

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р **АЛБЕНА ДЕЧЕВА-ЧАКЪРОВА** (ИОНХ-БАН), член на научното жури
относно дисертационния труд на докторанта на самостоятелна подготовка към катедра
Аналитична химия, Факултет по химия и фармация - СУ „Св. Климент Охридски”

ГЕОРГИ ХРИСТОВ ГЕРГОВ

на тема: **„Приложимост на спектрални методи за калибриране на
многокомпонентни лекарствени смеси”**

представен за придобиване на образователната и научна степен „доктор”
по професионално направление 4.2 „Химически науки” (Аналитична химия)
с научен ръководител проф. дхн **ВАСИЛ ДРАГОМИРОВ СИМЕОНОВ**

Георги Христов Гергов завършва с отличие и златен медал ЕСПУ „Хр.Ботев” в град Ихтиман. Приет е без конкурсен изпит след успешно представяне на олимпиада в Химическия факултет на СУ „Св. Климент Охридски” и завършва висшето си образование през 1987 г. с отличен успех. След завършването си работи последователно в Централната лаборатория по микросинтез и анализ, и в Лабораторията по биокатализ към Институт по органична химия, БАН. От 1991 до 1995 г. е асистент в катедра „Органична химия”, Лаборатория по фотохимия на Химически факултет на СУ „Климент Охридски”, където води лабораторни занятия към задължителния курс по Органична химия на студенти от специалностите Биотехнология и Молекулярна биология. Известно време работи във фирмите „Агромедика” (официален вносител на лекарствата на „Bayer”) и в АКВАХИМ (тогава официален представител на MERCK за България). От 1996 г. до настоящия момент заема длъжностите асистент и главен асистент в катедра Химия, секция Аналитична химия на Фармацевтичния факултет към Медицинския Университет, София, където води лабораторни занятия към задължителния курс по Аналитична химия на студентите по фармация. Научен консултант е на три дипломни работи за придобиване на образователно-квалификационната степен Магистър. Владее свободно английски и руски език, ползва френски.

Научните интереси на кандидата са в областта на методите на производната спектроскопия, графични методи за обработка на сигнали и съвременни хемометрични методи за калибриране на спектрални данни. От 2014 г. гл. ас. **Георги Христов Гергов** е зачислен на докторантура на самостоятелна подготовка по професионално направление 4.2 „Химически науки” (Аналитична химия) към катедра Аналитична химия, Факултет по химия и фармация - СУ „Св. Климент Охридски” с научен ръководител проф. дхн **Васил Симеонов** (заповед за зачисляване на докторантура на самостоятелна подготовка № РД 20-1790/27.10.2014 г.) Докторантът е положил и успешно издържал с отлични оценки необходимите изпити по своята програма. Отчислен е предсрочно с право на защита, поради завършен дисертационен труд, считано от 03.07.2017 г. (заповед № РД 20-956/07.07.2017 г.)

Необходимостта от бързи, точни и евтини методи за анализ във фармацевтичното производство налагат все по-честото използване на UV-Vis спектрофотометрията за количествено изследване на различни лекарствени продукти, състоящи се от няколко компонента. Безспорните предимства на UV-Vis-методите в сравнение с утвърдените хроматографски техники ги правят поле на интензивни теоретични проучвания, както по отношение на използваните математически алгоритми, така и по отношение на внедряването им като достъпен софтуер за анализ. От друга страна, неселективността на молекулната спектроскопия е основен проблем, решим само чрез прилагане на нови методи за калибриране на базата на хемометрията. Това доведе до разкриване на нови възможности при анализа на многокомпонентни смеси с наличие на спектрално припокриване, при които конвенционалните методи за калибриране са неприложими. Ето защо многомерното калибриране е поле на активна изследователска дейност за химиците-аналитици през последните години.

Настоящият дисертационен труд е фокусиран върху възможностите на съвременните методи за калибриране, базирани на хемометрията, приложени към UV-спектрални данни от анализа на фармацевтични продукти. Тези методи са групирани най-общо в четири различни типа алгоритми за анализ на многокомпонентни лекарствени смеси. Това са (1) графичните алгоритми, (2) PLS (Partial least squares) статистическите алгоритми, (3) NAS

(Net analyte signal) базираните алгоритми и (4) MCR ALS (Multivariate curve resolution alternative least squares) оптимизационния алгоритъм с различни по вид ограничения.

