. Kemometrik Hesaplamalar

Son dönemlerde çok bileşenli karışımlardaki her bir bileşenin miktarını tayin etmek için kullanılan en iyi ve gözde metotlardan biri olan kemometrik tekniklerden bu çalışmada kullanılan yöntemler, kısmi en küçük kareler

yöntemi (PLS) ve temel bileşen regresyonu (PCR)'dir (Dinç, 2002 ve Dinç, 2005). Absorbans ve derişim arasındaki bağıntıdan kurulan matris yardımıyla kemometrik model oluşturulur ve kemometrik hesaplamalar gerçekleştirilir (Aktaş, 2017). En yaygın olan kemometrik yöntem, kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) yöntemidir. PLS yönteminde kalibrasyonun kurulması için kullanılan PLS algoritmalarına göre, ortogonalize edilmiş PLS algoritması ve ortogonalize olmayan PLS algoritması kullanılır. Klasik metotlara göre elde edilen sonuçlar daha güvenilirdir.

Temel bileşen regresyon yöntemi adı verilen diğer bir kemometrik yöntem ise derişim seti için ölçülen absorbans verilerinin dekompozisyonu ile birbirine dik (ortogonal) doğrular elde edilmesi esasına dayanır. Bu elde edilen doğrular kurulacak kalibrasyonun koordinat sistemidir ve hesaplamalar bu esasa dayandırılır (Dinç, 2009).

Elde edilen verilerin miktarını hesaplanabilir bir boyuta getirmek için kemometrik hesaplamalara geçmeden ön basamak olarak temel bileşen analizi (PCA) işlemi (Saganowska, 2017).



Şekil 4.6. Kemometrik Verilerden Elde Edilen Özdeğerlerin Grafiği

Temel bileşen analizi uygulanmasının amaçları, bir orijinal değişkeni temsil eden n sayıda orijinal aksı (doğruyu) yeni akslar haline dönüştürmektir. Bu dönüşüm işleminde yeni akslar, verilerin maksimum varyans yönelimleri boyunca uzanır ve yeni aksların özelliği, ortogonal olmalarıdır ve bu yeni değişkenler arasında korelasyon yoktur. Numune verilerinin varyansının çoğunu açıklamak için ihtiyaç olan yeni değişkenlerin sayısı (p), n sayıdaki orijinal akslardan daha azdır. Temel bileşen analizi, çok değişkenli verilerin boyutunu indirmek veya verileri azaltmak için bir yöntem olarak kabul edilir. Aynı zamanda değişkenlerin doğrusal bileşenlerini ortaya çıkarır. Temel bileşen analizi ile elde edilen temel bileşenler yardımıyla oluşturulan korelasyon matrisi diğer kemometrik regresyonlara ışık tutmaktadır. Şekil 4.6. de belirgin bir şekilde görüldüğü gibi özdeğerler 2. değerden 3. değere doğru düşmüştür. İlk iki faktör, toplam varyansın % 99'undan daha fazla güvenilirdir.

Her bir kemometrik yöntem için hesaplanan geri kazanım ve bağıl standart sapma (BSS) değerleri çizelge 4.2. ve çizelge 4.3.de gösterilmiştir. Kesinlik ve doğruluk değerleri kontrol edilmiştir. İlave edilen derişimlere karşı bulunan derişimler hesaplanırken, cross-validasyon işlemi uygulanarak, ilaç numunesinde hatanın önüne geçilmiştir (Porfire, 2015 ve Tarhan, 2017).

