

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ  
ОХРИДСКИ“**

**Факултет по Химия и Фармация**

---

**Георги Христов Гергов**

**ПРИЛОЖИМОСТ НА СПЕКТРАЛНИ МЕТОДИ ЗА  
КАЛИБРИРАНЕ НА МНОГОКОМПОНЕНТНИ  
ЛЕКАРСТВЕНИ СМЕСИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за присъждане научна и образователна степен “Доктор”**

**Научен консултант:  
проф. дхн Васил Симеонов**

---

София, 2017

**СОФИЙСКИ УНИВЕРСИТЕТ „СВ. КЛИМЕНТ  
ОХРИДСКИ“**

**Факултет по Химия и Фармация**

---

**Георги Христов Гергов**

**ПРИЛОЖИМОСТ НА СПЕКТРАЛНИ МЕТОДИ ЗА  
КАЛИБРИРАНЕ НА МНОГОКОМПОНЕНТНИ  
ЛЕКАРСТВЕНИ СМЕСИ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

на дисертация за присъждане научна и образователна степен “Доктор”

**Научен консултант:**

проф. д.х.н. Васил Симеонов

**Рецензенти:**

проф. д-р Стефан Цаковски

доц. д-р Албена Дечева-Чакърва

**Научно жури:**

проф. д-р Стефан Цаковски

проф. д.х.н. Васил Симеонов

проф. д.х.н. Соня Ганева

проф. д-р Драгомир Янков

доц. д-р Албена Дечева-Чакърва

---

София, 2017

Дисертацията съдържа 117 страници, в които са включени 38 фигури, 18 таблици и 127 цитирани литературни източници.

Дисертационният труд е обсъден и насрочен за защита от Катедрения съвет на Катедра аналитична химия към Факултета по Химия и Фармация на Софийски университет „Св. Климент Охридски“ проведен на 03.07.2017 г.

Докторантът е зачислен на самостоятелна подготовка към Катедра аналитична химия към Факултета по Химия и Фармация на Софийски университет „св. Климент Охридски“ .

Защитата на дисертационния труд ще се състои на \_\_.\_\_.2017 г. от \_\_ часа в зала \_\_ на Факултета по Химия и Фармация на Софийски университет „св. Климент Охридски“.

**Използвани съкращения:****Графични методи за калибриране**

ZC (zero-crossing method) -метод на пресичане на нулевата линия

DR (derivative ratio method) - метод на производна на спектралното отношение

MCR (mean centering ratio method) - метод на центриране на спектралното отношение

RSM (ratio subtraction method)-метод базиран на изваждане на амплитудата на спектралното отношение

ERSM (extended ratio subtraction method) - разширен метод базиран на изваждане на амплитудата на спектралното отношение

**Многовариационни статистически методи за калибриране**

CLS (Classical least squares) – директен метод на най-малките квадрати

ILS (Inverse least squares) – инверсен метод на най-малките квадрати

PCA (Principal component analysis) – principal component analysis – анализ на главни компоненти

PCR (Principal component regression) – регресионен анализ по главни компоненти

PLS (Partial least squares) – регресионен анализ по частични най-малки квадрати

PRM (partial robust M regression) – робастен регресионен анализ по частични най-малки квадрати с медиана

CV (Cross validation) - кръстосано валидиране

**Методи за калибриране базирани на нетния аналитичен сигнал**

NAS (Net analyt signal) - нет аналитичен сигнал

NAP (Net analytical preprocessing) - корекция с нет аналитичен сигнал

NAP CLS (Net analytical preprocessing)

HLA XS (Hybrid linear analysis)

HLA XS (Hybrid linear analysis Xu & Schechter)

HLA GO (Hybrid linear analysis Goicoechea & Olivieri)

**Оптимизационни методи за калибриране, базирани на многовариационния подход за разделяне на спектрални криви**

SVD (Singular value decomposition) – разлагане по собствени стойности

MCR-ALS (Multivariate curve resolution alternative lest squares) – многовариационно разделяне на криви с последваща алтернативна регресия на най-малките квадрати

SIMPILSMA (Simple-to-use - Interactive Self-Modelling Mixture) - интерактивно моделиране на смеси

EFA (Evolving Factor Analysis) - факторен анализ

ALS (Alternative lest squares) - алтернативна регресия на най-малките квадрати

## I. Увод

Монотерапията в медицината е отдавна отстъпила място на терапията с многокомпонентните лекарствени смеси. Класическите методи за анализ и контрол на качеството на такива смеси са хроматографските, които са точни и надеждни, но изискват специални лабораторни условия, скъпи са като начална инвестиция и подържане на оборудването, химически реактиви, квалифициран персонал и др. Продължителността на тези анализи, трудоемкостта им и разрушаването на анализиранияте проби ги прави неефективни за on-line контрол. Ето защо съществува необходимост от разработването на бързи, обективни и недеструктивни методи за оценка на качеството на лекарствения продукт от момента на смесването до крайните етапи на производство и разпространението му в търговската мрежа. Например, дифузно-отражателната NIR спектроскопия дава такава възможност за едновременно определяне на няколко компонента в анализиранията проба, позволява минитюаризация на измерителната техника и приложение on-line и е илюстрация на добра алтернатива на класическите хроматографски методи за анализ. Друго предимство е, че бързият at-line (на място) контрол във фармацевтичното производство ще позволи при установяване на отклонения от предварително дефинирания състав да се предприемат необходимите навременни мерки и корективни действия, с които да гарантират производството на фармацевтични продукти, отговарящи на европейските и български стандарти.

Спектралният анализ на разтвори и конкретно UV-Vis спектрофотометрията също намира широко приложение за количествено изследване на различни лекарствени продукти, състоящи се от няколко компонента. Основните предимства на метода са точност, бързина (времето за извършване на анализа е до минути), липса или минимална предварителна химична обработка на пробите и ниската себестойност на анализа. Особеността при обработката на генерираните UV-спектрални данни, е че при измерванията се акумулират голямо количество многомерни данни, които включват голям брой дължини на вълните (от десетки до няколко стотин данни за една проба). Броят на дължините на вълните значително надвишава броя на пробите за анализ, което както и спектралното припокриване води да наличието на мултиколинеарност. Ето защо директното извличането на съществена информация за състава на пробата от „суровите“ данни, често е затруднено, поради което е необходима допълнителна експертна обработка с методите на обработка на сигнали и използването на статистически и/или оптимизационни алгоритми.

Първите подходи, разгледани в дисертационния труд, са придобили популярност през последните години. Това са графични методи, свързани с обработка на т.нар. “спектрално отношение”. Главната причина за широкото им приложение е сравнителната простота за тяхното изпълнение. Тези методи за калибриране са реализирани дори с помощта на математическите операции, вградени в софтуера на спектралните апарати, или с помощта на сравнително прости програмни кодове. До голяма степен след 2006 година, те изместиха методите с производна спектроскопия поради безспорните си предимства. По-същество идеята на изброените графични

методи е да се сведе многокомпонентната смес до еднокомпонентна чрез елиминиране на пречещите компоненти. Когато в една многокомпонентна смес спектъра на търсения компонент се раздели на спектъра на сумата от останалите (пречещи) компоненти, наречена "делител" се генерира спектрално отношение, чиято амплитуда е многократно увеличена в сравнение със спектъра на търсения компонент (увеличение на чувствителността на анализа). Последващото манипулиране на това отношение става с помощта на два основни предпочетени метода за трансформация на сигнал: "центриране" или "изваждане" което води до елиминирането на пречещия компонент. Разбира се, диференцирането на спектралното отношение с цел отстраняване на пречещия компонент също се прилага, но не е за предпочитане, тъй като чувствителността на анализа неизбежно се влошава поради увеличаване на съотношението сигнал шум . Ето защо в дисертационния труд основно ще бъдат разгледани методите на манипулиране на спектралното отношение, с помощта на изваждане и центриране. Недостатъците на тези методи е, че са едномерни методи, като калибрирането е само при една дължина на вълната, което води до загуба на точност и неизползване на пълния набор от спектрална информация за сложната система.

По-голяма универсалност при многокомпонентния анализ на лекарствени смеси имат многовариационните статистически методи за калибриране, тъй като при тях се използва цялата спектрална информация за системата. Разработването на модели, базирани на тези статистически методи, дава много по-надеждни резултати в сравнение с графичните методи, като не налага ограничения за състава на сместа и позволява анализ на сложни многокомпонентни системи с висока степен на спектрално припокриване и мултиколинearност. Още повече наличието на подходящи MATLAB toolbox-ове и конкретни функции, позволява решаването на спектралните задачи, без да са необходими специални умения за програмиране. Тенденцията в модерния фармацевтичен анализ е постепенно тези хемометрични техники , комбинирани с UV-Vis и особено NIR спектроскопия да заменят класическите фармакопейни методи за анализ. Безспорен фаворит и най-често използван е билинейният подход PLS. Неговата надеждност е значително по-голяма в сравнение с другите използвани подходи – CLS, ILS, PCR, тъй като изследва едновременно абсорбционната и концентрационната матрици. PLS NIPALS алгоритъмът е в основата на повечето използвани toolbox-ове (MVC1, TOMCAT, UNSCRAMBLER). Той е използван като основна методология за анализ на многокомпонентните системи. Известно е, че освен NIPALS съществуват още редица алгоритми като SIMPLIS, KERNEL, Bidiagonalization, вградени в различни toolbox-ове. Тяхната приложимост все още не е достатъчно проучена във фармацевтичния анализ, поради което в дисертационния труд бе направено сравнение на тези алгоритми при анализ на сложна трикомпонентна система (САРИДОН). Резултатите показваха, че най-удачно е прилагането на KERNEL алгоритъма.

Сравнени бяха класическите линейни методи за калибриране PLS1 и PLS2 методи с робастния метод PRM при двукомпонентна система. Неговите безпорни предимства са, че не е нужно отстраняването на оутлайери, което го прави особено надежден подход за калибриране.

От голямо значение за прилагането на многовариационните статистически методи за калибриране е вида на използваните експерименталните планове. Подходът в

литературата е предимно емпиричен, без да се подчертава значението на експерименталния план или спектралното подобие като важни фактори за качеството на предсказване на използваните модели. Ето защо проучихме възможностите за избор на конкретен план при изследваните системи в зависимост от броя на компонентите и степента на спектрално припокриване.

Необходимо е да се отбележи, че успешното използване на PLS подхода зависи до голяма степен от това дали съставът на изследваната лекарствена смес е напълно известен. Когато това е спазено, методът дава много добри резултати. Във фармацевтичната практика, където при анализ на таблетки съставът на ексициентите често е неизвестен, както и при наличието на неизвестни разпадни продукти, PLS не може да ги прогнозира. При подобни случаи използването на оптимизационната техника MCR ALS е за предпочитане. Това също е билинейна техника, при която се извършва факторизация на изходната спектрална матрица с последващи итерации до намиране на приближеното решение. Особено важен е изборът на начални приближения за намиране на коректни решения, поради т.нар. неопределеност на факторизацията.

Най-важното предимство на този подход в сравнение с PLS се обозначава с термина ‘‘second order advantages’’. Това означава че при използването на MCR ALS калибрирането е възможно само с търсените компоненти на сместа, без да е необходима информация за пълния и състав. Беше направен сравнителен анализ на двете хеометрични техники при изследваните системи. Анализът на таблетките и капсулите показва убедително предимствата на MCR ALS в сравнение с PLS.

В дисертационния труд са приложени и следните методи за калибриране NAP CLS, HLA GO, HLA XS. Това са подходи, базирани на нетния аналитичен сигнал (NAS). Използвано е основното тяхно предимство - наличието на селективен сигнал за всеки отделен компонент. Това дава възможност за едномерно калибриране на нормата на нетния аналитичен сигнал като функция от концентрацията. Освен това NAS подхода позволяват пресмятане на важни аналитични характеристики на спектралния метод – селективност, чувствителност, граница на откриване и граница на определяне.

Настоящото проучване показва, че анализът главно на двукомпонентни лекарствени смеси, независимо от степента на припокриване може да бъде извършен успешно както с хеометрични техники, така и с помощта на графичните методи на обработка на спектралното отношение. При трикомпонентни смеси хеометричните са достатъчно надеждни при валидиране със смеси, докато графичните подходи често имат ограничена валидност само за смеси с определено концентрационно съотношение, като дори може да се постави въпросът за тяхната коректност. Ето защо проблемът за разработване на надеждни алгоритми с цел установяване на състава на сложни лекарствени продукти, остава открит. Като обобщение, обединяването на спектралните методи (UV-Vis, NIR, RAMAN) и хеометричните методи за калибриране е много перспективно направление със сериозно приложение в модерния фармацевтичния анализ.

## II. Цел и задачи на дисертационния труд

### Цел на дисертационния труд:

На базата на критична оценка на предложените в литературата методи за UV спектрален анализ на многокомпонентни лекарствени смеси да се **конструират оптимални експериментални планове и подходящи методи за калибриране**, осигуряващи бързина и точност на анализа. Да се оцени **приложимостта** им при конкретно избрани лекарствени смеси.

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

1. Да се разработят и приложат **графични методи за калибриране**, базирани на **методите на производната спектроскопия: ZC и DR**, за количествено определяне на пилокарпин в офталмологична суспензия.
2. Да се изберат подходящи **експериментални планове** за изследване на:
  - **двукомпонентна** линейна система – доксиламин, пиридоксин, в състава на капсули Карибан.
  - **трикомпонентна** система – парацетамол, пропифеназон и кофеин, в състава на таблетки Саридон.
3. Да се приложат **методи за калибриране, базирани на статистически методи за анализ (PLS1, PLS2, PRM)**, за определяне на състава на двукомпонентна лекарствена смес– доксиламин , пиридоксин.
4. Да се приложи **метод за калибриране, базиран на оптимизационна билинейна процедура MCR ALS** за определяне на състава на двукомпонентна лекарствена смес– доксиламин, пиридоксин, без пълна информация за състава на сместа. Да се сравнят с резултатите от PLS подхода
5. Да се разработят и приложат **графични методи за калибриране**, базирани на **методите на обработка на спектралното отношение: DR, RSM, MCR**, за определяне на състава на двукомпонентна лекарствена смес – доксиламин, пиридоксин. Да се покажат критичните моменти при употребата им – избор на делител и подходящ спектрален регион.
6. Да се направи сравнителен анализ на разновидностите на PLS алгоритмите – **NIPALS, SIMPLS, KERNEL, BIDIAG**, за определяне на състава на трикомпонентна лекарствена смес Саридон и да се определи **оптималния алгоритъм** за анализ.
7. Да се приложат **методи за калибриране , базирани на нетния аналитичен сигнал (NAS базирани подходи)** за определяне на състава на трикомпонентна лекарствена смес Саридон. Да се сравнят използваните алгоритми (**NAP CLS, HLA XS, HLA GO**) с резултатите от PLS подхода.



### III. Експериментална част и методи на изследване

#### III.1. Офталмологична суспензия на ацетофталаат, съдържаща пилокарпин

Повечето от аналитичните методи, за количествено определяне на пилокарпин, са течно хроматографски HPLC, с използване на различни колони: октадецила, фенил, циклодекстрин колони или монолитни колони и UVdetection. Тъй като пилокарпин и сродните на него съединения нямат хромофорни групи, анализ може да се извършва в UV областта при дължина на вълната 216 nm, където другите съединения от матрицата имат пречещо действие. Следователно анализът в UV областа е много усложнен, поради наличието на силно спектрално пречене от страна на използваните носители. Освен това пикът на пилокарпина има незначителна абсорбция, в сравнение с този на CAP, което допълнително усложнява задачата за количественото му определяне (2 % разтвор). Ето защо целта на работата е да се разработи бърз и прост спектрофотометричен метод за количествено определяне на пилокарпин в дисперсии, съдържащи ацетофталаат на целулозата като носител.

##### 1. Материали:

целулозен ацетат хидрогенфталаат /CAP/ - WAKO, Tokyo/Osaka, Japan, пилокарпин хидрохлорид (Merk), полиоксиетилен – полиоксипропилен ко-полимер (Lutrol® F68 и Lutrol® F127), BASF, натриева основа р.а., солна киселина р.а.

##### 2. Методи

Приготвяне на дисперсии, съдържащи CAP, LutrolF68 и Lutrol F127:

Всички изследвани дисперсии, съдържат 20% CAP и 4% от повърностно-активните вещества. За получаването им е използван следния метод: към 2M разтвор на натриев хидроксид на порции, при непрекъснато разбъркване, се прибавя CAP. След това се прибавят ПАВ при непрекъснато разбъркване. Желаната рН стойност – около 4,8 – се постига чрез прибавяне на разтвор на солна киселина. Пилокарпин хидрохлорид се включва в готовата дисперсия.

##### *Спектрофотометричен метод за анализ*

Спектрите са заснети с помощта на diode array UV-Vis спектрофотометър Hewlett Packard HP8452A с разделителна способност 2 nm. Измерванията са проведени в кварцови кювети с дебелина 1 см.

Математичната обработка на спектрите – делене и диференциране са извършени с помощта на наличния към спектрофотометъра софтуер.

### *Приготвяне на стандартни разтвори*

а/ Бяха приготвени две серии изомоларни разтвори по отношение на CAP и Lutrol®. Приготвяне на стандартен разтвор на CAP и Lutrol® - 1 g от изходната дисперсия CAP 20 и Lutrol® F68 4% се разтваря в 50 ml вода /Разтвор А/. Получената суспензия се разрежда 50 пъти /Разтвор В/.

б/ приготвяне на стандартен разтвор на пилокарпин хидрохлорид – приготвя се 2% воден разтвор на пилокарпин хидрохлорид, който се разрежда 2 500 пъти /Разтвор С/.

в/ Използван е метода на стандартните добавки-от разтвор С се взимат съответно 5, 6, 8, 10, 13, 15, 20 и 25 ml, които се добавят към стандартните разтвори съдържащи 10 ml CAP и Lutrol® /Разтвор В/ и се доливат до 50 ml /Разтвор D/.

### *Анализ на моделни синтетични смеси*

Количествено определяне на пилокарпин хидрохлорид в моделна дисперсия, съдържаща CAP 20% и Lutrol® 4% - разреждане 12 500 пъти.