Дисертационния труд на **Георги Гергов** е написан на 117 страници, в които са включени 38 фигури, 18 таблици и 127 цитирани литературни източници. Направеното библиографско проучване от дисертанта показва ефикасността и перспективността на математичната обработка на аналитичния сигнал при многокомпонентни системи чрез използване на графични и математични методи. Трансформирането на сигнала при графичните методи позволява свеждането на многокомпонентна до еднокомпонентна система и преодолява неселективността на спектралния метод. Многомерните техники позволяват използването на цялата спектрална информация при анализа.

Основна цел на дисертационния труд е да се конструират оптимални експериментални планове и подходящи методи за калибриране, осигуряващи бързина и точност на анализа на базата на критична оценка на предложените в литературата методи за UV-спектрален анализ на многокомпонентни лекарствени смеси, както и да се оцени приложимостта им при конкретно избрани лекарствени смеси.

За постигане на поставената цел следва да се решат следните конкретни **задачи**:

- Да се приложат графични едномерни подходи за количествено определяне на пилокарпин в офталмологична суспензия.
- Да се приложат графични едномерни подходи за анализ на двукомпонентна система, съдържаща доксиламин и пиридоксин;
- Да се приложат многомерни подходи за анализ на двукомпонентна система , съдържаща доксиламин и пиридоксин;
- Да бъде направена съпоставка между графичните и хеометричните модели за двукомпонентната система и да се дадат препоръки за случаите, в които е уместно да се използва всеки от методите;
- Да се приложат многомерни методи за калибриране PLS за анализ на трикомпонентна система, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин. Да се сравнят най-използваните алгоритми NIPALS, SIMPLS, Kernel и Bidiagonalization и да се избере оптималният;

- Да се приложат NAS базирани многомерни методи за калибриране за анализ на трикомпонентна система, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин;
- Да бъде направена съпоставка между NAS базираните и PLS методи за калибриране за трикомпонентната система и да се дадат препоръки за случаите, в които е уместно да се използва всеки от методите.

В глава първа, озаглавена „Обща характеристика на дисертационния труд” е показано, че проблемът за разработване на надеждни алгоритми с цел установяване на състава на сложни лекарствени продукти, остава открит. Ето защо обединяването на спектралните методи (UV-Vis, NIR, RAMAN) и хеометричните методи за калибриране е много перспективно направление със сериозно приложение в модерния фармацевтичния анализ, неразработено у нас.

В глава втора, озаглавена „Необходимост от хеометрична обработка на аналитичните данни. Структура на данните. Избор на метод за калибриране” е показана съвременната класификацията на спектралните данни, базирана на методологията на линейната алгебра, както и връзката им с методите за калибриране. Дефинирани са и видовете аналитични системи, като е указано за кои от тях какъв метод за калибриране би бил подходящия избор.

В глава трета, озаглавена „Молекулна спектроскопия, възможности на метода за изследване на многокомпонентни системи” са сравнени възможностите на конвенционалните спектрофотометри и спектрофотометрите с диодна матрица (diode array) за прилагане на предложените методи за обработка на сигнали. В следващата глава е показано какъв спектрофотометър е подходящ за даден графичен метод.

В глава четвърта, озаглавена „Графични методи за калибриране на многокомпонентни смеси” е направен е обстоен преглед и анализ на някои от известните подходи и методи за анализ на двукомпонентни, трикомпонентни и многокомпонентни лекарствени смеси. Дисертантът познава много добре теоретичния математичен инструментариум на тези подходи, приложими за анализ на многокомпонентни смеси. Отбелязани са техните недостатъци, тъй като процедурите при свеждане на многокомпонентни смеси до еднокомпонентни използват делене, центриране, изваждане и диференциране на спектри. Като краен резултат са свързани с получаването на константа в подходящ спектрален

регион и нейното елиминиране, което се явява критичен момент при тяхното използване. Също така е установено неприложимост на методите при анализ на смеси с различни концентрационни съотношения. Калибрирането със стандартни разтвори при една дължина на вълната се явява елегантна математическа процедура, но често коректността на този метод може да се постави под съмнение. След като е констатирал незадоволителното състояние при използването на графичните подходи дисертантът е стигнал до извода за нуждата от създаването на адекватни робастни (устойчиви) многовариационни методи за калибриране.

В глава пета, озаглавена „Експериментални планове”, която е в тясна връзка с глава 6, озаглавена „Многовариационни статистически методи за калибриране на многокомпонентни смеси” са предложени многовариационните статистически алгоритми като конкурентна алтернатива на предложените графични техники. Тук е подчертана съществената роля на експерименталните планове при избора на калибрационни смеси, което води до подобряване на аналитичните характеристики на калибрационния модел. Трябва да се отбележи, че в литературата тяхното използване е чисто емпирично, като не е търсена връзката между вида на използваната система, броя на компонентите и степента на спектрално припокриване при избора на плана. Ето защо в дисертационния труд е направен опит за намирането на адекватни планове при изследваните дву-и трикомпонентна системи. Най-подходящи се оказват централните композиционни планове, както и плановете на Бреретон. Също така беше установено, че приложимостта на използваните многовариационни статистически техники е в пряка зависимост от вида на избрания план. Направен е опит да се предложи алгоритъм за използване на подходящ статистически подход при анализ на специфичен набор от спектрални данни.