Çizelge 4.2. Sentetik Olarak Hazırlanan Karışımındaki İlaç Maddelerinin PLS Kalibrasyonu İle Hesaplanan Sonuçlar

Karışım No	LEVODOPA			BENSERAZİT		
	İlave Edilen	Bulunan	% Geri Kazanım	İlave Edilen	Bulunan	% 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
4	4	3,94	98,50	4	3,59	89,75
5	4	3,65	91,25	5	4,67	93,4
6	8	7,98	99,75	2	1,94	97
7	8	8	100,0	3	3,06	102
8	8	8,05	100,63	4	3,97	99,25
9	8	7,89	98,63	5	4,88	97,6
10	12	11,97	99,75	3	2,97	99
11	12	11,85	98,75	4	3,96	99
12	12	12,04	100,33	5	4,97	99,4
13	16	15,96	99,75	4	3,94	98,5
14	16	15,97	99,81	5	4,96	99,2
15	20	19,98	99,90	5	5,01	100,2
			Ortalama=98,00 BSS=3,41			Ortalama=99,25 BSS=3,04

Çizelge 4.3. Sentetik Olarak Hazırlanan Karışımındaki İlaç Maddelerinin PCR Kalibrasyonu ile Hesaplanan Sonuçlar

Karışım No	LEVODOPA			BENSERAZİT		
	İlave Edilen	Bulunan	% Geri Kazanım	İlave Edilen	Bulunan	% Geri Kazanım
1	4	3,69	92,25	1	0,98	98,00
2	4	3,98	99,50	2	2,07	103,5
3	4	4,05	101,3	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	99,2
6	8	7,89	98,63	2	2,1	105,0
7	8	8,06	100,8	3	3	100,0
8	8	7,94	99,25	4	3,97	99,25
9	8	7,82	97,75	5	4,82	96,40
10	12	11,87	98,92	3	2,87	95,67
11	12	11,96	99,67	4	3,56	89,00
12	12	12,03	100,3	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	101,0
15	20	20,01	100,0	5	4,96	99,20
			Ortalama=98,80 BSS=2,25			Ortalama=98,03 BSS=3,97

4.4. Kemometrik Yöntemler İçin ANOVA Testi

PLS ve PCR kalibrasyon yöntemlerinin uygunluğunu doğrulamak amacıyla hesaplanan sonuçlara ANOVA testi (Bajpai, 2017) uygulanmıştır. PLS yönteminde levodopa için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=26 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,22 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,002 ve p-değeri 0,96; benserazid için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=26 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,23 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,04 ve p-değeri 0,85 olarak hesaplanmıştır. PCR yönteminde levodopa için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=26 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,22 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,00070 ve p-değeri 0,98; Benserazid için, gruplar arası serbestlik derecesi=1, grup içi serbestlik derecesi=26 % 95 güven aralığında F-tablo değeri 4,23 olmasına karşılık hesaplanan F-test değeri 0,05 ve p-değeri 0,82 olarak hesaplanmıştır.

4.5. Yöntem Validasyonu

İkili ilaç maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS ve PCR kalibrasyonlarının kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin toplamının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) minimal değerleri elde edilmiştir. PRESS (eşitlik 1.) değerinin sıfıra yakın olması doğruluk derecesini arttırmaktadır (Uyanık, 2012). Elde edilen PRESS değerleri yeterince küçüktür. Validasyondaki diğer parametreler kalibrasyonun standart hatası: SEC (eşitlik 2.) ve tahminin kareler ortalamasının karekökü: RMSEC (eşitlik 3.) olarak ifade edilmiştir (Bilgili, 2014).

$$PRESS = \sum_{i=1}^n (C_i^{İlaveEdilen} - C_i^{Bulunan})^2 \quad (1)$$

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (C_i^{IlaveEdilen} - C_i^{Bulunan})^2}{n-1}} \quad (2)$$

$$RMSEC = \sqrt{PRESS/n} \quad (3)$$

$C_i^{IlaveEdilen}$: Ortama ilave edilen gerçek derişim

$C_i^{Bulunan}$: Hesaplanan tahmini derişim

n: numune sayısı

Gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) parametreleri birbiriyle ilişkilidir ancak farklı tanımlara sahiptir (Shrivasta, 2015).

$$LOD = 3S/m \quad (4)$$

$$LOQ = 10S/m \quad (5)$$

Hesaplanan LOD değerleri için değerlendirme yapılırken $LOQ > LOD$ ve $LOQ = LOD$ dikkate alınmıştır (Armbruster, 2008).