## **3. Резултати и обсъждане**

### **3.1. Охарактеризиране на моделни дисперсии, съдържащи CAP**

Оптимизиран е технологичният подход за получаване на дисперсиите, като е постигнат оптимален размер на частиците в моделните дисперсии. Според Европейската фармакопея допустимия размер на частиците е в граници от 20-50 микрометра. За тази цел допълнително са използвани повърхностно активните вещества - Lutrol® F68 и Lutrol® F127. Изследваните дисперсии съдържат 20 % CAP, 4% ПАВ (Lutrol F 68 и Lutrol F 127) и пилокарпин хидрохлорид.

#### **а. Разработване на нов количествен спектрофотометричен метод за определяне на пилокарпин хидрохлорид**

Пилокарпин хидрохлорид има слабо интензивен абсорбционен максимум (216 nm  $\pm$  2 nm). От абсорбционните спектри на CAP, LUTROL®, пилокарпин хидрохлорид и тяхната смес (в съотношение 10:1) фигура 16 се вижда, че слабо интензивният абсорбционен максимум на пилокарпин хидрохлорид е изцяло припокрит от ивицата на CAP в ултравиолетовата област. Използваното повърхностноактивно вещество LUTROL® няма поглъщане в ултравиолетовата област.

Силното спектралното припокриване ивицата на пилокарпин хидрохлорид прави невъзможно конвенционалното му спектрофотометрично определяне. В подобни случаи, анализът може да бъде извършен с помощта на производна спектроскопия.

В настоящото изследване са използвани две графични разновидности на производната спектроскопия за количествено определяне на пилокарпин хидрохлорид:

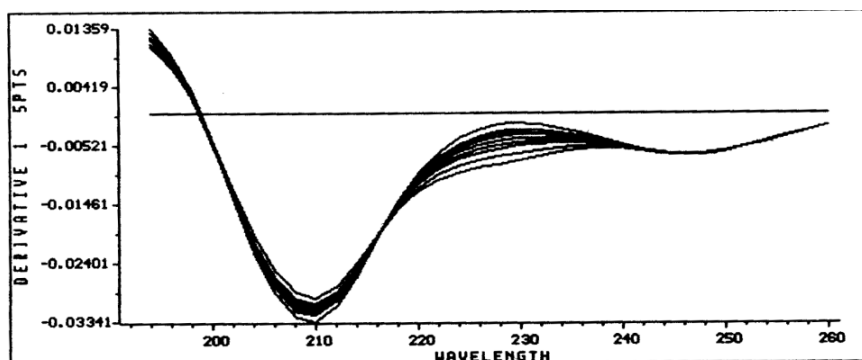
- *Метод на пресичане на нулевата линия (ZC)*

На фиг.1 са представени абсорбционните спектри на стандартни разтвори на CAP + LUTROL® и нарастващи концентрации на пилокарпин хидрохлорид. Като резултат от прибавянето му се появява рамо в абсорбционния спектър.

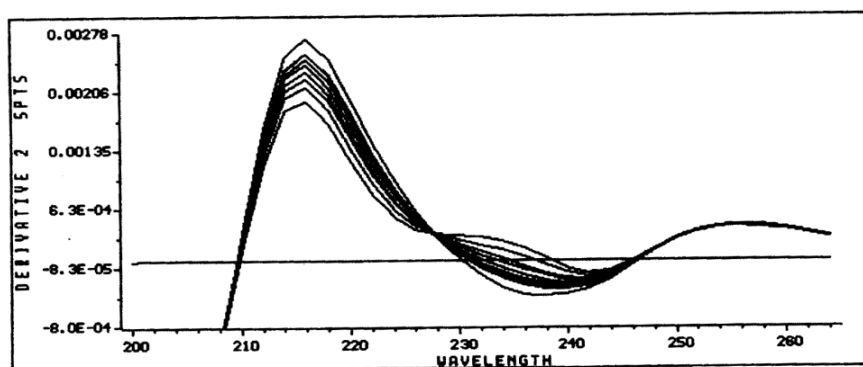
На фиг.1а) и б) са представени производните на абсорбционния спектър – 1-ва и 2-ра производна. Производните спектри на тези разтвори показват наличие на изобестична точка, която вероятно е резултат от взаимодействието на пилокарпин хидрохлорида и носителя. Използването на ZC метода позволява да се определи пилокарпина при тази дължина на вълната, която пресича нулевата линия, тъй като при нея се елиминира абсорбцията на носителя.



Фиг.1. Абсорбционни спектри на стандартни разтвори на CAP и нарастващи концентрации на пилокарпин хидрохлорид



a)



б)

Фиг.2а. Първа производна на стандартни разтвори на САР и нарастващи концентрации на пилокарпин хидрохлорид  
Фиг.2б. Втора производна на стандартни разтвори на САР и нарастващи концентрации на пилокарпин хидрохлорид

Както се вижда от фиг.2а, методът е неприложим при използването на 2 производна. Методът е приложим обаче както при 2, така и при 3 и 5 производна (не са показани тук). Предпочетена за анализ е втората производна, поради оптималното съотношение сигнал - шум. От този спектър /фиг.17б/ графично е определена точката на пресичане на нулевата линия – 230 nm. Калибрационните прави за 2, 3 и 5 производни и статистическите им параметри са обобщени в таблица 1.

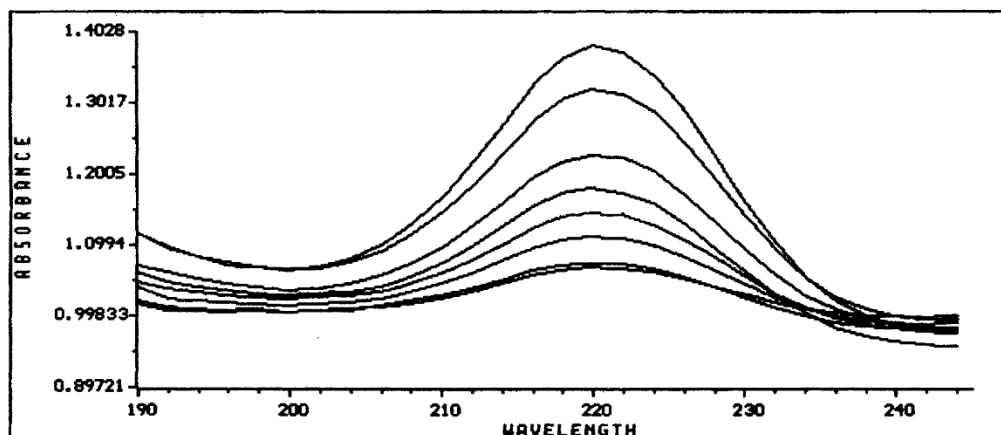
Таблица 1. Статистически параметри на калибрационни прави

Уравнение	R
${}^2D_{230} = 0,00003 + 0,07231 C$	0,9978
${}^3D_{238} = -0,0000038 - 0,01174 C$	-0,9994
${}^5D_{228} = 0,0000002 - 0,00085 C$	0,9989

#### - Метод на производната на спектралното отношение (DR)

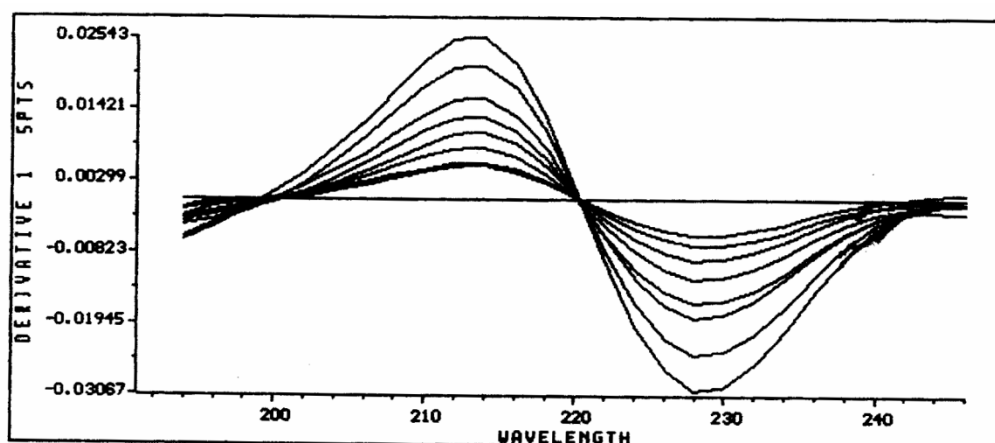
Методът се базира на отношение на спектъра на сместа на единия от компонентите, приет за делител, което свежда двукомпонентната до еднокомпонентна система [21]. Като делител е използван САР+ LUTROL, чиято оптималната концентрация на стандартния разтвор – САР+ LUTROL<sup>®</sup> беше определена

експериментално. Следва разделяне спектрите на сместа от CAP, LUTROL® и пилокарпин хидрохлорид на спектъра на делителя, като на фиг.3 е представено полученото спектралното отношение.



Фиг.3. Спектрално отношение на сместа от CAP и пилокарпин, получено с делител спектъра на CAP

На фиг.4 е показана първата производна на отношението в областта от дължини на вълните 200-260 nm. След 260 nm където стандартният разтвор използван като делител не поглъща, шумът силно нараства. Дължините на вълните, при които се строят калибрационните прави – 212 и 228 nm – съответстват на максимума и минимума на амплитудата на първата производна, както и на минимума на амплитудата на втората производна – 220 nm(не е показана тук). Данните от двете производни са обработени с помощта на линеен регресионен анализ, като статистическите им параметри са обобщени в Таблица 2.



Фиг. 4. Първа производна на отношението на спектъра на сместа от CAP и пилокарпин на спектъра на CAP

Таблица 2. Статистически параметри за производните калибрационни прави

Уравнение: derivative ratio (DD)	R
${}^1DD_{212} = -0,00036 + 6,4424 C$	0,9980
${}^1DD_{228} = 0,0002 - 7,6787 C$	-0,9991
${}^2DD_{220} = 0,0001 - 1,3500 C$	-0,9990
Derivative ratio (DD) с “нормализиран” делител	
${}^1DD_{212} = -0,0071 + 16,89301 C$	0,9940
${}^1DD_{228} = 0,00713 - 19,97994 C$	-0,9959
${}^2DD_{220} = 0,00204 - 3,42754 C$	-0.9974

#### 4. Заключение

Оптимизирана е технология за получаване на рН зависима моделна дисперсия от CAP с концентрация 20%. Установено е че използваните ПАВ- Lutrol<sup>®</sup> F 68 и Lutrol F<sup>®</sup> 128 са подходящи за получаване на дисперсии с оптимален среден размер на частиците и могат да послужат като носител за удължаване действието на пилокарпин в окото.

Предложени са производни спектрофотометрични методи за определяне на пилокарпин хидрохлорид. По-големи предимства предоставя метода на отношение на производните.

### III.2. Хеметрични методи за калибриране на двукомпонентна система, съдържаща доксиламин и пиридоксин

Целта на изследването е да се предложат и сравнят многовариационните статистически методи за калибриране –PLS1, PLS2,PRM с оптимизационните методи за калибриране MCR ALC, MCR ALS CC – за анализ на двукомпонентна система, съдържаща доксиламин и пиридоксин.

#### Експериментална част

##### Апарат

UV-VIS спектрофотометър (Thermo Fisher Scientific, САЩ) модел Evolution 300 се използва за снемане на абсорбционните спектри. Сканирането се провежда в диапазона от 200 nm до 400 nm при интервал от 1.0 nm с кварцова кювета от 1.00 cm. Софтуерът VISIONpro (версия 4.4.1) беше използван за получаване на данните.

##### Материали

Доксиламин сукцинат и пиридоксин хидрохлорид бяха закупени от Sigma Aldrich, USA. Търговски дозирани форми - капсули с твърдо модифицирано освобождаване, всяка съдържаща 10 mg DOX и 10 mg PYR, са закупени от Испания под името Cariban<sup>®</sup> (Laboratorios Inibsa, S.A., Spain). Фосфатно-буфериран физиологичен разтвор (PBS) с рН 6.8 се приготвя съгласно Ph. Eur. 8 и се използва като разтворител за всички готови

продукти и работни разтвори. Всички реактиви, използвани за получаването на PBS, са с аналитична чистота.

### **Приготвяне на стандартни разтвори DOX и PYR**

Точно претеглени 20 mg DOX бяха прехвърлени в обемна колба от 200 mL и разтворени в PBS с рН 6.8. Разтворът се обработва с ултразвук в продължение на 15 минути при стайна температура и обемът на колбата се допълва до маркиране с PBS. По този начин се получава изходен разтвор на DOX с концентрация от 100 mg/L. Същата процедура се прилага, за да се получи изходен разтвор на PYR с концентрация 100 mg/L. Всички работни разтвори се приготвят от изходните разтвори след подходящо разреждане

### **Приготвяне на разтвори на дозирана форма**

Двадесет капсули Cariban® се изпразват и съдържанието им се претегля. Съдържанието на капсулата се смесва добре в хаван и се смилва до фин прах. Прецизно претеглено количество смесен прах (еквивалентно на 10 mg DOX и 10 mg PYR) се прехвърля в 150 mL PBS (рН 6.8), обработва се с ултразвук в продължение на 15 минути и след това се долива до 200 mL с PBS в обемна колба. Така се приготвя основен разтвор с концентрация 50 mg/L за DOX и 50 mg/L за PYR и се филтрува, като се използва 0,45 цт спринцов филтър. След подходящо разреждане се приготвя работен разтвор с концентрация 30 mg/L за DOX и 30 mg/L за PYR и се сканира в спектралния диапазон между 230 и 400 nm.

### **Експериментален план**

При избора на калибрационен план за двукомпонентна система, съдържаща доксиламин и пиридоксин е необходимо да се отчете, че, пиридоксинът има значително по-висока абсорбция в сравнение с доксиламина при еднакви концентрации (фиг.7), както и че степента на спектрално припокриване е около 90% в областта 230-260 nm. Поради това използването на факторни планове за тази система е неудачно. Оказа се че най-подходящо е използването на централен композиционен план на 3 нива-(30, 55 и 80 за DOX, и 15, 20 и 25 за PYR). Допълнителните звездни точки(5 и 105 за DOX, 10 и 30 за PYR) позволяват по-голям обхват за валидационните смеси. Централният композиционен план (CCD) се състои от 28 калибрационни смеси, като е показано в таблица 3. За неговото конструиране е използван софтуер Chemoface и графично е илюстриран по-долу.

Прогнозните възможности на разработените линейни модели PLS1, PLS2, PRM бяха оценени с помощта на външно валидиране, като за целта бяха избрани 8 изкуствени смеси на доксиламин и пиридоксин. Беше спазено условието концентрациите на двата компонента да попадат в областта на използвания концентрационния интервал на смесите за калибриране и са съобразени със съотношението на компонентите в анализиранията капсула, което е 1:1. Тъй като, пиридоксинът има значително по-висока абсорбция в сравнение с доксиламина при еднакви концентрации, неговият

концентрационен интервал бе избран значително по-нисък, както в калибрационния, така и във валидационния сет.

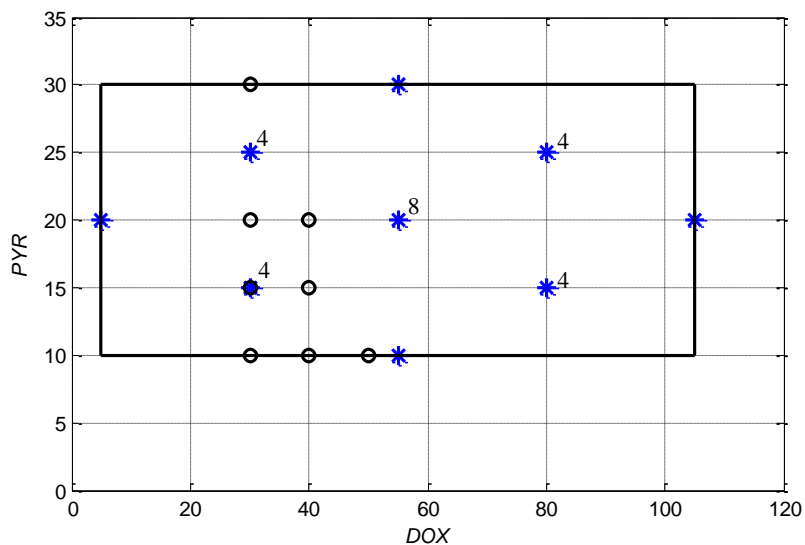
Таблица 3. Централен композиционен план за двукомпонентната система пиридоксин – доксиламин

<i>Calibration set</i>			<i>Validation set</i>		
<i>Mixture</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>Mixture</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>
1	30.0	15.0	1	30.0	10.0
2	30.0	15.0	2	40.0	10.0
3	30.0	15.0	3	30.0	15.0
4	30.0	15.0	4	30.0	20.0
5	30.0	25.0	5	30.0	30.0
6	30.0	25.0	6	40.0	15.0
7	30.0	25.0	7	40.0	20.0
8	30.0	25.0	8	50.0	10.0
9	80.0	15.0			
10	80.0	15.0			
11	80.0	15.0			
12	80.0	15.0			
13	80.0	25.0			
14	80.0	25.0			
15	80.0	25.0			
16	80.0	25.0			
17	5.0	20.0			
18	105.0	20.0			
19	55.0	10.0			
20	55.0	30.0			
21	55.0	20.0			
22	55.0	20.0			
23	55.0	20.0			
24	55.0	20.0			
25	55.0	20.0			
26	55.0	20.0			
27	55.0	20.0			
28	55.0	20.0			

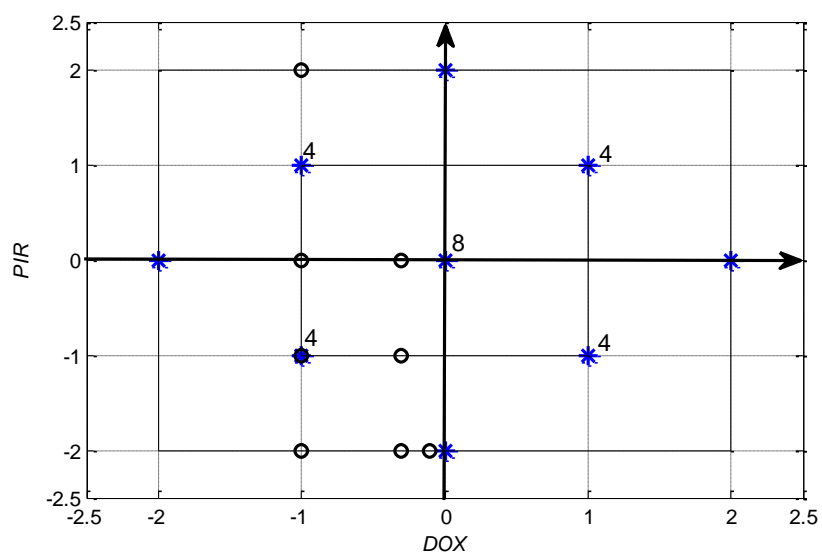
\* Концентрациите на смесите са в mg/L.