В следващата глава, озаглавена „Методи за калибриране, базирани на нетния аналитичен сигнал за анализ на многокомпонентни смеси”, се явява естествено продължение на многовариационните статистически алгоритми, като в нея многомерните модели се свеждат до едномерни с помощта на нетния аналитичен сигнал. Хибридният линеен анализ е интересна техника, която съчетава предимствата на класическия CLS (Classical least squares) подхода при който е известен състава на сместа с инверсия PLS подход. Препроцесингът с помощта на нетния аналитичен сигнал, водещ до техниката NAP (Net analytical preprocessing) CLS, както и двете модификации на хибридният линеен

анализ са методи за калибриране, използвани в дисертационния труд, чиито резултати са сравними с техниката PLS. За разлика от формалните PLS подходи, при NAS базираните подходи, намирането на нетния вектор на чувствителността, както и неговата норма позволяват многомерното калибриране да се представи по класическия едномерен начин. Освен това всички аналитични характеристики като селективност, чувствителност, граница на откриване и определяне могат да бъдат изведени с помощта на вектора на чувствителността. Това прави тези методи за калибриране много нагледни и улесняват аналитиците в интерпретацията на резултатите от анализа.

В главата, озаглавена „Оптимизационни методи за калибриране, базирани на подхода за разделяне на спектрални криви (MCR ALS)”, е представен съвременен подход за анализа на сиви аналитични системи, при които PLS обикновено няма възможност да оцени броя на компонентите на анализираната смес. Така нареченото предимство от втори ред (second order advantages) позволява с този метод, калибрирането на една смес да бъде проведено в присъствие на новопоявили се некалибрирани компоненти, в резултат на химични трансформации, като хидролиза, окисление или други процеси. Още повече, че наличието на помощни вещества в анализираните лекарствени смеси, често затруднява използването на многовариационните статистически подходи. В дисертацията е използвано именно това предимство при анализа на таблетни лекарствени форми. Също така е установено, че приложимостта на използваната оптимизационна билинейна техника (MCR ALS) е в пряка зависимост от вида на избрания план.

Експериментална част – Заснемането на UV-спектрите са извършени с помощта на съвременни UV-Vis спектрофотометри на различни производители - Hewlet Packard HP8452A и Thermo Fisher Scientific, модел Evolution 300. За получаване на данните е използван софтуерът VISIONpro (версия 4.4.1). Спектрите на лекарствата са записани в диапазона от 190-300 nm и дигитализираните стойности на абсорбцията са експортирани в MatLab® за по-следващ анализ. Използван е MatLab® 2013a (The Mathworks, Natick, MA, САЩ). PLS-вариантите (NIPALS, SIMPLS, Kernel и Bidiagonalization) се провеждат с използване на MatLab® кодове, базирани на алгоритмите, описани в предишната секция. Кодовете MatLab® са достъпни при поискване от авторите. Независимо от това, математическите изчисления са извършени с помощта на програми MVC1® и TOMCAT®,

които са свободно достъпни. Процедурата за крос валидирането е извършена чрез функцията от TOMCAT®, която е модифицирана, за да бъде приложима за алгоритми SIMPLS, Kernel и Bidiagonalization.

Известно е че ефективността на многовариационните методи за калибриране би била значително подобрена, ако калибрирането се извършва само в определени спектрални обхвати, вместо да се използва целия спектър. За избора на подходяща спектрална област дисертантът е използвал методът на De Luca и стратегията на движещия се „спектрален прозорец”.

Резултати и дискусия – резултатите от методите за калибриране с нетния аналитичен сигнал и с MCR ALS са подобрени в сравнение с класическия PLS-метод при изследване на дву- и трикомпонентни таблетки респективно. Аналитичните добиви са значително подобрени след намиране на подходящата спектрална област

Изследванията, проведени в дисертационния труд, са изключително актуални и представляват както научен, така и приложен интерес. Докторанът е формулирал основните приноси в настоящата дисертация както следва:

1. Разработен е нов спектрофотометричен производен метод за анализ на пилокарпин в лекарствена смес в присъствие на носител – ацетофталаг на целулозата с помощта на методи на производната спектроскопия.