Çizelge 4.4. Kemometrik Yöntemlerin Hesaplanan Validasyon Parametreleri

PARAMETRE	METOT	Levodopa	Benserazid
Korelasyon Katsayısı R^2	PLS	0,991	0,990
	PCR	0,999	0,987
SEC	PLS	0,035	0,028
	PCR	0,030	0,039
PRESS	PLS	0,026	0,021
	PCR	0,014	0,028
RMSEC	PLS	0,042	0,037
	PCR	0,031	0,043
LOD	PLS	0,220	0,341
	PCR	0,066	0,396
LOQ	PLS	0,733	1,137
	PCR	0,220	1,320

Çizelge 4.5. 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.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ultra-Viyole Spektroskopisindeki veriler kemometrik hesaplarda kullanılarak, ilaç maddesi içeren numunedeki ilaç aktif maddelerinin miktarları tayin edilmiştir.

Levodopa ve benserazid ilaç etken maddelerinin UV spektrumları alınarak, analiz çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Levodopa ve benserazid için, kemometrik yöntem kullanılarak, yöntem istatistiksel olarak desteklenmiştir. Bulunan değerler önce temel bileşen analizi (PCA) yapılarak verilerin miktarı hesaplanabilir hale getirilmiştir. Daha sonra kısmi en küçük kareler yöntemi (PLS) ve temel bileşen regresyonu yöntemi (PCR) kemometrik yöntemleri uygulanmıştır. Kullanılan PLS ve PCR yönteminin doğruluğunu test etmek için her iki yönteme de ANOVA testi uygulanmıştır.

Tabletlerden hazırlanan ilaç numunesine geçmeden önce yapılan deneysel tasarım esnasında hazırlanan sentetik modelde de sonuçlar kıyaslanmıştır. Sentetik modele ilave ettiğimiz madde miktarları ile kemometrik programdan elde ettiğimiz deneysel sonuçlar kıyaslanmıştır. Grup içi ve gruplar arası serbestlik dereceleri yardımıyla F testi yapılmıştır. F testi sonucuna göre kullandığımız modeli ilaç numunesi karışımına uygulayıp uygulayamayacağımıza karar verilmiştir. $F_H < F_T$ olduğunda model uygulanmıştır.

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. PLS ve PCR yöntemleri uygulanmış ve bulunan değerlerin doğruluğu F testi ile ölçülmüştür. Hesaplanan F değerlerinin, teorik değerlerden düşük olduğu görülmektedir. İkili ilaç maddesini içeren karışımlarda bu maddelerin miktar tayini için PLS ve PCR kalibrasyonlarının kurulmasında çapraz validasyon işleminde tahmin edilen hataların karelerinin

toplamlarının (Predicted Residual Error Some of Squares→ PRESS) ve kalibrasyonun standart hatası (SEC) değerlerinin sifira yakin olmasi doğruluğu ve guvenilirliği arttırmaktadır. Çizelge 4.4. incelendiğinde PRESS ve SEC değerlerinin yeterince küçük hatta sifira yakin değerler olduğu gözlenmiştir. LOD değerleri de LOQ değerlerine göre küçüktür.

Geliştirilen yöntemler, tekrarlanabilir, yüksek duyarlılık ve doğrulukta, hızlı sonuç veren yöntemler olup levodopa ve benserazid içeren farklı ilaç numunelerinin analizinde önerilebilir.