На фиг.5а) е показан планът за двукомпонентната система в натурални променливи, а на фиг.5б) – в кодирани фактори, в интервала [-2;+2]. Със звездичка са обозначени калибрационните проби, а с кръгче валидационните проби. Числото до съответната точка от плана е броят на повторенията в тази точка. Когато е проведен само един опит (няма повторение), до съответната точка от плана няма цифра.





а)



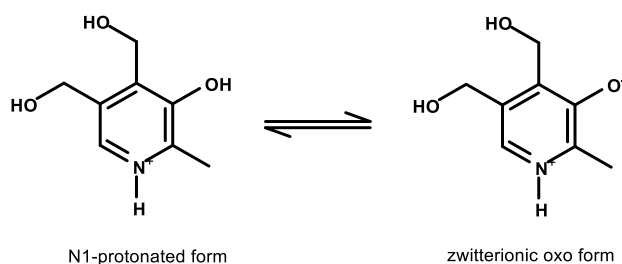
б)

Фиг.5. План на експеримента за двукомпонентната система:

а) в натурални променливи; б) – в кодирани фактори.

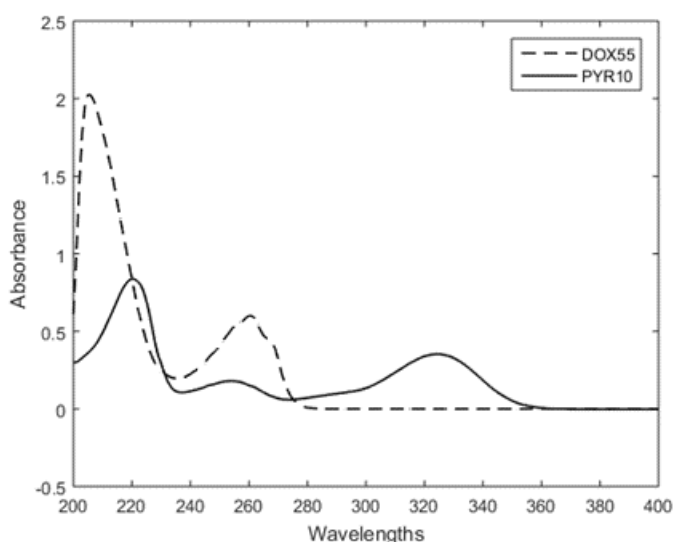
### Тавтомерно равновесие

Във воден разтвор съществува тавтомерно равновесие при пиридоксина, при което спектрите на двете съществуващи форми, силно зависят от рН. В кисела среда доминира протонираната форма при пиридиновия азотен атом, на която съответства ивица с абсорбционен максимум при 290 nm. В неутрална среда преобладава цвитерйонната форма на PYR, в чийто спектър освен абсорбционен максимум при 324 nm се появява нов максимум при 254 nm. Схематично равновесието е представено фиг.6.



Фиг. 6. Тавтомерно равновесие при PYR

Абсорбционните UV спектри на разтворите на доксиламин и пиридоксин във фосфатен буфер с рН 6.8 са представени на Фиг.7. От фиг.7 се вижда че, при неутрално рН двете лекарства имат интензивно припокриващи се UV абсорбционни ивици в областта от 200 до 400 nm. В тази област доксиламина има абсорбционен максимум при 260 nm, при която единствено е възможно определянето му. Вижда се, че и пиридоксина поглъща в същата област и има абсорбционен максимум при 254 nm. Следователно имаме случай на пълно спектрално припокриване на двете вещества, което значително би възпрепятствало определянето на DOX чрез класически спектрофотометричен метод при 260 nm. Конкретно беше изчислена степента на спектралното припокриване между DOX и PYR в областта между 240 и 280 nm (97%) с помощта на формулата на Goikoeschea, Olivieri. Следователно, при този случай на пълно спектрално припокриване, прилагането на конвенционалните процедури за калибриране, като например класическите и обратните най-малки квадрати (CLS и ILS), не дава добри количествени резултати.



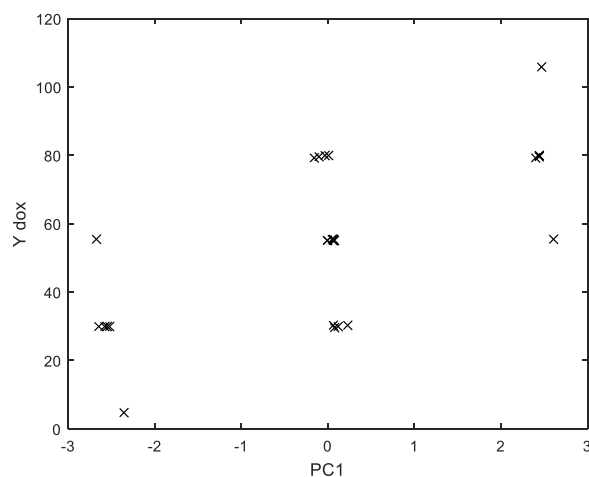
Фиг. 7. Абсорбционни спектри на разтвори на DOX и PYR в PBS (рН 6.8), с концентрация съответно 55 mg/L и 10 mg/L

За разлика от доксиламина, пиридоксин има възможност да бъде определен при две дължини на вълната: 254 nm и 324 nm. Максимумът при 324 nm позволява класическо определяне, поради отсъствие на спектрално припокриване от страна на доксиламина. При 254 nm поради пълното спектрално припокриване от страна на

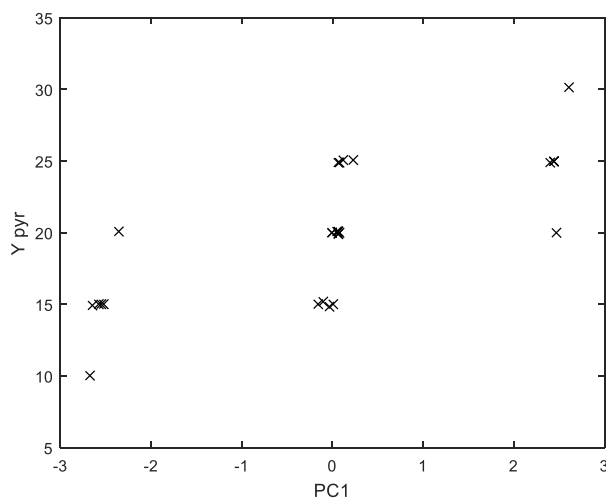
доксиламин, класическите методи са невъзможни. Необходимо е прилагането на други по-надеждни техники, като PLS, PRM и MCR ALS, за да се елиминира наблюдаваното спектрално пречене в този случай от доксиламина.

### Линейност на изследваната система

Известно е че изборът на подходящ метод за калибриране силно зависи от линейността на изследваната система. За откриване наличието на нелинейност при многовариационното калибриране на много силно корелирани променливи (спектралните данни), се използват графични или количествени методи. Тестът за нелинейност, partial response plot (PRP) бе проведен, за да се провери връзката между съдържанието на лекарството и резултатите от PLS . На фиг.8 и фиг.9 са представени PRP графиките за двата компонента, в съответствие със статията на Massart . Извършената оценка за изследваната система показва линейна корелация за двата компонента, което показва приложимостта на линейните PLS модели.



Фиг.8. Partial response plot за DOX



Фиг.9. Partial response plot за PYR

Ако изследваната двукомпонентната система проявява нелинейност, това ограничава до известна степен използването на линейни калибрационни методи като PLS. Това се наблюдава при двукомпонентна система, съдържаща амоксиклав и клавуланова киселина.

### III.2.2. PLS модели

PLS е метод на калибриране, чиято цел е установяване на количествена връзка между независими променливи  $X$  (спектри) и зависими променливи  $C$  (концентрация) съгласно уравнението:

$$C = X \times b$$

$C$  е матрица с размерите на  $N \times s$ , съдържаща стандартни концентрации на компонентите в калибрационните проби ( $N$ ),  $X$  е  $N \times k$  центрирана матрица за данни, съдържаща абсорбциите на стандартни разтвори, измерени при  $k$  различни дължини на вълните и  $b$  е регресионния вектор  $k \times s$ . За разлика от връзката в закона на Беер, където абсорбцията е пропорционална на концентрацията, тук се използва обратната връзка. Когато се включва само един компонент на сместа ( $s = 1$ ), PLS методът се нарича PLS1. За  $s > 1$ , това е известен като PLS2.

Преди анализ на данните с помощта на PLS, първоначално бе извършена селекция на дължините на вълните, като областта от 200 до 230 nm беше отстранена. Останалият спектрален диапазон от 230 до 400 nm (171 променливи) беше избран за анализ на DOX и PYR, тъй като след 400 nm двата компонента нямат спектрално поглъщане. Прилагането на трите линейни техники на калибриране (PLS1, PLS2 и PRM) беше извършено като получените модели, позволяват предсказване концентрацията на лекарствата във смесите за валидиране и капсулата.

За целта изходните спектрални абсорбционни данни са представени в три матрици: калибрационна матрица ( $28 \times 171$ ), валидационна матрица ( $8 \times 171$ ), и матрица съдържаща спектрите на изследваните капсули ( $5 \times 171$ ). Калибрационната и валидационна матрици са приготвени съгласно описания централен композиционен план (таблица 3). За предварителна обработка на данните за PLS1 и PLS2 е избрано центриране със средна стойност, а центриране с помощта на медиана е избрано като стъпка за предварителна обработка на данните в PRM.

Механизмът на регресионните методи за калибриране PLS1 и PLS2 се различава в известна степен. При PLS1 регресия, полученият модел за всяко лекарство, предсказва концентрацията му, като използва единствено матрицата от спектралните данни и неговия регресионен вектор. Този регресионен вектор е различен за всеки от двата компонента. При PLS2 регресия, се използва концентрационната матрица, съдържаща и двата компонента едновременно, като естествено полученият регресионен вектор е един и същ за двата компонента. Това неминуемо се отразява на изборът на броя съществени фактори. Ето защо е обяснимо, че при първия метод, боравещ с различни регресионни вектори имаме различен брой фактори (3 за доксиламин и 4 за

пиридоксин), докато при втория метод броят фактори е един и същ (4 както за доксиламин, така и за пиридоксин).

Невинаги използването на тези два линейни модела води до добри резултати, което най-често се дължи на факта, че не винаги имаме нормално разпределени стойности на концентрациите във калибрационния сет, както и на присъствието на спектрални оутлайери. В такъв случай е необходимо тяхното откриване и отстраняване. Този недостатък може да бъде преодолян чрез използването на по-надеждни техники на калибриране като PRM. При използването на този линеен метод не е необходимо отстраняването на оутлайери, което води до по-голяма сигурност при използването му. Това е предпоставка за сравнение на PRM с другите два популярни метода при анализа на двукомпонентната система. Целта е да се покаже, че този метод наистина демонстрира по-добри аналитични характеристики.

Обикновено оптималният брой фактори се определя с известната техника LOOCV. В разглеждания случай обаче е избрана друга стратегия, като за целта броят фактори се определя с помощта на минималните стойности на RMSEP и RE. Изборът на правилния брой компоненти в моделите е изключително важен, за да се избегне оверфитването на моделите. Както бе коментирано и е показано в Таблица 4, четири латентни променливи бяха избрани за двата компонента в PLS2 модел. За моделите PLS1 и PRM оптималният брой фактори е различен: три за DOX и четири за PYR. Тъй като оптималният брой фактори, необходими за представяне на матриците, е по-голям от идеалното число (два за два компонента), очевидно разполагаме с ранг дефицитни спектрални матрици. Вероятната причина е наличието на силно спектрално припокриване. В този случай PLS и PRM регресията изглеждат най-добрият избор за моделиране на такива данни с мултиколинеарност.

Таблица 4. Параметри за калибриране и валидиране и аналитични характеристики на DOX и PYR с помощта на методите PLS1, PLS2 и RPM.

<i>Parameter</i>	<i>PLS1</i>		<i>PLS2</i>		<i>RPM</i>	
	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>
<i>Calibration</i>						
PCs	3	4	4	4	3	4
RMSEC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.3701	0.0879	0.3582	0.0835	0.2987	0.0648
RE (%)	0.6203	0.4283	0.6002	0.4067	0.8084	0.4226
R <sup>2</sup>	0.9999	0.9998	0.9999	0.9998	0.9998	0.9998
<i>Validation</i>						
RMSEP ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.4220	0.0886	0.3487	0.0943	0.4200	0.0875
RE (%)	1.1432	0.5063	0.9446	0.5388	1.1379	0.4998
R <sup>2</sup>	0.9991	0.9999	0.9994	0.9999	0.9987	0.9999
<i>Figures of merit</i>						
Sensitivity <sup>a</sup>	0.0382	0.0494	0.0351	0.0472	0.0408	0.0450
LOD <sup>b</sup>	0.61-0.89	0.25-0.30	0.59-0.91	0.24-0.29	0.60-0.88	0.23-0.29
LOQ <sup>c</sup>	1.83-2.68	0.75-0.91	1.77-2.73	0.72-0.87	1.81-2.59	0.73-0.89

<sup>a</sup>Чувствителност (L/mg).

<sup>b</sup>Граница на откриване (mg/L).

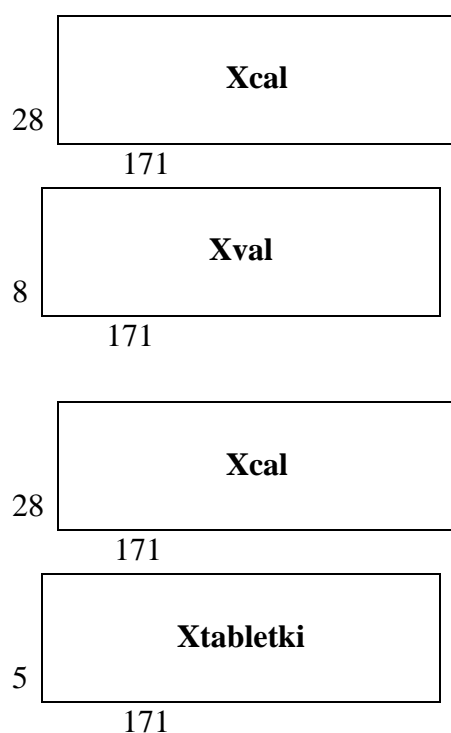
<sup>c</sup>Граница на количествено определяне (mg/L).

Осемте синтетични смеси, използвани за външно валидиране, бяха анализирани с PLS1, PLS2 и PRM за всеки лекарствен компонент. В Таблица 4 са представени статистическите параметри за калибриране и валидиране - RMSEC, RMSEP, RE и  $R^2$ , които дават възможност за сравнение на PLS моделите.

Получените статистически параметри за PLS калибриране на DOX са в следните интервали: 0.2987 - 0.3701 mg/L за RMSEC и 0.6002 - 0.8084% за RE. Калибрирането на PYR дава много по-ниски стойности на RMSEC между 0.0648 и 0.0879 mg/L и за RE стойности между 0.4067 и 0.4283%. Статистическите параметри за валидиране и за двата компонента имат сходни стойности за трите PLS модела. По принцип статистическите параметри за всички модели за DOX са по-лоши в сравнение с PYR. Възможната причина за това е липсата на селективна област в спектъра на DOX поради силното припокриване със спектъра на PYR (фиг.8).

Аналитичните характеристики: чувствителността (FOM), границата на откриване (LOD) и границата на количествено определяне (LOQ) също бяха изчислени за PLS моделите. Предоставени са интервални стойности на LOD и LOQ вместо единични стойности. Вижда се, че пиридоксина има по-висока чувствителност и по-ниски стойности на LOD и LOQ в сравнение с доксиламина. Това може да се дължи на факта, че в по-голямата част от неговия спектър не се наблюдава припокриване със спектъра на доксиламина.

### III.2. 3. MCR-ALS модели. Подредба на спектралните данни



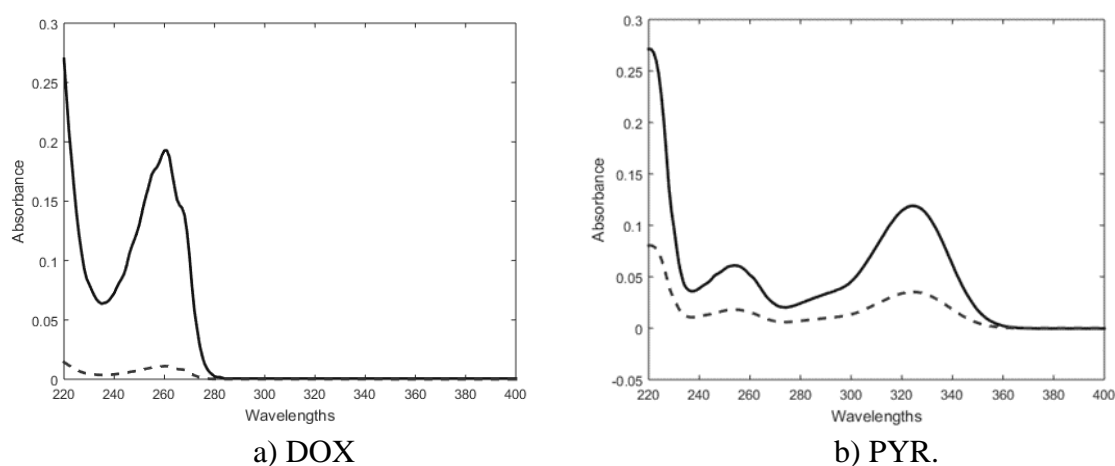
фиг.10. Работни матрици за MCR метода

За MCR метода се формират работни матрици както следва: матрицата за калибриране ( $28 \times 171$ ) и матрицата за валидиране ( $8 \times 171$ ) и матрица на капсулите ( $5 \times 171$ ), показани на фиг.10.