2. Разработен е нов спектрофотометричен метод за анализ на двукомпонентна лекарствена форма, съдържаща доксиламин и пиридоксин с помощта на три методи за калибриране - многовариационни статистически, оптимизационни и графични методи за калибриране.

3. Сравнени са четири PLS алгоритми (NIPALS, SIMPLS, Kernel, Bidiagonalization) за анализ на трикомпонентна лекарствена форма, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин. Установено е, че PLS Kernel е оптималния алгоритъм за моделиране на смеси със силно спектрално припокриване.

4. Сравнени са методи за калибриране, базирани на нетния аналитичен сигнал с PLS алгоритъм за анализ на трикомпонентна лекарствена форма, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин. Установено е, че NAS алгоритмите имат приблизително сходна предсказваща способност с PLS NIPALS алгоритъма.

5. За целите на дисертацията е разработен нов програмен продукт, реализиращ алгоритъм PLS2 за бърз скрининг на неизвестна многокомпонентна смес, тестван относно надеждност и ефективност с друг PLS2 алгоритъм.

6. Предложена е блок-схема за едновременното използване на три метода за калибриране – PLS2, PLS1 и MCR ALS. Общото време за подготовката на данните и изчисленията е в рамките на 30 минути.

7. Реализирани са програмни кодове за графичните методи за обработка на спектралното отношение и на производната спектроскопия и са приложени за анализ на двукомпонентна лекарствена форма, съдържаща доксиламин и пиридоксин.

Части от дисертационния труд са докладвани на 2 научни форума в страната. Върху дисертацията са написани общо 5 научни труда. Единият от тях е публикуван в българското списание *Pharmacia*. Три от публикациите са в *Bulgarian Chemical Communications* (IF₂₀₁₆=0.229), като две са излезли от печат, а третата – изпратена за печат, за която се чака информация. Последният научен труд е изпратен за печат в реномираното международно списание *Acta Pharmaceutica* (IF₂₀₁₆=1.288). Съдържанието на публикациите и автореферата съответства на основните положения и приноси на дисертационния труд.

Бих искала да подчертая, че като проблематика тази дисертация е в определена степен новаторска за България в областта на фармацевтичния анализ на лекарствени смеси. Използваните многовариационни статистически подходи като PLS не се прилагат на принципа на „черна кутия”, а са проучени детайлно и са сравнени най-прилаганите алгоритми – NIPALS, SIMPLS, Kernel и Bidiagonalization. Показано е, че оптималният алгоритъм е Kernel и получените в дисертационния труд резултати убедително сочат неговите предимства. Включени са допълнително и NAS базирани алгоритми. Ето защо прилагането им директно в заводските лаборатории би допринесло значително за оптимизирането на спектралните изследвания.

Всички разгледани в дисертацията алгоритми са реализирани в програмната среда на MatLab®, като изпълнимите им кодове се явяват като принос към дисертацията. За PLS2 е написан напълно нов код, който се явява лесно и удобно средство за бърз анализ. С негова

помощ се реализира блок схема за използването на всички алгоритми, последователно, което води до общо време на анализа около 30 минути.

В този смисъл, разработването на нови методи, модификация на известни методи и алгоритми и реализиращите ги програмни модули с помощта на MatLab®, считам за ценен принос на дисертационния труд. Считам също, че темата на дисертацията е не само извънредно актуална, но и изключително полезна в научно-приложно отношение. Заменянето на част от методиките във Фармакопеята със спектрални методи е вече факт. И тъй като все още не може да се твърди, че досегашните научни разработки са решили проблема в достатъчна дълбочина, изчерпателност и адекватност, докладваните в дисертационния труд резултати предоставят отворен хоризонт за бъдещи изследвания с модерни NIR и RAMAN спектрофотометри.

Приносите на дисертационния труд могат да се охарактеризират като „Новост за науката” и „Обогатяване на съществуващите знания”.

Гл. ас. **Георги Христов Гергов** е химик с дългогодишен опит и сериозни и задълбочени познания в областта, което ясно личи в дисертационния му труд. Бих искала само да препоръчам на дисертантът да оформи всички останали резултати от досегашната си работа като публикации и да продължи интересните си изследвания.

В заключение считам, че дисертационният труд изпълнява изискванията на Закона за развитие на академичния състав в Република България и Правилника за приложение на закона във Факултета по химия и фармация – СУ „Св. Климент Охридски”. Всичко това ми дава основание да подкрепя най-убедено присъждането на образователната и научна степен “доктор” по научна специалност 4.2 „Химически науки” (Аналитична химия) на **Георги Христов Гергов**.

16.08.2017 г.

Подпис:

Доц. д-р Албена Дечева-Чакърва