KAYNAKLAR

- A.H. Aktaş, A.M. Sarıdağ, "Liquid chromatografic-chemometric tecnhniques for the simultaneous HPLC determination of lansoprazole, amoksisilin and clarithromisin in commercial preparation", Journal of chromatografic science, pp. 1-7, 2017
- A. Porfire, D. Muntean, M. Achim, L. Vlase, I. Tomuta, "Simultaneous Quantification of Simvastatin and Excipients in Liposomes Using Near Spectroscopy and Chemometry", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, vol.107, pp. 40-49, 2015.
- A. Uyanık, " Analitik Kimyacılar İçin İstatistik ve Kemometri", Pegem Akademi Yayıncılık, 6. Baskı, pp. 254-259, 2012.
- A.V. Bilgili, M.A.Çullu, S. Aydemir, " Tuzdan etkilenmiş toprakların yakın kızılötesi yansıma spektrometre ve elektromanyetik indüksiyon tekniği yardımıyla karakterize edilebilme potansiyelinin araştırılması ", Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi, vol 18, no. 1, pp. 32-45, 2014.
- Bengi Uslu ve Sibel A. Özkan, Levodopa and Benserazide in Pharmaceuticals by Ratio-Spectra Derivative Spectrophotometry, Journal Analytical Letters, Volume 35, 2002 – Issue 2 pages 303 – 314
- C. Zapata -Urzua, M. Perez-Ortiz, M. Bravo, A.C. Oliveri, A. Alvarez-Lueje Simultaneous voltammetric determination of levodopa, carbidopa and benserazide in pharmaceuticals using multivariate calibration. Talanta volume 82, Issue 3, 15 August 2010, pages 962-968
- Coello J, Maspoch S, Villegas K, Simultaneous kinetic-spectrophotometric determination of levodopa and benserazide by bi- and three-way partial least squares calibration, Talanta 200 Aralık 4; 53 (3):627-37.
- D.A. Armbruster, T. Pty, " Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation ", Clin Biochem Rev, vol 29, pp. 49-52, 2008.
- D.A. Armbruster, T. Pty, " Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation ", Clin Biochem Rev, vol 29, pp. 49-52, 2008
- D. Sharma, R. Singh, R. Garg, "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, vol. 9(2), pp. 678-686, 2017.

- Demircigil, Barış Tolga 2010 İkili İlaç Etkin Madde KArışımlarının elektrokimyasal Olarak İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi 8S, Ankara.
- Demircigil, Barış Tolga 2010 İkili İlaç Etkin Madde KArışımlarının Elektrokimyasal Olarak İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Anabilim Dalı Doktora Tezi 2,3S, Ankara.
- E. Dinç, Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık fakültesi dergisi, 27(1), 61-92, 2007.
- E. Dinç, “Kemometrik İşlem ve Yöntemlerin Analitik Kimyadaki Tipik Uygulamaları”, Uygulamalı Kemometri Yaz Okulu Notları, pp. 13-17, 2009.
- E. Dinç, A. Özdemir, D. Baleanu, “Comparative study of the continuous wavelent transform, derivative and partial least squares methods applied to the overlapping spectra for the simultaneous quantitative resolution of ascorbic acid and asetilsalicylic acid in effervescent tablets, Journal of pharmaceutical abn biomedical analysis, vol.37, pp. 715-723, 2005.
- E. Dinç, D. Baleanu, “Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods” Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, vol.30, pp. 715-723, 2002.
- E. Dinç, S. Kaya T.Doganay D. Baleanu Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis Volume 44, Issue 4, 15 August 2007, Pages 991-995
- Eskidere, Ö., 2012. Ses Ölçümlerinden Parkinson Hastalığının Teşhisi İçin Öznitelik Seçme Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi, Sigma(30), 402-414.
- Gindy, Alaa El, Hadad, Ghada M. “Chemometrics in Pharmaceutical Analysis: An Introduction, Review, and Future Perspectives”. Journal of AOAC International Dergisi, Cilt 95, Sayı 3, Mayıs-Haziran 2012, sf. 609-623 (15)
- I.Tarhan, A.A.I.H Kara, “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, pp. 1-8, 2017.
- J. Miao, B. Forget, K. Smith, “Predicting Correlation Coefficients for Monte Carlo Eigenvalue Simulations With Multitype Branching Process”, Annals of Nuclear Energy, vol.112, pp. 307-321, 2018.