За установяване броя на компоментите в калибрационната матрица е използван SVD, като бяха определени два компонента по величината на сингуларните стойности. Този избор се основава на допускането, че има два съществени фактора и не присъстват други химически видове в изследваната система. Чистите спектрални профили на стандартните разтвори на доксиламин и пиридоксин са използвани като начални приближения след нормализиране. Очаква се тяхното използване да намали ефекта на ротационната неопределеност при оптимизацията. Изследвахме способността на този метод за предсказване концентрацията в калибрационния сет и за да сравним параметрите на калибрирането с тези, получени при използването на PLS метода. Калибрационният сет беше използван като втори сет вместо валидационния сет за да се проведе калибрирането.

### Провеждане на ALS оптимизация с подходящи ограничения

Ограничението за неотрицателни стойности беше използвано за да бъдат концентрациите и спектрите на компонентите с положителни стойности. Още две ограничения бяха използвани по време на оптимизационната процедура. Първоначално MCR ALS модела е тестван с ограничението за еднаквост (equality constrain). След това корелационното ограничение (correlation constrain – CC), е използвано за коригиране матричните ефекти на ексиципентите в капсулите. Корелационното ограничение дава по-добри спектрални профили отколкото ограничението за еднаквост. Спектралните профили, изчислени с помощта на MCR ALS CC са илюстрирани на Фиг.11. Спектралните профили са тествани за всеки компонент чрез изчисляване корелацията им с чистите спектри на доксиламин и пиридоксин. Получените стойности на корелационните коефициенти са 0.9933 и 0.9983, респективно.



Фиг.11. Истински (-) и изчислени (-) спектрални профили на два анализа

Изчислените статистически параметри за калибриране и валидиране за MCR-ALS и MCR-ALS-CC са изброени в таблица 5.

Вижда се, че стойностите на LOF и процентът на вариация са много сходни и за двата варианта на MCR-ALS – с ограничения за равенство и с корелационното ограничение. От друга страна се вижда, че сходимостта при двата подхода се постига чрез различен брой итерации. Прилагането на корелационното ограничение намалява броя на итерациите за DOX и PYR. RMSEC, RMSEP и RE стойностите за калибриране и валидиране на двата компонента са по-ниски след използване на корелационното вместо ограничения за равенство, което очерта MCR-ALS-CC като по-добър модел. Получените резултати показват, че прогнозната способност на методите MCR-ALS е по-добра за PYR в сравнение с DOX, което също се наблюдава при PLS модели. Като цяло, аналитичните параметри от Таблица 4 и Таблица 5 показват, че PLS методите имат предимство пред техниката MCR-ALS. Изчислените грешки за DOX са подобни за PLS и MCR-ALS, докато за PYR с PLS, тези грешки са много по-малки в сравнение с MCR-ALS.

Таблица 5. Параметри за калибриране и валидиране на DOX и PYR за методите MCR-ALS и MCR-ALS-CC

<i>Parameters</i>	<i>MCR-ALS</i>		<i>MCR-ALS-CC</i>	
	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>
<i>Calibration</i>				
PCs	2	2	2	2
Number of iterations	15	12	4	3
LOF (%) (PCA)	0.3712	0.5357	0.3715	0.5497
LOF (%) (exp.)	0.7855	0.8753	0.7856	0.8840
Percent of variance	99.9938	99.9923	99.9938	99.9922
RMSEC ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.6117	0.2117	0.6106	0.2088
RE (%)	1.0251	1.0312	1.0233	1.0170
R <sup>2</sup>	0.9997	0.9990	0.9997	0.9990
<i>Validation</i>				
Number of iterations	7	6	4	3
LOF (%) (PCA)	0.4702	0.7071	0.4697	0.6945
LOF (%) (exp.)	0.8215	0.9766	0.8213	0.9676
Percent of variance	99.9933	99.9905	99.9933	99.9906
RMSEP ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	0.4553	0.2065	0.4507	0.1809
RE (%)	1.2335	1.1800	1.2210	1.0335
R <sup>2</sup>	0.9987	0.9998	0.9987	0.9998

Сред разгледаните методи PLS и PRM демонстрират, че имат най-добра прогностична способност за анализ на двукомпонентни смеси DOX и PYR. Въпреки това, разработените MCR-ALS методи имат съществено предимството да предскажат чистите спектрални профили на лекарствата и също да отчетат влиянието на интерфериращите компоненти в дозираните лекарствени форми.

След оптимизирането на параметрите на етап калибриране, всички използвани модели (PLS1, PLS2, RPM и MCR-ALS-CC) бяха успешно приложени за оценка на



DOX и PYR в изкуствени смеси за валидиране. Средният аналитичен добив и стандартно отклонение са обобщени в таблица 6. Получените резултати показват висока прогнозираща способност на всички разработени методи.

Таблица 6. Резултати от теста за валидиране ,с методите PLS1, PLS2, RPM и MCR-ALS-CC.

<i>Mixture</i>		<i>PLS1</i>		<i>PLS2</i>	
<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>
<i>True (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</i>		<i>Recovery (%)</i>		<i>Recovery (%)</i>	
30.0	10.0	100.66	98.73	100.54	99.30
40.0	10.0	101.50	100.29	101.15	100.86
30.0	15.0	101.33	99.84	100.86	100.44
30.0	20.0	99.33	100.90	99.44	100.61
30.0	30.0	99.33	100.19	99.19	100.01
40.0	15.0	101.50	100.04	101.21	100.71
40.0	20.0	99.25	100.09	99.40	99.94
50.0	10.0	101.40	100.99	101.07	101.6
<i>Mean (%)</i>		100.54	100.13	100.36	100.44
<i>SD</i>		1.06	0.70	0.87	0.71

<i>Mixtures</i>		<i>RPM</i>		<i>MCR-ALS-CC</i>	
<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>
<i>True (<math>\mu\text{g mL}^{-1}</math>)</i>		<i>Recovery (%)</i>		<i>Recovery (%)</i>	
30.0	10.0	100.45	99.20	100.23	99.53
40.0	10.0	101.15	100.64	101.17	102.32
30.0	15.0	101.12	100.30	101.72	101.44
30.0	20.0	98.83	100.71	99.22	100.13
30.0	30.0	98.53	100.05	99.43	100.31
40.0	15.0	101.22	100.57	101.76	101.41
40.0	20.0	98.77	99.99	98.94	99.69
50.10	10.0	101.04	101.46	101.22	103.18
<i>Mean (%)</i>		100.14	100.37	100.46	101.00
<i>SD</i>		1.21	0.66	1.15	1.31

### Анализ на търговски дозирани лекарствени форми

Таблица 7. Аналитични добиви, получени чрез PLS1, PLS2, RPM и MCR-ALS-CC методи за анализ на Cariban® капсули.

<i>Parameter</i>	<i>PLS1</i>		<i>PLS2</i>		<i>RPM</i>		<i>MCR-ALS-CC</i>	
	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>
Recovery (%)	98.43	101.76	100.08	102.34	98.55	101.45	100.79	99.18
S.D	1.44	1.38	1.37	1.19	1.29	1.08	0.72	0.69

Предложените PLS и MCR-ALS-CC методи бяха приложени за едновременното определяне на DOX и PYR в търговски Cariban® капсули. Получените статистически параметри са представени в таблица 8.

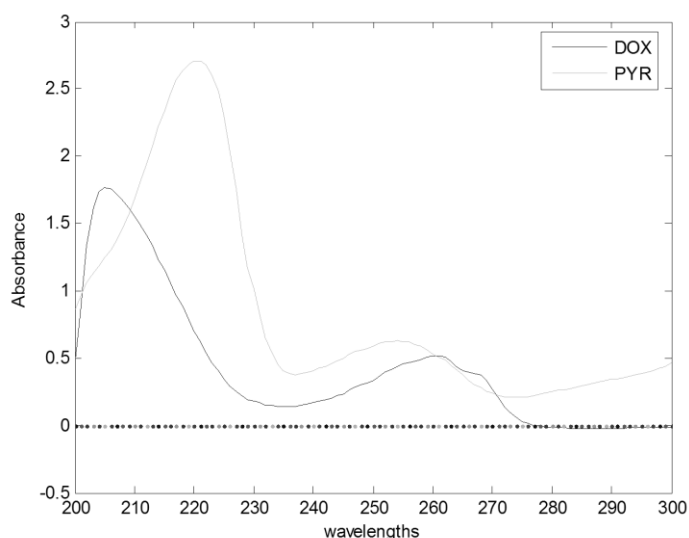
Всички използвани методи могат да се използват за количествено определяне както на DOX, така и на PYR в дозирани лекарствени форми. Обобщено, получените аналитични добиви са отлични (98,43% - 102,34) и точността е (0,69-1,44). По-добрите резултати, демонстрирани от MCR-ALS при количествено определяне на лекарството в дозирани форми, вероятно е свързана със способността на метода да третира дори некалибрираните ексипиенти, които не са включени в калибрационните проби.

### Заклучение

Сравнените спектрофотометрични хемометрични методи не показват съществени разлика по отношение на едновременно количествено определяне на доксиламин и пиридоксин в изкуствени бинарни смеси и в дозирани форми. Прогнозиращата способност на PLS1 е сравнима с тази на PLS2 и PRM. Въпреки това по-надеждния алгоритъм PRM демонстрира превъзходство над двата класически PLS модела, тъй като методът не изисква отстраняването на оутлайери. MCR-ALS-CC дава най-добри резултати по отношение на количественото определяне на лекарството в дозираните форми. Всички разработени процедури за калибриране се оказват надеждни методи за анализ на доксиламин и пиридоксин във фармацевтичните препарати въпреки наличието на помощни вещества в дозираните форми.

### III.3. Графични методи за калибриране, базирани на методите на обработка на спектралното отношение: DR, RSM, MCR за определяне на доксиламин в състава на двукомпонентна лекарствена смес – доксиламин –пиридоксин.

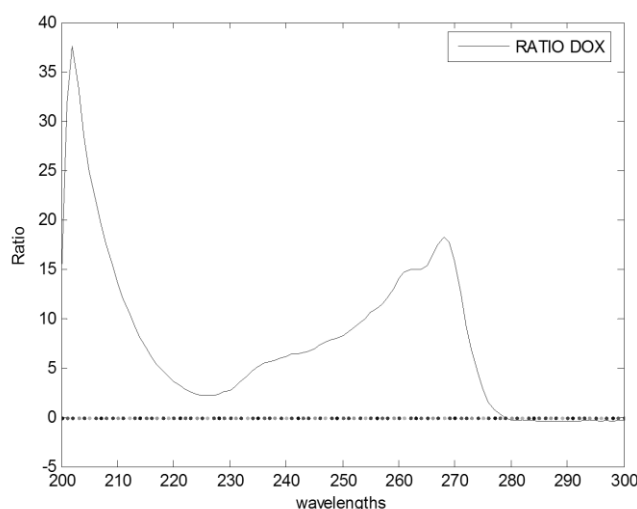
Целта на графичните методи е разработване на прости техники за определянето на доксиламин в присъствието на пиридоксин.



Фиг.12 Абсорбционни спектри на DOX и PYR

При изброените техники се използват процедури като делене, диференциране и изваждане, които могат да се реализират дори със софтуера на спектрофотометъра или с прости програмни кодове. На фиг.6 беше показано, че пиридоксин (PYR) в двукомпонентна система съдържаща и доксиламин, може да бъде определен при 324 nm. Определянето на доксиламин обаче в присъствие на пиридоксин е силно затруднено в областта от 240 до 270 nm поради наличие на силно спектрално припокриване. Това е илюстрирано на фиг.12.

Оригинално решение, за елиминирание спектралното пречене на единия компонент, представлява използването на спектралното отношение. Спектрално отношение се дефинира като се разделя спектралният вектор на определяемия компонент (DOX) на вектора на втория компонент (PYR), който се явява пречещ. Полученото спектрално отношение е показано на фиг.13.



фиг.13. Спектрално отношение за DOX

Елиминирането на пречещия компонент (PYR) в сместа може да стане след диференциране на полученото спектрално отношение, което е показано на фиг.14. Като алтернатива се използва също и центриране на полученото спектрално отношение, което ще бъде илюстрирано на фиг.15. Двете математически трансформации имат идентичен резултат – превръщат двукомпонентната система в еднокомпонентна. Амплитудата на новия трансформиран сигнал за търсения компонент (DOX) е пропорционална на неговата концентрация и позволява определянето му с класическо едномерно калибриране при фиксирана дължина на вълната.

От двете техники за предпочитане е едномерната техника на центриране на спектралното отношение. Нейните предимства в сравнение с производните техники са следните. При метода на калибриране чрез диференциране на спектралното отношение, се налагат оптимизации при избора вида на производната, ширината на спектралния прозорец и степента на интерполиращия полином. Като резултат това често води до влошаване съотношението сигнал-шум в производната крива, и оттам по-малка чувствителност на определянето. При метода на центриране на спектралното отношение имаме само изваждане на средна стойност от вектора на спектралното

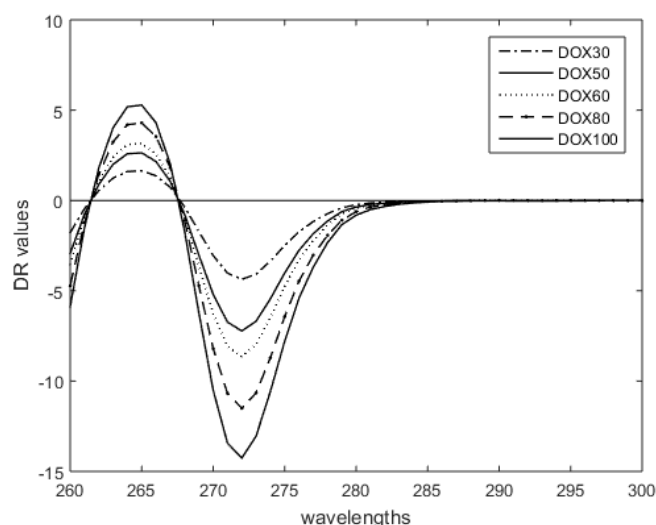
отношение. Ето защо амплитудата на получения центриран сигнал е по-голяма в сравнение с диференцирания сигнал и оттам чувствителността на определянето се повишава.

### III.3.1. Графичен метод базиран на диференциране на амплитудата на спектралното отношение - Derivative Ratio method(DR)

За определянето на доксиламин , поради интензивното припокриване на DOX и PYR спектрите при 260 nm , разработихме количествен метод , който се базира на техниката на първата производна на спектралното отношение. Записаните калибрационни спектри на DOX се разделят на нормализирания абсорбционен спектър на PYR, след което се провежда числено диференциране. Стойността на амплитудите на производната на спектралното отношение при 271 nm за DOX беше избрана за калибриране и намерена регресионната зависимост от съответната концентрация на стандартните разтвори (фиг.14). Нормализираният спектър с концентрация 10 mg/L PYR разтвор беше определен като оптимален делител. Беше получено следното калибрационно уравнение за DOX:

$$Y_2 = 0.0753 \times C_2 + 0.1338$$

където  $Y_2$  е амплитудата при 271 nm и  $C_2$  е концентрацията на доксиламина в mg/L .



Фиг.14. Първа производна на спектралното отношение на доксиламин в концентрационния интервал 30 ÷ 100 mg/L , използвайки PYR (10 mg/L ) като делител.

Пиридоксинът беше определен при дължина на вълната 324 nm, съответстваща на абсорбционния му максимум, тъй като отсъства спектрално припокриване от страна на доксиламина. Калибрационното уравнение за определяне на пиридоксина е:

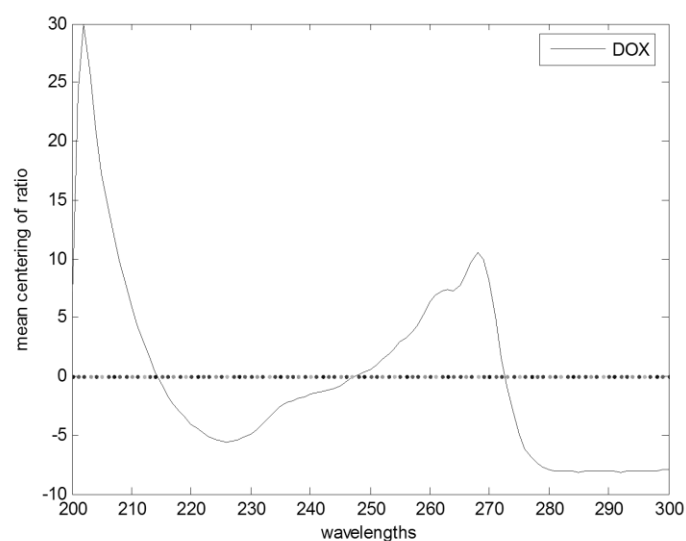
$$Y_1 = 0.0352 \times C_1 + 0.0020$$

където  $Y_1$  са стойностите на абсорбцията при 324 nm , а  $C_1$  е концентрацията на PYR в mg/L.

Предложеният количествен спектрофотометричен метод беше тестван при използване на лабораторно приготвени смеси от DOX и PYR с различни концентрации в рамките на определения диапазон на линейност в диапазона 30 ÷ 100 mg/L за DOX и 10 ÷ 30 mg/L за PYR. Бяха получени следните регресионни параметри: 1,1679 RMSEP, 3,07% REP, 101,54±2,41 аналитичен добив; 0,9986  $R^2$  за DOX и 0,1312 RMSEP, 0,97% REP, 100,57±1,22 аналитичен добив, 0,9998  $R^2$  за PYR.

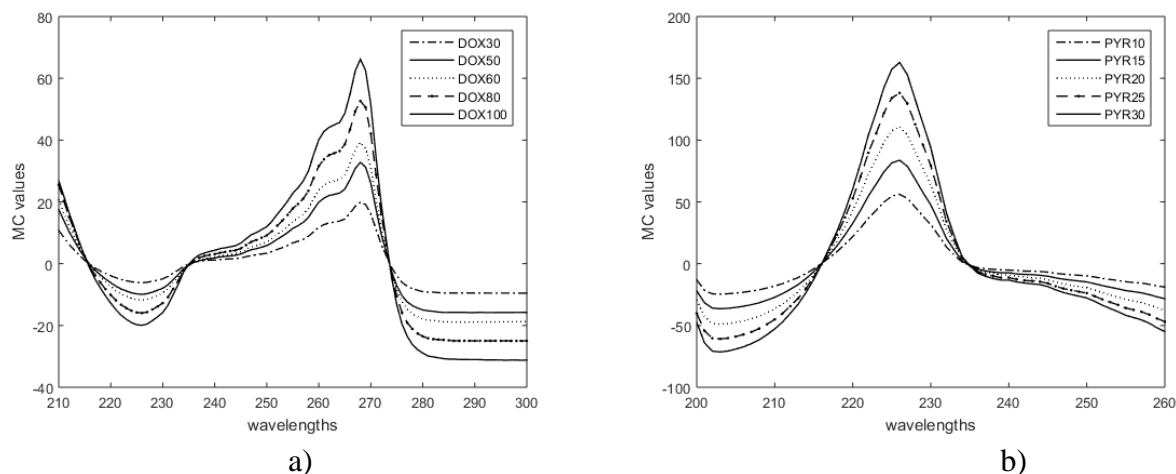
### III.3.2. Графичен метод базиран на центриране на амплитудата на спектралното отношение(MCR)

Математическата илюстрация на метода за количествено определяне на DOX(X) в присъствието на PYR(Y), е описана в последователност в литературния обзор. Елиминирането на пречещия компонент (PYR) в сместа може да стане след центриране на полученото спектрално отношение за DOX, показано на фиг.13. Резултатът след центрирането е показан на фиг.15.



Фиг.15. Центриране на спектрално отношение с помощта на средна стойност

За определянето на DOX спектри на стандартните му разтвори, се разделят на нормализирания абсорбционен спектър на PYR. По този начин се получават серия вектори на спектралното отношение, които след това бяха центрирани със средна стойност. На Фиг. 16а са показани тази серия центрирани спектрални отношения на стандартни разтвори за DOX. Вижда се че амплитудата при 268 nm е подходяща за количествено определяне на DOX.



Фиг. 16. Центрирани спектрални отношения на:

- a) DOX в диапазона 30-100 mg/L, използвайки нормализиран PYR (10 mg/L) като делител,  
 б) PYR в диапазона от 10-30 mg/L, използвайки нормализиран DOX (30 mg/L) като делител.

По същия начин, спектри на стандартните разтвори на PYR се разделят на нормализирания абсорбционен спектър на DOX, като се получават серия вектори на спектралното отношение, които след това се центрират със средна стойност. На фиг. 32б са показани тази серия центрирани спектрални отношения за стандартните разтвори за PYR. Вижда се че амплитудата при 226 nm е подходяща за количествено определяне на DOX.

Необходимо е да се отбележи, че определянето на PYR с този метод не е особено коректно, поради факта че DOX няма поглъщане след 280 nm. Ето защо амплитудата на спектралното отношение при 320 nm има много високи стойности (не е показана тук). Определянето на при 226 nm намалява чувствителността при определянето на PYR, което се явява недостатък на метода. За предпочитане е този метод да се използва само за определянето на DOX.

За оптимизация на разработеният метод, се оценява влиянието на концентрацията на делителя върху аналитичните параметри: наклон, отрез и корелационен коефициент на калибрационните графики. Тествани са различни концентрации на делителя – 30, 40, 50 и 60 mg/L за DOX и 10, 20 и 30 mg/L за PYR. Оказва се, че промяната на концентрацията няма значителен ефект върху линейния диапазон на калибриране и изчислените аналитични параметри. Използването обаче на нормализиран делител увеличава около 10 пъти амплитудата на полученото спектрално отношение. Ето защо са използвани нормализирани делители при определянето и на двата компонента.

Следователно нормализираните спектри на 30 mg/L DOX разтвор и 10 mg/L PYR разтвор се използват като делители в предложената методика. Линейността се определя в диапазона от 30-100 mg/L за DOX и 10-30 mg/L за PYR. Регресионните уравнения за двата компонента са:

$$Y_1 = 0.6528C_1 - 2.1807 \text{ при } 268 \text{ nm за DOX}$$

$$Y_2 = 5.3553C_2 + 3.2736 \text{ при } 226 \text{ nm за PYR}$$

където  $Y_1$  и  $Y_2$  са стойностите на амплитудите при избраните дължини на вълните, а  $C_1$  и  $C_2$  са концентрациите в mg/L.

След преобразуване на двете уравнения бяха получени следните калибрационни уравнения:

$$C_1 = (Y_1 + 2.1807) / 0.6528 \text{ при } 268 \text{ nm за DOX}$$

$$C_2 = (Y_2 - 3.2736) / 5.3553 \text{ при } 226 \text{ nm за PYR}$$

Същата процедура се използва за анализ на лабораторно приготвени смеси и дозирани лекарствени форми, като се използва спектрите на смесите или на дозирана форма вместо тези на чистите компоненти. Всички регресионни параметри за двата компонента са представени в Таблица 8.

Таблица 8. Регресионни параметри, получени чрез прилагане на MCR метода за определяне на DOX и PYR.

Parameters	MCR	
	DOX	PYR
Range of linearity	30-100	10-30
Calibration wavelengths	268	226
RMSEP	1.1433	0.3186
REP%	2.5310	2.3533
Slope	0.9426	1.0214
intersept	3.0138	-0.4878
Recovery	102.23±1.51	97.54±2.35
R <sup>2</sup>	0.9998	0.9995

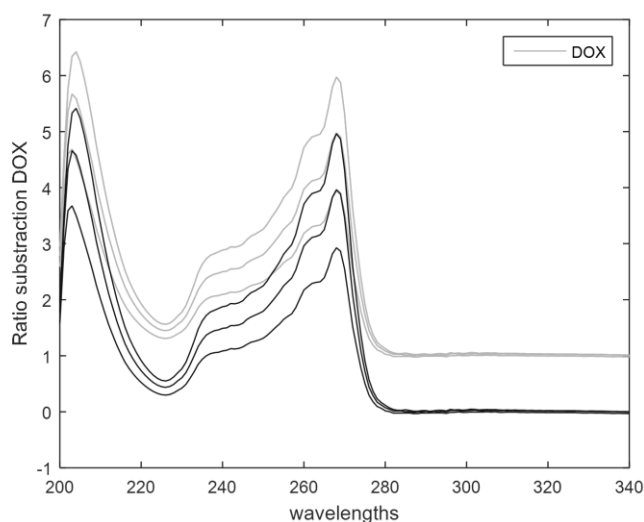
Както е показано, грешката в количественото определяне на DOX е по-висока в сравнение с тази на PYR, което се дължи на интензивното спектрално припокриване на компонентите в областта на максималната абсорбция на DOX при 260 nm. Очевидно е че и определянето на PYR по този метод също е съпроводено с голяма грешка, поради причините описани по-горе.

### III.3.3. Графични методи, базиран на изваждане на амплитудата на спектралното отношение – (RSM)-DOX, ERSM-PYR

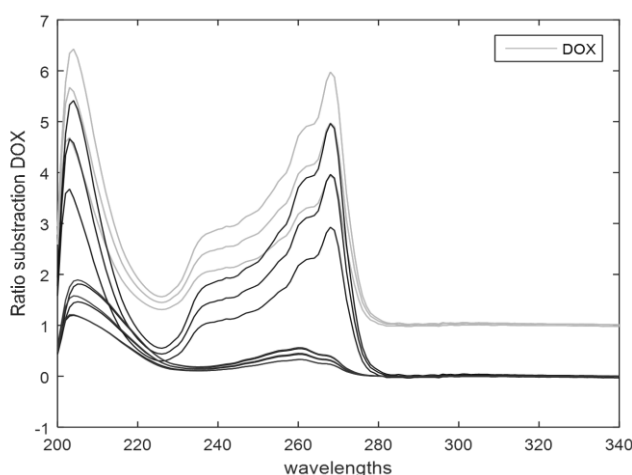
Теоретичната илюстрация на метода за разглежданата конкретна система – доксиламин и пиридоксин в смес вече е направена в теоретичната част. Графична

илюстрация на метода е показана на фигурите по-долу. В следващите разглеждания, нека компонентът X се конкретизира като DOX = X, а компонентът Y като PYR = Y.

Първият компонент X може да се определи, като се раздели спектъра на сместа (X + Y), с известна концентрация на Y като делител (Y'). Разделянето ще даде нова крива, която представлява  $\frac{X}{Y'}$  + константа. От фиг.17 се определя стойността на тази константа  $\frac{Y}{Y'}$  в района на платото (след 280 нм). Измерва се стойността на тази константа. След изваждане на константата се получава нова крива. Абсорбционният спектър на компонента X, показан на фиг.18 може да се получи чрез умножаване на спектъра на полученото съотношение с делителя Y'.



Фиг.17. Центрирано спектрално отношение



Фиг.18. Абсорбционен спектър на DOX

Като обобщение в таблица 9 са сравнени аналитичните характеристики на трите предложени графични методи.



Таблица 9. Аналитични характеристики на DOX и PYR с помощта на методите MCR,DR и RSM.

<i>Parameter</i>	<i>MCR</i>		<i>DR</i>		<i>RSM</i>	
	<i>DOX</i>	<i>PYR</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR*</i>	<i>DOX</i>	<i>PYR*</i>
Range of linearity	30-100	10-30	30-100	10-30	30-100	10-30
Calibration wavelengths	268	226	271	324	268	226
RMSEP	1.1433	0.3186	1,1679	0,1312	1.1587	0.1312
REP%	2.53	2.35	3,07	0,97	3.04	0.97
Slope	0.9426	1.0214	0.9384	1.0034	0.9455	1.0034
intersept	3.0138	-0.4878	3.0239	0.2312	3.1182	0.2312
Recovery	±102.23	±97.54	±101,54	±100,57	±103.43	±100.57
$R^2$	1.51	2.35	2,41	1,22	1.62	2.41
$R^2$	0.9998	0.9995	0.9923	0.9998	0.9996	0.9998

\*PYR е определен с класическа спектрофотометрия при 324 nm.

Вижда се, че най-големи предимства предлага MCR метода за калибриране, поради най-ниски стойности на REP% и RMSEP. И трите метода имат затруднения при определяне на втория компонент PYR, тъй като делител се явява DOX, който не поглъща в областта на втория компонент.

Като общ извод хемометричните методите за калибриране предложени в раздел X.2 (PLS1, PLS2, MCR ALS) предлагат по-добри параметри за калибриране и валидиране и аналитични характеристики в сравнение с предложените в този раздел графичните техники DR, MCR, RSM (за сравнение таблица 4 и таблица 5).

#### **III.4. Сравнение на PLS алгоритми за калибриране на трикомпонентна система, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин**

Целта е да бъдат сравнени прогнозните възможности на различни PLS алгоритми, като бъде избран най-подходящият от тях за анализ на таблетки Саридон, съдържащи парацетамол, пропифеназон и кофеин. Тестваните PLS варианти са NIPALS, SIMPLS, Kernel и Bidiagonalization. В тестовете за сравняване на алгоритми се отчита само PLS1 (една зависима променлива). Най-добрата селекция от оптималния брой PLS-фактори (A) се осъществява чрез използване на техниката за кръстосано валидиране .

##### **III.4.1. Теория на PLS алгоритмите**

###### **Classical PLS-NIPALS**

Този класически алгоритъм е подходящ за моделиране на матрици X с различна размерност, които съдържат спектралните променливи. Следователно, за матриците при които  $I > J$  или  $J > I$ , а за този алгоритъм е известно, че не е подходящ за X матрици

съдържащи голям брой променливи. Този алгоритъм разлага  $X$  и  $y$  (или  $Y$ ) в по-малки матрици и вектори, за да изчисли калибрационния вектор  $b$ , който да се използва в следващите етапи на прогнозиране. Общите стъпки на алгоритъма са:

$$\mathbf{w}: \text{ PLS - weight for } \mathbf{X}: \mathbf{w}^t = \mathbf{u}^t \mathbf{X} / (\mathbf{u}^t \mathbf{u})$$

$$\mathbf{t}: \text{ PLS - score for } \mathbf{X}: \mathbf{t} = \mathbf{X} \mathbf{w}$$

$$\mathbf{q}: \text{ PLS - loading for } \mathbf{y}: \mathbf{q} = \mathbf{t}^t \mathbf{y} / (\mathbf{t}^t \mathbf{t})$$

$$\mathbf{u}: \text{ PLS - score for } \mathbf{y}: \mathbf{u} = \mathbf{y} \mathbf{q} / (\mathbf{q}^t \mathbf{q})$$

$$\mathbf{p}: \text{ PLS - loading for } \mathbf{X}: \mathbf{p} = \mathbf{t}^t \mathbf{X} / (\mathbf{t}^t \mathbf{t})$$

$X$  и по избор  $y$  претърпяват дефлация преди да се повтарят горните стъпки за новата PLS-променлива:

$$\mathbf{X}_1 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1 \mathbf{p}_1^t \quad \text{и} \quad \mathbf{y}_1 = \mathbf{y} - \mathbf{t}_1 \mathbf{q}_1^t$$

Следващият компонент се оценява с помощта на  $X_1$  и  $y_1$  и се продължава с  $X_2, y_2, \dots, X_A, y_A$ , докато не бъде установен адекватен модел. След като се намери оптималният брой фактори ( $A$ ), тогава  $b$  се изчислява като:

$$\mathbf{b} = \mathbf{W}^t (\mathbf{P} \mathbf{W}^t)^{-1} \mathbf{q}$$

където  $W$  е матрицата на теглата за  $X$ ,  $P$  е натоварващата матрица на  $X$  и  $q$  е векторът на натоварване за  $y$ .  $T$  и  $-1$  са съответно за транспониране и обратни операции. След като  $b$  се оценява от PLS-NIPALS, предсказването на целевия компонент от неизвестния спектър  $a_{un}$  се извършва по следния начин:

$$c_{un} = \mathbf{a}_{un} \mathbf{b}$$

## PLS-SIMPLS

Този алгоритъм е по-бърз от PLS-NIPALS, но не се препоръчва за матрици с много променливи- $X$ :

$$\mathbf{s} = \mathbf{X}^t \mathbf{y}$$

$$\mathbf{r}: \text{ PLS-loading for } \mathbf{y}: \mathbf{r} = \mathbf{s}$$

$$\mathbf{t}: \text{ PLS-score for } \mathbf{X}: \mathbf{t} = \mathbf{X} \mathbf{r}$$

$$\mathbf{p}: \text{ PLS-loading for } \mathbf{X}: \mathbf{p} = \mathbf{X}^t \mathbf{t}$$

$$\mathbf{q}: \text{ PLS-loading for } \mathbf{y}: \mathbf{q} = \mathbf{y}^t \mathbf{t}$$

Получените вектори  $r, t, p$  и  $q$  се съхраняват съответно като матрици  $R, T, P$  и  $q$ . Преди да се изчисли следващата PLS променлива  $s$  се проектира на подпространство на

Р. Горният алгоритъм се прекратява, след като всички PLS променливи се оценяват по схемата по-горе. Регресионният вектор се изчислява като:

$$\mathbf{b} = \mathbf{Rq}$$

Предвиждането на целевия компонент в новата проба се оценява, както е показано по-горе. PLS-SIMPLS е по-бърз от класически PLS-NIPALS, тъй като той продължава без дефлация на  $X$  и  $y$  и се използват по-малко матрици (за да се намери  $b$ ).

### PLS-Kernel

Има два общи варианта на алгоритъма на този алгоритъм, предложени досега. Първият може да обработва матрици от много проби, т.е.  $J$  ( $I \gg J$ ), а другият (който е подходящ за изследваната система) е предложен за  $X$ -матрици с много променливи ( $J \gg I$ ). Във всички тези алгоритми се създават кондензирани матрици от  $X$  и  $Y$  (или  $y$ ), което е съществена стъпка. В използвания алгоритъм се създават две кондензирани матрици  $XX^t$  и  $YY^t$  или  $yy^t$ . Матрицата на ядрото след това се изчислява като  $XX^tYY^t$ . Основните стъпки на алгоритъма са:

1. Известният вектор на матрицата на ядрото се приема като първият  $X$  вектор на теста  $t_1$ . След това  $Y$  векторът за оценка се изчислява като:  $u_1 = YY^t t_1$ .

2. Следващата стъпка е както следва:

$$\mathbf{G}_1 = \mathbf{I} - t_1 t_1^t$$

$$\mathbf{X}_1 \mathbf{X}_1^t = \mathbf{G}_1 \mathbf{X} \mathbf{X}^t \mathbf{G}_1$$

$$\mathbf{Y}_1 \mathbf{Y}_1^t = \mathbf{G}_1 \mathbf{Y} \mathbf{Y}^t \mathbf{G}_1$$

Горните операции ни предпазват от връщането към оригиналните големи матрици и изчисляването на свързващите матрици, които са необходими в началото на алгоритъма. Както може да се види, матриците, включени в алгоритъма на ядрото, имат по-малки размери от оригиналните матрици.

3. Следващите вектори  $t$  и  $u$  се оценяват, като се използват актуализираните матрици. Калибрационната матрица (съдържаща калибрационните вектори за целевите разтвори) се изчислява от матриците за тегло и натоварване ( $W$ ,  $P$  и  $Q$ ), както следва:

$$\mathbf{W} = \mathbf{X}^t \mathbf{U}$$

$$\mathbf{P} = (\mathbf{T}^t \mathbf{X})(\mathbf{T}^t \mathbf{T})^{-1}$$

$$\mathbf{Q} = (\mathbf{T}^t \mathbf{Y})(\mathbf{T}^t \mathbf{T})^{-1}$$

Стъпка 3 се повтаря, докато се оцени оптималният брой PLS-променливи.