- J. Wang, Y. Zhou, J. Liang, P.G He, Y.Z Fang, Determination of Levodopa and Benserazide Hydrochloride in Pharmaceutical Formulations by CZE with Amperometric Detection, *Chromatographia* An International Journal for Separation Science March 2005, Volume 61, *Issue* 5-6, pp 265-270
- Köse İ. A., Öztemur B., Kayıp Veri Ele Alma Yöntemlerinin T-Testi ve ANOVA Parametreleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi, Abant İzzet Baysal Üniversitesi Eğitim Fakültesi Dergisi Yıl 2014, Cilt 14, Sayı 1, Sayfalar 400 - 412
- Krishna, V.R., Krishna, K.B.M., Babu, B.H., 2014. Development and validation of liquid chromatographic method for the simultaneous estimation of Levodopa, Carbidopa and Entacapone in the combined dosage form. *Journal of Pharmacy Research*, 8(3), 281-288.
- P. Saganowska, M. Wesolowski, "Principal Component and Cluster Analyses as Supporting Tools for Co-Crystals Detection", *J.Therm.Anal.Calorim.*, vol.130, pp. 45-55, 2017.
- Savaş, A., Akbostancı, C., Kanpolat, Y., 2008. Parkinson Hastalığının Cerrahi Tedavisi. *Türkiye Klinikleri J Neurosurg-Special Topics*, 1(2), 5-12.
- Şener, M., 2006. İçme Sularında Kalsiyum ve Magnezyumun Spektrofotometrik Metotla Simultane Tayini ve Yapay Sinir Ağları İle Kemometrik Analizi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49S, Isparta.
- Şener, M., 2006. İçme Sularında Kalsiyum ve Magnezyumun Spektrofotometrik Metotla Simultane Tayini ve Yapay Sinir Ağları İle Kemometrik Analizi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 49S, Isparta.
- Türe, S., İnci, İ., Gedizlioğlu, M.,Türe, M., 2007. Parkinson Hastalığında Dopaminerjik Tedavinin Kontrast Duyarlılık, Görsel Uyarılmış Potansiyeller ve Görme Alanı Üzerine Etkisi. *Türk Nöroloji Dergisi*, 13(2), 1.
- Tüzün, S., Çiftçili, S., Uzuner, A., 2010. Tremor II: Ayırıcı tanıda Parkinson. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 14(1), 26-31.
- Üstünes, L., (2009) RxMedia Pharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı
- V. Bajpai, S. Kumar, A. Singh, J. Singh, M.P.S. Negi, S.K. Bag, N. Kumar, R. Konwar, B. Kumar, " Chemometric based identification and validation of specific chemical markers for goeographical, seasonal and gender variations in *tinospora cordifolia* stem using HPLC-ESI-QTOF-MS Analysis", *Photochemical Analysis*, vol 28, no.4, pp. 277-288, 2017.

Xie, L., X., Wu, H., L., Fang, Y., Kang, C., Xiang, S., X., Zhu, L., Yin, X., L., Gu, H., W., Liu, Z., Yu, R., Q., 2015. Simultaneous determination of tyrosine and levodopa in human plasma using enzyme-induced excitation-emission-kinetic third-order calibration method. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 148, 9-19.

Yücesoy C. Simultaneous Determination of Levodopa and Benserazide Using Derivative Spectrophotometry, *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, Yıl 1994, Cilt 23, Sayı 1.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Tahir ÖZER
Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1993
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : ozertahir@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Mesleki Anadolu Lisesi, 2007,
Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Yayınlar

Güzide Pekcan Ertokuş, Tahir Özer, Çoklu Lineer Regresyon Yönteminin Levodopa ve Benserazid İçeren Tabletlerle Uygulanması, ECSAC 2019 NİSAN.