Трябва да се отбележи, че всички вектори в  $W$  трябва да бъдат нормализирани преди създаването на матрицата  $B$ :

$$B = W(P^t W)^{-1} Q^t$$

Изследваните вещества могат да бъдат прогнозирани от изследвания спектър  $a_{un}$  на пробата, както следва:

$$C_{un} = a_{un} B$$

### PLS-Bidiagonalization

Този алгоритъм стартира с разлагането на спектралната матрица  $X$  на три матрици:

$$X = URV^t$$

където  $U(I \times J)$  и  $V(I \times J)$  са матрици с ортонормални колони (тоест,  $U^t U = V^t V = 1$ ) и  $R(J \times J)$  е диагонална матрица. Важно е да се отбележи, че в предходните алгоритми всички колони в генерираните матрици са задължително ортогонални (тоест,  $W^t W = P^t P = 0$ ). След като се изчислят матриците  $U$ ,  $R$  и  $V$  с оптималния брой PLS-фактор, се изчислява регресионния вектор:

$$b = VR^{-1} U y$$

Крос-валидационната функция от тоолбокса TOMCAT за NIPALS бе допълнена за алгоритмите SIMPLS, kernel and bidiagonalization .

### III.4.2. Метод на De Luca за избор на подходящ спектрална област

Основните стъпки на метода De Luca са:

1. Като първа стъпка се определя оптималният брой фактори ( $A$ ) за всеки от компонентите в сместа.
2. Втората стъпка е намирането на регресионните вектори за всеки компонент, с помощта на гореизброените PLS - алгоритми:

$$B = W (P^t W)^{-1} Q^t$$

Регресионните коефициенти за всеки компонент имат различни стойности при всяка дължина на вълната:

$$C = b_0 + b_1 \lambda_1 + b_2 \lambda_2 + \dots + b_n \lambda_n$$

където  $C$  е концентрацията на анализа,  $b$  регресионните коефициенти и  $\lambda$  дължините на вълните.

3. Намира се сумата от абсолютните стойности на регресионните коефициенти дава нов вектор, наречен крива на кумулативните коефициенти (B):

$$B_{\lambda i} = \sum_{i=1}^n |b_i|$$

4. Накрая се изчислява средната стойност на кумулативните коефициенти и така се получават стойността на т.нар. линия на отреза:

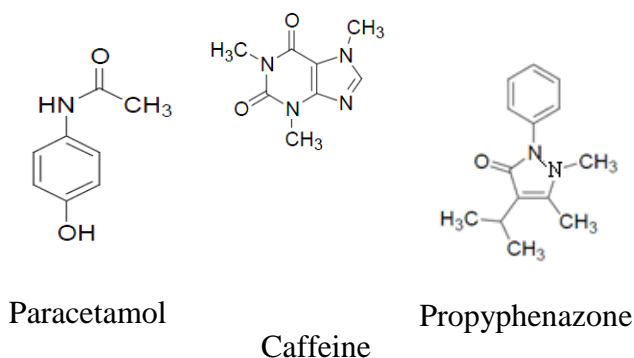
$$\bar{B} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n B_i$$

5. Подходящият диапазон от дължини на вълните включва точките на пресичане между стойността на линията на отреза ( $\bar{B}$ ) и кривата на кумулативните коефициенти (B).

### III.4.3. Експериментална част

#### Химикали и реактиви

Лекарствата (парацетамол, пропифеназон и кофеин), чиято структура е показана на фиг.19, с максимална чистота (> 99%), са закупени от Sigma-Aldrich. 100 мг/л стандартен разтвор от всяко лекарство се приготвя чрез разтваряне на 100 мг ( $\pm 0.0001$  г) от съответните чисти материали в двойно дестилирана вода в мерителна колба с обем 1.0 L. Поради слабата разтворимост на PAR и PRO във вода първоначалните разтвори се загряват слабо (50°C). Калибрационните смеси (22 разтвора) и валидационните смеси (12 разтвори) се приготвят директно от изходните разтвори чрез подходящо разреждане, като се използва дестилирана вода.



фиг.19. Структурни формули на лекарствата

#### Апарати и софтуер

Абсорбционните спектри са направени с помощта на diode array спектрофотометър UV-Vis HP8452A, като се използва кварцова кювета от 1.0 cm оптичен път. Спектрите на лекарствата са записани в диапазона от 190-300 nm и дигитализираните стойности на абсорбция бяха експортирани в MATLAB® за последващ 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.

### Избор на смеси за калибриране и валидиране

Има много стратегии за изграждане на набор за калибриране, който е необходим за провеждане на калибрационния модел.

Таблица 10. Състав на комплекти за калибриране и валидиране

Number	Calibration set (mg/L)			Validation set (mg/L)		
	Paracetamol	Propyphenazone	Caffeine	Paracetamol	Propyphenazone	Caffeine
1	4.0 (-1)	6.0 (0)	2.0 (0)	12.0	6.0	2.0
2	6.0 (0)	6.0 (0)	2.0 (0)	10.0	12.0	2.0
3	8.0 (1)	6.0 (0)	2.0 (0)	10.0	6.0	8.0
4	4.0 (-1)	6.0 (0)	2.0 (0)	10.0	6.0	16.0
5	8.0 (1)	0 (-2)	0 (-2)	0	0	8.0
6	10.0 (2)	4.0 (-1)	0 (-2)	8.0	6.0	1.6
7	10.0 (2)	6.0 (0)	2.0 (0)	6.0	4.8	1.6
8	10.0 (2)	8.0 (1)	4.0 (1)	6.0	4.0	0.8
9	10.0 (2)	10.0 (2)	8.0 (2)	8.0	4.8	1.6
10	0 (-2)	8.0 (1)	0 (-2)	0	4.8	1.6
11	10.0 (2)	6.0 (0)	1.0 (-1)	8.0	4.8	0
12	10.0 (2)	6.0 (0)	2.0 (0)	8.0	0	1.6
13	10.0 (2)	6.0 (0)	4.0 (1)			
14	10.0 (2)	6.0 (0)	0 (-2)			
15	0 (-2)	6.0 (0)	2.0 (0)			
16	10.0 (2)	0 (-2)	2.0 (0)			
17	0 (-2)	0 (-2)	2.0 (0)			
18	10.0 (2)	6.0 (0)	1.0 (-1)			
19	10.0 (2)	6.0 (0)	2.0 (0)			
20	8.0 (-1)	0 (-2)	0 (-2)			
21	0 (-2)	8.0 (1)	0 (-2)			
22	0 (-2)	0 (-2)	8.0 (2)			

- а. Пет нива пълен факториален дизайн според ортогоналния дизайн на Brereton. Стойностите в скоби са кодовете, необходими за изграждане на ортогонални смеси

Във фармацевтичния анализ често се използва пълен факторен дизайн. За нивата на концентрацията  $n$ , за разтворените  $k$  вещества, броят на калибриращите смеси  $I$ , които трябва да бъдат приготвени, е  $n^k$ .

Голямо намаление на броя на смесите се получава чрез прилагане на таблицата на Breretton. Предлага се за многостепенни многофакторни системи, като броят на смесите е  $I = n^2$ , а максималният брой анализирани разтворени вещества е  $I-1$ . В нашата работа беше използван петстепенния пълен факториален дизайн. Следвайки този дизайн, трябва да се приготвят 25 смеси и да се анализират до 24 разтвора. В тази работа са използвани 22 смеси и са приготвени съгласно нивата, дадени в Таблица 10. Както може да се види от Таблица 10, нивата на лекарствата бяха внимателно подбрани да бъдат сравними с тези, присъстващи в предлаганата на пазара форма (250 mg PAR-150 mg PRO-50 mg CAF за таблетка). За PAR и PRO избраните нива са 0, 4.0, 6.0, 8.0 и 10.0 mg / L, докато за CAF нивата са 0, 1, 2, 4 и 8 mg / L. За трите лекарства нивата на концентрация бяха кодирани като: -2 за по-ниската концентрация и +2 за по-високата концентрация. По принцип дизайнът показва, че нивата на лекарствата са ортогонални и обхващат големи разлики в нивата. Ортогоналната конструкция е необходима за изграждането на стабилен PLS модел. Бяха подготвени 12 валидационни смеси, за да се тества ефективността на моделите. За валидирането бяха създадени нови нива на концентрация за трите разтворени вещества и силата на прогнозиране на PLS модела беше тествана за нивата на лекарствата извън диапазоните, избрани в калибриращия набор. Бяха избрани 12.0 mg / L (за PAR и PRO) и 16.0 mg / L (за CAF) и тези нива са извън диапазона на калибриране.

#### **Анализ на таблетката**

Лекарствата бяха извлечени от таблетката SARIDON след проста процедура, като се претегля съдържанието на пет таблетки, и те се смилат до фин прах. Извличането с гореща вода е за предпочитане, както ще бъде показано по-нататък. Количество, точно отговарящо на средното тегло на таблетката, се суспендира във вода или гореща вода (50°C) и се долива до обем от 1000 ml. Крайната суспензия се обработва с ултразвук в продължение на 10 минути и след това се филтрува през PTFE 0.45  $\mu$ m мембранен филтър. Пробите се сканират след подходящо разреждане, като се използва спектрофотометър върху спектралния диапазон 190-300 nm.

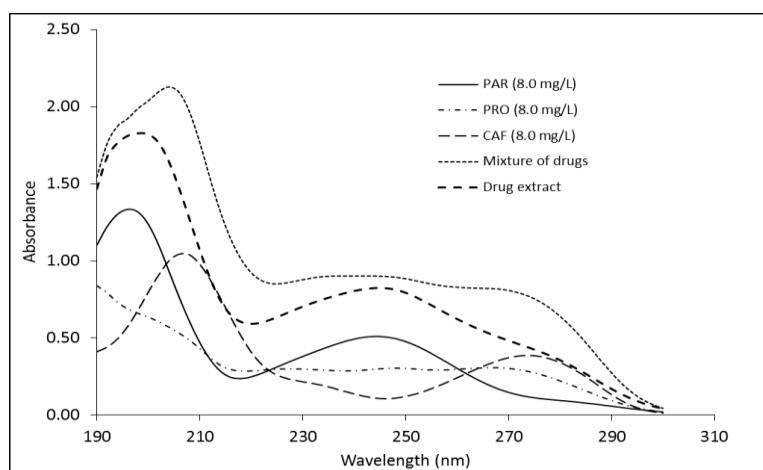
### **III.4.4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ**

#### **Спектрално припокриване**

UV Спектрите на трите лекарства заедно със спектъра на таблетката SARIDON са дадени на фиг.20, от която се вижда, че трите компонента поглъщат в областта 190-300 nm. PAR, както и CAF имат типични абсорбционни спектри с максимуми при дължини на вълните съответно при 244 и 274 nm. Абсорбционният спектър на PRO има три нискоинтензивни абсорбционни максимуми в диапазона 210-270 nm, които се дължат вероятно на присъствието на различни конформации на молекулата във воден разтвор. Спектрите на трите лекарствата са силно припокрити в изследваната област. Ето защо нетният аналитичен сигнал (NAS) е подходящ метод за характеризиране на

аналитичните характеристики и степента на спектрално припокриване, при използването на многовариационно калибриране с помощта на PLS. Проведеният анализ с помощта на NAS показва, че границите на откриване на PAR, PRO и CAF са съответно до 0.21, 0.37 и 0.15 mg/L. NAS изчисленията също така показват най-висока степен на спектрално припокриване за PRO със сигнали за останалите два компонента PAR и CAF (80% спектрално припокриване). PAR и CAF показват по-ниска степен на спектрално припокриване (71 и 55% съответно).

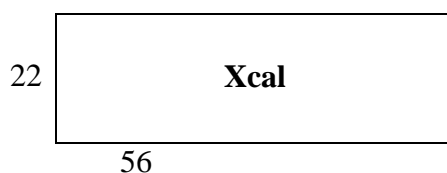
Абсорбционният спектър на сумата от трите компонента, съвпада с експерименталния спектър на сместа, което показва адитивност на отделните сигнали и линейността на текущата система. Съдържанието на трите лекарствени компонента в таблетката показват, че PAR е в доминиращо количество в сравнение с останалите два компонента (250 mg PAR, 150 mg PRO и 50 mg CAF). Този факт ясно се отразява върху формата на спектъра на таблетката (фактор на разреждане 1:25), чиято форма наподобява абсорбционния спектър на PAR, и служи за потвърждение, че извличането на лекарствените компоненти е ефективно във воден разтвор. Предполага се помощните вещества не влияят на процеса на извличане на активните компоненти.



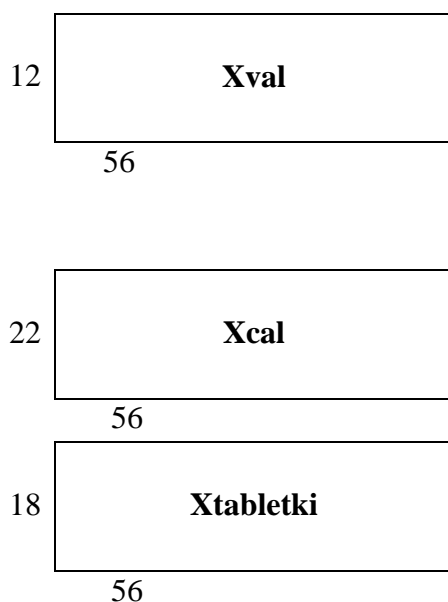
Фиг.20. Абсорбционни спектри на изследваната трикомпонентна лекарствена система

Всъщност едновременното определяне на трикомпонентната система не е възможно чрез класическите методи за калибриране, което се дължи на интензивно спектрално припокриване. Основният аналитичен проблем в настоящата система е както интензивното спектрално припокриване, така и евентуалното присъствие на помощните вещества, което също би повлияло на резултатите при анализа на твърдата лекарствена форма.

В това изследване са използвани следните работни матрици: матрица за калибриране (22 × 56), матрица за валидиране (12 × 56) и матрица на таблетките (18 × 56), показани на фиг.21.



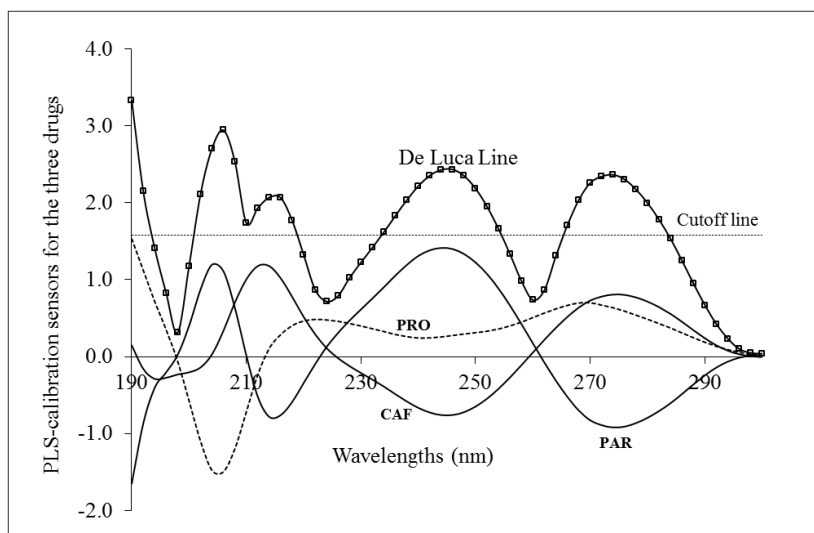




Фиг.21. Работни матрици за PLS-метода

### Избор на оптимални спектрални обхвати

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. Обикновено тази процедура се извършва преди калибрирането. Съществуват много процедури за подбор на тези информативни спектрални региони, които включват статистически анализ, свързан с външното валидиране, използването на генетичния алгоритми, използване на сканиращ променлив размер прозорец от дължини на вълните, както и наскоро предложената процедурата на De Luca. В последната процедура се сумират абсолютните стойности на регресионния вектор  $b$  (получен от PLS модела) за трите компонента, за да се намери кумулативния коефициент  $B$ . Следва определяне на друга важна линия, наречена линия на отреза. Тази линия е необходима за крайния избор на спектралните диапазони на изследваните лекарства. Методът на De Luca е илюстриран графично на фиг.22, като най-добрите спектрални диапазони, които биха били включени в калибрирането, са тези, разположени под линията De Luca и над линията на отреза. Както се вижда от графиката, най-добрите области за анализ на лекарства са следните: 202-220, 234-254 и 266-284 nm. Всъщност целта на линията на отреза е да помогне при избора и определянето на информативните спектрални диапазони.



Фиг.22. Графика De Luca, генериран от PLS-калибриране

Останалите региони, биха могли да се свържат с областите на спектрално припокриване между лекарствата (220-230 nm, 258-266 nm, както е показано на фиг.22. Първият регион (190-194 nm) може да не бъде използван, тъй като е близо до крайните възможности на спектрофотометъра. Още един интересен момент в процедурата е включването на максималните дължини на вълните на абсорбция на лекарства като 244 nm за PAR и 208/274 nm за CAF.

След проведената селекция на спектралните области се провежда PLS (NIPALS вариант) метода, за да се определи количеството на трите компонента във смесите за валидиране, като се използват избрани региони. Основните резултати са представени в таблица 11.

Таблица 11. Предсказване на лекарства в валидиращия сет, преди и след прилагане на процедурата на De Luca за избор на информативни спектрални региони.

	Spectral region (nm) 190-300 nm (56 points/spectrum) <sup>a</sup>			De Luca wavelength selection (31 points/spectrum) <sup>a</sup>		
	PAR	PRO	CAF	PAR	PRO	CAF
	PLS-NIPALS variables	8	10	7	8	6
REP% <sup>b</sup>	5.9	14.3	12.2	4.9	7.9	6.7
RMSEP <sup>b</sup>	0.45	0.78	0.40	0.37	0.67	0.39
Mean Recovery <sup>b</sup>	98.5	90.7	96.1	99.0	90.8	96.4

а. Въз основа на процедурата на De Luca оптималните спектрални области за лекарства са: 202-220, 234-254 и 266-284 nm (31 спектрални точки / проба).

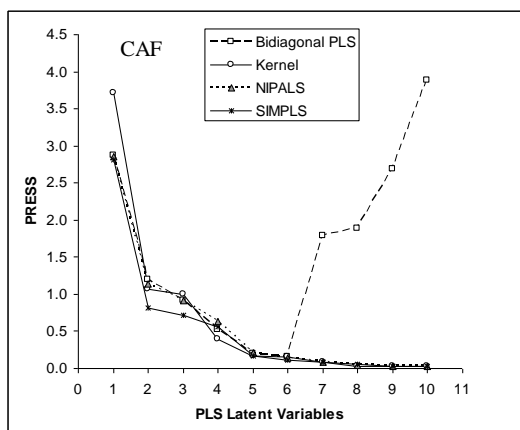
б. Статистически анализи бяха приложени за ненулевите концентрации на лекарствата. REP%: Относителна грешка при прогнозиране и RMSEP: Средно квадратична грешка на прогнозиране.

Прилагането на метода на De Luca с избор на информативните спектрални региони води до подобрени регресионни параметри на PLS метода. За PRO броят на PLS факторите е намален от 10 на 6. Освен това аналитичните характеристики на модела също са подобрени. Друг важен метод, който беше използван за намиране на оптимални спектрални диапазони, е bootstrap метода. При този метод се използва извадка чрез bootstrap подхода за оценка на стандартните грешки в PLS калибрационните вектори  $b$  (за всеки компонент) и от тези грешки се извършва оценка на всяка обяснителна променлива при моделиране на  $y$ . Обикновено 1000 пробни опита са достатъчни, за да се оцени стандартната грешка в  $b$ . От извадките за bootstrap (взети от  $X$  и  $y$ ) се изчисляват стандартните грешки на  $b_j$ ,  $j = 1, \dots, A$  ( $\sigma_{b_j}$ ) и се използват за изчисляване на стандартизираните коефициенти  $b_j / \sigma_{b_j}$ . Стандартизираният коефициент, по-голям от 1,96, се счита за важен при 0,05 ниво на значимост, което означава, че тази променлива е от съществено значение за моделирането на  $y$ . Процедурата bootstrap е повторена за всяко лекарство. Анализът bootstrap показва, че най-добрите спектрални области за PAR са 212-220, 230-252 и 258-282 nm. За PRO: 190, 194-196, 206, 212-228, 232-242, 248-280 nm. За CAF: 190, 194-198, 204-206, 212-228, 244-272 и 282-290 nm. За PAR, резултатите от De Luca са сравними с предсказаните от bootstrap метода. За другите две лекарства, обаче, бяха получени повече спектрални участъци чрез зареждане в сравнение с De Luca. Съответно, калибрирането с помощта на PLS-NIPALS се повтаря, като се използват регионите на bootstrap и оптималните PLS-променливи също се оценяват чрез метода на кръстосано валидиране.

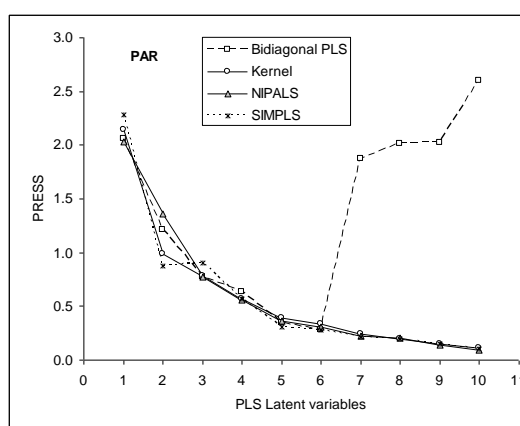
**Сравнение между PLS вариантите за количествено определяне на лекарства**  
MVC1 и TOMCAT са най-често използваните софтуерин пакети във фармацевтичния анализ. MVC1 използва само NIPALS, но в TOMCAT, освен NIPALS, съществуват допълнителни два варианта на алгоритъма SIMPLS: алгоритмите WIM-PLS и SIM-PLS. В литературата са налични девет PLS-алгоритми за обработка на различни видове данни, но приложението на Kernel и Bidiagonalization е доста ограничено.

Настоящата аналитична система беше анализирана с помощта на различни PLS-варианти и стратегията за оценка се основаваше на прогнозиращата способност на различните PLS-варианти. Моделът с най-малък брой фактори, както и най-добри характеристики е възможният избор. Другите два важни критерии, включващи компютърно време за изчисление и съхранение в паметта не бяха изследвани.

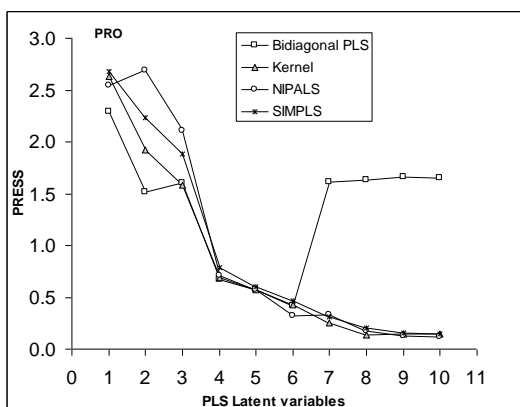
За всяко лекарство PLS-променливите, необходими за калибриране ( $A$ ), се оценяват чрез метода "leave-one-out". Последните PRESS-PLS променливи графики са показани на фигури 23а, 23б и 23в, а ефективността за предсказване на лекарството е обобщена в таблица 12.



Фигура 23а) PRESS-Latent променливи графики за различни PLS-варианти за CAF



Фигура 23б) PRESS-Latent променливи графики за различни PLS-варианти за PAR



Фигура 23в) PRESS-Latent променливи графики за различни PLS-варианти за PRO

Както може да се прецени типични графики с PRESS-латентни променливи са получени за всички варианти (с изключение на Bidiagonalization). Във всички случаи се наблюдава голямо намаление на PRESS при увеличаване броя на променливите. По принцип от 6 до 10 променливи са необходими във всички варианти, за да се моделират данните. Освен PLS-Bidiagonal, моделите демонстрират стабилно представяне при висок брой латентни променливи. Интересната точка и при трите графики на фиг.38 е резкия скок при PLS-Биадиагонализацията, при което PRESS внезапно се увеличава

при 7-та променливи и това е тенденция и при трите лекарства. Оптималният брой фактори, необходими за оптимално прогнозиране, е показан в Таблица 12.

Таблица 12. Предсказване аналитичните характеристики на компонентите във валидационния сет, с различни PLS варианти

PLS-variant <sup>a</sup>	A <sup>b</sup>	PAR			A	PRO			A	CAF		
		Mean recovery	REP%	RSD		Mean recovery	REP%	RSD		Mean recovery	REP%	RSD
NIPALS	8	99.0	4.9	3.4	6	90.8	7.9	2.9	7	96.4	6.7	4.0
SIMPLS	9	97.4	3.2	2.9	10	89.0	12.5	3.5	9	90.3	11.8	2.8
Kernel	9	97.2	3.3	2.8	8	95.5	5.4	2.5	9	96.4	5.5	2.7
Bidiagonal	6	99.7	1.6	1.1	6	82.0	16.2	6.5	6	109.8	13.7	8.5

Ефективността на PLS-вариантите е сравнима при предсказване на PAR с общ аналитичен добив от 97.2-99.7 и отлична REP% 1.6-4.9. Въпреки че моделът NIPALS използва за прогнозиране по-малко променливи (в сравнение със SIMPLS и Kernel), той се нуждае от по-дълго време за изчисление, особено за матрици X с голям брой променливи. За всички варианти се наблюдава най-лоши резултати за PRO и това се дължи на интензивно спектрално припокриване на това лекарство с други компоненти. Поради лошото прогнозиране за PRO (16,2%) и CAF (8,5%), PLS-Bidiag (вж. Фиг.38в) не е подходящ алгоритъм. PLS Kernel превъзхожда всички други варианти за прогнозиране на PAR, PRO и CAF, което показва, че този алгоритъм е най-подходящия за тази аналитична система. В сравнение с останалите варианти, PLS Kernel е известен също и с по-краткото си изчислително време.

#### Количествено определяне на компонентите в състава на SARIDON и сравнение с други методи

Приложимостта на PLS-вариантите освен за едновременен анализ на PAR-CAF-PRO в изкуствени смеси, беше допълнително тествана за твърди лекарствени форми SARIDON®.

В таблетките, помощните вещества присъстват заедно с лекарствения компонент, което може да повлияе отрицателно върху количественото определяне на лекарствата с помощта на PLS-регресия. Екстракционните експерименти показват, че дестилирана вода е ефективен екстрагент за трите лекарства. Така се избягва консумацията на скъпи и токсични органични разтворители. Освен това гореща вода (50° C) също бе тествана за екстракция на лекарства. Екстрактите бяха директно сканирани и получените спектри бяха анализирани чрез PLS калибриране. Тъй като беше установено, че PLS KERNEL е оптималният алгоритъм, той беше използван за количествено определяне на компонентите. Резултати са представени в таблица 13.

Таблица 13. Количествено определяне на компонентите в таблетка SARIDON® с помощта на Kernel-PLS

Extraction <sup>a</sup>	PAR			PRO			CAF		
	Content (mg/ tablet)	Rec % <sup>b</sup>	RSD <sup>b</sup>	Content (mg/ tablet)	Rec %	RSD	Content (mg/tablet)	Rec %	RSD
water extraction (25 °C)									
S1	239.3			127.8			44.0		
S2	229.8	93.8	1.7	137.5	86.7	6.1	34.3	80.2	10.4
S3	233.8			120.0			42.0		
S4	235.2			135.0			40.0		
	Hot water extraction (50 °C)								
S1	240.0			144.1			48.5		
S2	241.0	96.4	1.3	140.5	95.1	2.5	46.5	96.2	2.9
S3	237.5			139.0			48.5		
S4	245.0			146.8			49.3		

а. При всички екстракции 5,0 g таблетки SARIDON® се смилат и еквивалентна на една таблетка се екстрахира директно с вода. Екстрактът се центрофугира и накрая се филтрува през 0.45 цт филтър. Преди спектрален анализ се извършва разреждане 1:25 с дестилирана вода. Извършени са четири еднакви екстракции (п = 4).  
б. Аналитичния добив (RSD) се оценява спрямо обявените стойности (250 mg PAR, 150 mg PRO и 50 mg CAF), предоставени от производителя.

Аналитичното представяне на метода Kernel-PLS бе тествано по стандартна аналитична процедура, с цел оценка на точността и възпроизводимостта. Основните заключения са изведени от таблица13, а именно, че алгоритъмът Kernel-PLS е приложим за количествено определяне на Саридон. Основното предимство е, че анализа е прост за изпълнение, в сравнение с усложнени процедури каквито са екстракционно-спектрофотометричните или хроматографските. Екстракцията с гореща вода (50°C) дава по-добри резултати и това се дължи на повишената разтворимост на лекарствата при по-висока температура. Екстракция при по-високи температури не се препоръчва поради неочаквани влияния върху химическата структура на лекарствата; аналитичния добив  $\pm$  RSD (96.4 (1.3), 95.1 (2.5) и 96.2 (3.0) съответно за PAR, PRO и CAF) отразяват приложимостта на метода Kernel-PLS за количествено определяне на лекарства.

В литературата са предложени различни аналитични методи за количествено определяне на PAR-PRO-CAF в търговски фармацевтични лекарствени форми. Настоящият метод беше сравнен с публикуваните методи, както е обобщено в Таблица14.

Повечето от предложените методи използват или етанол или метанол за екстракция на компонентите, но също така може да се използват и вода като разтворител. За хроматографски методи основните етапи на приготвяне на екстракта са центрофугиране и филтриране. Като цяло, всички хроматографски процедури са ефикасни за количествено определяне на лекарства с приемлива точност и прецизност. Соронаг и сътр. използват мицеларна електрокинетична капилярна хроматография с детектиране на DAD, за количествено определяне на PAR, PRO и CAF в SARIDON® с много ниски граници на откриване 42, 194 и 74 ng/ml съответно. Лекарствата се

определят количествено с помощта на C18 колона с отлични добиви 97.2-102.3 и точност 0.5-1.1. Другите докладваните хроматографски методи също показват добри резултати при количествено определяне на търговски продукти, съдържащи PAR, PRO и CAF.

Както може да се види от Таблица14, хроматографските процедури показват по-добра прецизност в сравнение с многовариационните калибрационни методи. Все пак предимството на използваните хемометрични методи е, че те не използват пробоподготовка и дават сравними аналитични характеристики спрямо хроматографските методи. Въпреки че производната спектрофотометрия е използвана за анализ на PRO, CAF и PRO в търговската таблетка (Minoset®), общата точност изглежда спорна. Както е показано в Таблица14, PLS-NIPALS е най-възприетият алгоритъм за количествено определяне на лекарства в търговски продукти. Всъщност PLS-NIPALS е ефективен за анализ на изследваната система в различни търговски форми с оптимална точност и прецизност. Dinç и сътрудници са показали, че резултатите, получени чрез производна спектрофотометрия и течна хроматография за количествено определяне на PAR-CAF-PRO, са статистически сравними. De Luca и сътрудници са показали, че приложението на PLS NIPALS върху абсорбционните спектри дава добър аналитичен добив само за PAR, докато за PRO и CAF са получени задоволителни количества при използване на третата производна. Нашите резултати показват, че добивът може да бъде подобрен, особено за CAF, използвайки само абсорбционните спектри с помощта на Kernel-PLS алгоритъм. Освен това обявените граници на откриване, с помощта на метода Kernel-PLS са сравними с получените при хроматографски методи.

Таблица 14. Сравнение на аналитичните характеристики на Kernel-PLS с публикувани методи за количествено определяне на PAR-PRO-CAF в търговски фармацевтични продукти

Chromatographic methods							
Formulation (mg/tablet)	Extraction solvent	Matrix purification	Analytical technique	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	Spike Rec. (%)	RSD (%)	Ref.
Not provided PAR 250 PRO 150 CAF 50	Methanol	Centrifugation	HPLC-DAD	Not provided	PAR 100.2 PRO 99.8 CAF 99.3	PAR 0.2 PRO 0.2 CAF 0.2	121
Not provided PAR 250 PRO 150 CAF 50	Methanol	Centrifugation	HPLC-DAD	Not provided	PAR 102.4 PRO 97.5 CAF 99.6	PAR 1.4 PRO 1.2 CAF 0.8	122
Not provided PAR 250 PRO 150 CAF 50	Distilled water	Centrifugation and membrane filtration	Micellar electrokinetic capillary chromatography-MECK-DAD	PAR 0.6 CAF 0.8 PRO 0.8	PAR 100.3 PRO 99.9 CAF 100.0	PAR 0.2 PRO 0.2 CAF 0.4	123
SARIDON® PAR 250 PRO 150 CAF 50	Methanol	Filtration by pore-size filter paper (no centrifugation)	HPLC-UV (other related drugs were also detected)	PAR 0.042 PRO 0.194 CAF 0.074	97.2-102.3	0.5-1.1	119
Pararemin® PAR 250 PRO 150 CAF 50	Methanol	Filtration by pore-size filter paper (no centrifugation)	HPLC-UV (other related drugs were also detected)	PAR 0.042 PRO 0.194 CAF 0.074	97.9-101.1	1.8-2.6	119
Minoset® PAR 250 PRO 150 CAF 50	Methanol	Filtration and dilution	HPLC-UV	PAR 0.30 PRO 0.25 CAF 0.36	PAR 100.0 PRO 100.0 CAF 100.0	PAR 0.4 PRO 0.6 CAF 1.8	120



Таблица 14 (продължение)

Non-Chromatographic methods							
Minoset® PAR 250 PRO 150 CAF 50	0.1 M HCl	Filtration and dilution	Derivative UV- Spectrophotometry	PAR 0.29 PRO 0.35 CAF 0.10	PAR 99.8 PRO 100.1 CAF 99.0	PAR 0.3 PRO 0.5 CAF 1.6	120
Minoset plus® PAR 250 PRO 150 CAF 50	gastric juice solution	Shaking, and filtration by 0.20µm membrane filter	Multivariate calibration PLS-NIPALS	Not provided	PAR 100.0 PRO 99.9 CAF 101.6	PAR 0.7 PRO 1.2 CAF 2.7	124
NeoOptalidon® PAR 200 PRO 125 CAF 25	Ethanol	Sonication and filtration by 0.45µm membrane filter. Final extract diluted (1000 time) by distilled water	Multivariate calibration PLS-NIPALS (absorbance)	Not provided	PAR 105.1 PRO 105.5 CAF 126.9	PAR 3.75 PRO - CAF -	111
SARIDON® PAR 250 PRO 150 CAF 25	Ethanol	Sonication and filtration by 0.45µm membrane filter. Final extract diluted (1000 time) by distilled water	Multivariate calibration PLS-NIPALS (absorbance)	Not provided	PAR 103.1 PRO 106.6 CAF 129.5	PAR 3.75 PRO - CAF -	111
Veramon® PAR 200 PRO 285	Ethanol	Sonication and filtration by 0.45µm membrane filter. Final extract diluted (1000 time) by distilled water	Multivariate calibration PLS-NIPALS (absorbance)	Not provided	PAR 95.9 PRO 88.5	PAR 3.75 PRO -	111
SARIDON® PAR 250 PRO 150 CAF 50	Hot water (50 °C)	Shaking, centrifugation, and filtration by 0.45 µm membrane filter	Multivariate calibration PLS-Kernel (absorbance spectra)	PAR 0.21 PRO 0.37 CAF 0.15	PAR 96.4 PRO 95.1 CAF 96.2	PAR 1.3 PRO 2.5 CAF 2.9	This work

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основни заключения от настоящото изследване:

- Моделирането на спектрални матрици  $X$ , съдържащи много променливи, е оптимално като разход на компютърно време и надеждност, при използването на метода Kernel-PLS.
- Изборът на информативни спектрални области с помощта на метода на Де Лука подобрява параметрите на PLS регресионните алгоритми, който е в съгласие с метода bootstrap.
- Екстракцията на трикомпонентната лекарствена смес се извършва само с гореща вода, вместо използването на етанол или други токсични органични разтворители.
- Докладваните аналитични добиви  $\pm$  RSD [96.4 (1.3), 95.1 (2.5) и 96.2 (3.0) за PAR, PRO и CAF, съответно] доказват приложимостта на Kernel-PLS метод за количествено определяне на лекарства в търговски SARIDON®.

Предложеният многовариационен метод за калибриране е приложим за други лекарствени форми и в същото време е демонстрира отличните възможност за приложение на Kernel-PLS за фармацевтичния анализ.

### III.5. Методи за калибриране базирани на нетния аналитичен сигнал за анализ на трикомпонентна система, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин (NAP/CLS, HLA XS, HLA GO)

За голям брой подобни лекарствени системи са приложени NAS методите, които са показали значително по-добри резултати в сравнение с PLS. Поради факта, че се изследва трикомпонентна система, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин с различни PLS алгоритми си поставихме за цел да бъдат сравнени прогнозните възможности на различни NAS алгоритми базирани на нетния аналитичен сигнал (NAS) с класическия метод PLS. Селектирани бяха подходящи спектрални региони за всеки от компонентите, което значително подобрява аналитичните характеристики при калибрирането. Избрани бяха най-подходящите алгоритми за трите компонента на лекарствената форма Саридон.

#### III.5.1. Теория на използваните NAS алгоритми

Няколко алгоритма за калибриране са били развити на основа концепцията за NAS. Нетният аналитичен сигнал (NAS) за анализа  $k$  ( $r_k^*$ ) се дефинира като частта от неговия спектър, която е ортогонална на пространството образувано от спектрите на другите останали аналити и се дефинира с уравнението :

$$r_k^* = [I - R_{-k}(R_{-k})^+]r = P_{NAS,kr}$$

Където  $R$  е  $J \times J$  ортогонална проекционна матрица, която проектира дадения вектор върху  $P_{NAS,k}$  пространството,  $R_{-k}$  е спектъра на чистия нормализиран аналит  $k$ ,  $I$  е  $J \times J$  единична матрица  $R_{-k}$  е  $J \times I$  пространство образувано от спектрите на всички останали аналити с изключение на  $k$  ( $(R_{-k})^+$  е псевдообратна матрица на  $R_{-k}$ , обикновено се изчислява чрез SVD декомпозиция използвайки  $A$  фактори).

Съществуват няколко алтернативни подхода за изчисляване на матрицата  $R_{-k}$ . Първият подход е на Xu and Schechter, като при него всеки спектър от калибрационната матрица се разделя на неговата концентрация, с изключение на нулевите концентрации, след което се изчислява сумата от получените спектри по формула:

$$s_{cal} = \frac{1}{I'} \sum_{i=1}^{I'} \frac{r_{i,cal}}{c_{ik}}$$

Където  $I'$  е броя на калибрационната проба, за които  $c_{ik}$  е различна от 0.

Полученият усреднен спектър след това се изважда от спектралната матрица с помощта на операцията от уравнвние :

$$(R_{-k})_{i',j} = R_{i',j} / c_{ik} - s_{cal,j}^T$$

Калибрационните спектри със стойности  $c_{ik} = 0$  след това се добавят към матрицата, давайки желаната матрица  $R_{-k}$ . Векторът на нетната чувствителност (net sensitivity vector  $s_k^*$ ) се изчислява чрез проекция на  $s_{k,LS}$  върху NAS областта, с помощта на апроксимация по метода на най-малките квадрати по формула:

$$s_k^* = P_{NAS,k} \begin{bmatrix} R^T c_k \\ c_k^T c_k \end{bmatrix}$$

Концентрацията на  $k$  за неизвестната проба се получава от спектъра  $r$  с помощта на формулата:

$$c_{un,k} = \frac{s_k^T P_{NAS,k} r}{s_k^T P_{NAS,k} s_k} = \frac{s_k^T P_{NAS,k} P_{NAS,k} r}{s_k^T P_{NAS,k} s_k} = \frac{(s_k^*)^T r_k^*}{\|s_k^*\|^2}$$

което е основна стъпка при предсказване на методите, базирани на нетния аналитичен сигнал (NAS).

Друга алтернатива за изчисляване на матрицата е хибридният линеен анализ, т. нар. метод на Berger (HLA), при който изчисляването на  $R_{-k}$  става директно по формулата  $R - c_k s_k^T$ . Трябва да се отбележи, че HLA може да се приложи и дава много точни резултати, само когато спектърът на чистия компонент е наличен. При взаимодействие между компонентите или когато  $s_k$  е неизвестна, методът не може да се прилага.

Съществуват два други NAS подходи, които не изискват чистият спектър  $s_k$  да бъде известен, което е ограничение на HLA метода. Първият метод е представен от Goicoechea and Olivieri (HLA GO). Докато при метода на Xu and Schechter се използват всички фактори за предсказване, Оливиери предлага техния брой да се определя с помощта на крос-валидиране, по класическата процедура на Naaland Thomas. Това разширява използването на метода, дори когато броят на пробите надвишава препоръчания от една трета от броя на дължините на вълните. При HLA GO метода средната стойност на калибрационите нецентрирани спектри се получава първоначално по уравнение :

$$\bar{r}_{cal} = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I r_{i,cal}$$

И приносът на анализа  $k$  след това се изважда от спектралната матрица с помощта на операцията :

$$R_{-k} = R - \frac{c_k \bar{r}_{cal}^T}{\bar{c}_{k,cal}}$$

Където  $\bar{c}_{k,cal}$  е средната стойност на калибрационните концентрации на анализа  $k$ . Изчисляването на  $s_k^*$  става по уравнението :

$$c_{un,k} = \frac{s_k^T P_{NAS,k} r}{s_k^T P_{NAS,k} s_k} = \frac{s_k^T P_{NAS,k} P_{NAS,k} r}{s_k^T P_{NAS,k} s_k} = \frac{(s_k^*)^T r_k^*}{\|s_k^*\|^2}$$

Това е алгоритъма на метода HLA GO.

Последният възможен подход за намирането на вектора на нетната чувствителност (net sensitivity vector  $s_k^*$ ) и матрицата  $R_{-k}$  става с помощта на апроксимация по метода на най-малките квадрати на  $s_{k,LS}$  с помощта на уравнението:

$$R_{-k} = R - c_k s_{k,LS}$$

и  $s_k$  по формулата:

$$s_k^* = P_{NAS,k} \begin{bmatrix} R^T c_k \\ c_k^T c_k \end{bmatrix}$$

Този метод наречен NAP CLS се състои от следните стъпки: (1) препроцесинг на суровата изходна спектрална матрица  $R$  чрез проекция върху пространство, ортогонално на пространството на всички компоненти от сместа с изключение на анализа  $k$ , водещо до получаване матрицата на нетния аналитичен сигнал  $R_k^*$  и (2) и

регресия на тази матрица с концентрациите с помощта на класическата CLS процедура. Това е алгоритъма NAP/CLS.

Същевременно NAS подход може да бъде разширен и към останалите хеометрични техники, а именно за PCR и PLS методите.

### III.5.2. Аналитични характеристики при многовариационните методи за калибриране - NAS подход

Нетният аналитичен сигнал (NAS) е подходящ за охарактеризиране на аналитичните характеристики при многовариационното калибриране, и представянето им по начин, подобен на едномерното калибриране. С негова помощ се изчисляват важните характеристики на аналитичния метод като чувствителност SEN, селективност SEL, граница на определяне LOD, граница на количествено определяне LOQ. При класическото калибриране (CLS) изчисляването им става с помощта на нетния вектор на чувствителността, който се дефинира като:  $sk^* = [I - S_{-k} S_{-k}^+ ] s_k$ , където  $S$  е матрицата, включваща приносът от чувствителността на останалите компоненти, освен търсения,  $sk$  е векторът на чувствителността на анализа, а  $s_k^*$  е изчислената нетна част от пространството на  $k$ -тия компонент, ортогонална на останалите компоненти. Най-добрият възможен кандидат се явява чистия спектър на определяния аналит  $s_k$ . Чувствителността показва в каква степен аналитичният отговор, дължащ се на анализа варира като функция от концентрацията и е  $SEN = \|s_k^*\|$ . Селективността е мярка за степента на спектрално припокриване и се изчислява по уравнението:  $\|s_k^*\| / \|s_k\|$  [24]. LOD е минималното детектируемо количество от анализа к се дава с формулата  $3 \|\varepsilon\| / \|s_k^*\|$ . LOQ се дефинира с формулата  $10 \|\varepsilon\| / \|s_k^*\|$  [11]. В горните уравнения,  $\|\varepsilon\|$  представлява инструменталния шум, който се изчислява с помощта на 5 спектъра на празната проба в интервала 190-300 nm. Следва изчисляване на нормата на празната проба ( $\|NAS_{blank}\|$ ), и  $\|\varepsilon\|$  се изчислява като стандартно отклонение на изчислените норми. Друг аналитичен параметър, полезен при сравнение на различни методи е аналитичната чувствителност  $\gamma$ :

$$\gamma = \frac{SEN}{\|\varepsilon\|}$$

При инверсното калибриране (ILS, PCR, PLS) изчисляването на чувствителността и другите характеристики става с помощта на концепцията на Bro, при която се използва регресионния вектор.

### Moving window стратегия за избор на подходящ спектрален обхват

Селекцията на подходящите спектрални региони беше проведена отново с концепцията за NAS. Стратегията на придвижващия се прозорец (moving window strategy) беше приложена върху калибрационния сет, използвайки ширина от 5 nm, с цел намиране на информативна област от дължини на вълните, която беше определена по минимума на PRESS.

### Избор на смеси за калибриране и валидиране

Беше използван същият петстепенен пълен факториален дизайн с 22 смеси за калибриране, дадени в раздел III.4.3, Таблица 10. Ефективността на използваните алгоритми бе тествана чрез външно валидиране с помощта на 7 смеси за калибриране. Концентрационните нива в смесите за валидиране бяха избрани да бъдат в диапазона на концентрационните нива на калибриране.

**III.5.3. Експериментална част** - Описана е в в раздела Експериментална част III.4.3.

### III.5.4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

#### Спектрално припокриване

UV спектрите на трите компонента PAR PRO CAF заедно със спектъра на таблетката SARIDON са дадени в раздел III.4.4 на фиг.20, от която се вижда, че трите компонента поглъщат в областта 190-300 nm. Спектрите на трите компонента са силно припокривани в изследваната област.

В това изследване са използвани следните работни матрици: матрица за калибриране (22 × 56), матрица за валидиране (7 × 56) и матрица на таблетките (18 × 56), аналогично на показаните на фиг.21.

#### Избор на оптимални спектрални обхвати

Резултатите от методите за калибриране с нетния аналитичен сигнал значително се подобряват, ако калибрирането се извършва в определени спектрални обхвати, вместо да се използва целия спектър. На таблица 15 са представени резултатите от прилагането на NAP CLS ,HLA GO , HLA XS и PLS1 методи за калибриране преди и след спектрална селекция. Тя е извършена чрез прилагането на moving window стратегията върху абсорбционните спектри, с цел намиране най-информативните спектрални региони. Вижда се , че преди селекцията броят на факторите е значително по-нисък при NAS методите в сравнение с PLS. Стойностите на RMSEP и REP са по-ниски за PAR и PRO при NAS методите в сравнение с PLS, докато при CAF стойностите на RMSEP , REP са с приблизително еднакви с тези получени от PLS метода. Стойностите на отреза и наклона имат незадоволителни стойности за PRO.

Таблица15. Параметри за калибриране и валидиране и аналитични характеристики на DOX и PYR с помощта на методите NAP CLS ,HLA GO , HLA XS и PLS1

Component	Statistical parameters	Multivariate methods			
		NAP CLS		HLA GO	
	Sensor range	190-300	250-268	190-300	250-268

PAR	Factors	4	2	4	2
	RMSEP	0.1921	0.1636	0.2271	0.1550
	REP	2.52	2.14	2.97	2.03
	R <sup>2</sup>	0.9968	0.9977	0.9956	0.9979
	Slope	1.0504	0.9786	1.0603	0.9753
	Intersept	-0.2476	0.1850	-0.3007	0.1507
	Recovery(RSD)	101.82(1.04)	100.28(2.25)	102.20(0.88)	100.08(2.02)
		HLA XS		PLS	
	Sensor range	190-300	250-268	190-300	250-268
	Factors	4	2	8	3
	RMSEP	0.1625	0.1952	0.3160	0.1512
	REP	2.13	2.56	4.14	1.98
	R <sup>2</sup>	0.9977	0.9968	0.9916	0.9981
	Slope	1.0113	0.9827	0.9597	0.9701
	Intersept	-0.0651	0.2143	-0.0056	0.2172
	Recovery(RSD)	100.93(2.14)	101.14(2.51)	95.77(1.75)	99.80(1.78)
	PRO		NAP CLS		HLA GO
Sensor range		190-300	230-248	190-300	210-278
Factors		6	2	7	5
RMSEP		0.4822	0.2084	0.5203	0.4236
REP		8.84	3.82	9.54	7.77
R <sup>2</sup>		0.9453	0.9898	0.9363	0.9578
Slope		0.9211	0.9381	0.8667	0.9162
Intersept		-0.1249	0.0561	0.1110	0.6046
Recovery(RSD)		90.02(3.19)	95.60(1.28)	89.02(4.78)	104.42(7.69)
		HLA XS		PLS1	
Sensor range		190-300	240-268	190-300	210-278
Factors		9	2	10	6
RMSEP		0.5150	0.1729	0.7082	0.2609
REP		9.44	3.17	12.98	4.78
R <sup>2</sup>		0.9376	0.9930	0.8819	0.9839
Slope		0.8827	0.9737	0.7004	0.9110
Intersept		0.1173	0.1076	0.9740	0.1497
Recovery(RSD)	89.75(9.34)	102.13(1.95)	90.08(8.60)	95.73(3.79)	
	NAP CLS		HLA GO		

CAF	Sensor range	190-300	220-278	190-300	210-258
	Factors	6	5	6	5
	RMSEP	0.1467	0.0353	0.1471	0.0954
	REP	4.42	1.01	4.43	2.87
	R <sup>2</sup>	0.8597	0.9927	0.8592	0.9407
	Slope	0.9309	0.9288	0.9282	1.0277
	Intersept	0.0117	0.0346	0.0272	0.1054
	Recovery(RSD)	93.93(8.20)	99.96(3.32)	94.69(8.75)	93.86(4.21)
		HLA XS		PLS1	
	Sensor range	190-300	210-258	190-300	210-258
	Factors	6	5	7	5
	RMSEP	0.1674	0.0608	0.1289	0.0441
	REP	5.04	1.83	3.89	1.33
	R <sup>2</sup>	0.8176	0.9759	0.8917	0.9873
	Slope	1.0823	0.9542	0.9205	0.9288
	Intersept	-0.2713	0.1312	0.0385	0.0346
Recovery(RSD)	88.93(8.41)	99.57(4.36)	94.91(7.13)	102.02(3.94)	

След селекция дължини на вълните броят на факторите чувствително намалява. Стойностите на RMSEP чувствително намаляват, като особено голямо е намалението при PRO и при CAF.

Новите стойности на RMSEP и REP са приблизително еднакви, а в някои случаи и по-добри при NAS методите за калибриране в сравнение с PLS. При PRO и CAF RMSEP и REP са значително понижени след селекцията и са дори по-ниски в сравнение с PLS метода. При PRO най-ниска стойност имаме при HLA XS, докато при CAF най-ниска стойност имаме при NAP CLS. Прави впечатление, че стойностите на RMSEP и REP са най-ниски за CAF, в сравнение с останалите два компонента. Стойностите на отреза и наклона са подобрени за ПРО.

Като общ извод от прилагането на тези методи за калибриране - най-добър модел за PAR е HLA GO, най-добър модел за PRO е HLA XS, и най-добър модел за CAF е NAP CLS.

#### **Аналитични характеристики на използваните методи**

Нетният сигнал (NAS) е използван за намирането на чувствителност SEN, селективност SEL, граница на определяне LOD, граница на количествено определяне LOQ, които са представени на таблица 16.



NAP CLS ,HLA GO , HLA XS и PLS1 методи за калибриране преди и след спектрална селекция.

Таблица 16. Аналитични характеристики за PAR, PRO, CAF, получени с помощта на NAP CLS, HLA GO и PLS1, преди и след спектрална селекция .

Figure of merit	NAP CLS		HLA GO		HLA XS		PLS1	
<b>PAR</b>								
Spectral range	190-300	250-268	190-300	250-268	190-300	250-268	190-300	250-268
A(Factors)	4	2	4	2	4	2	8	3
SEL	0.13	0.012	0.14	0.012	0.13	0.012	0.074	0.013
SEN	0.064	0.0022	0.066	0.0022	0.065	0.0022	0.036	0.0023
ASensitivity	8.6	6.6	8.6	7.8	8.4	6.1	12	6.8
LOD	0.35		0.35		0.36		0.33	0.41
<b>PRO</b>								
Spectral range	190-300	230-248	190-300	210-278	190-300	240-268	190-300	210-278
A(Factors)	6	2	7	2	9	5	10	6
SEL	0.05	0.02	0.041	0.017	0.033	0.012	0.03	0.016
SEN	0.024	0.0043	0.019	0.0042	0.016	0.0044	0.014	0.0063
ASensitivity	8	20	6.9	6.4	6.8	3.4	5.8	4.7
LOD	0.39		0.46		0.46		0.30	0.36
<b>CAF</b>								
Spectral range	190-300	220-278	190-300	210-258	190-300	210-258	190-300	210-258
A(Factors)	6	5	6	5	6	5	7	5
SEL	0.15	0.03	0.15	0.04	0.17	0.035	0.16	0.06
SEN	0.063	0.0079	0.064	0.012	0.069	0.01	0.066	0.018
ASensitivity	21	17	20	9.1	22	7.7	22	11
LOD	0.14		0.15		0.14		0.13	0.099

### Количествено определяне на компонентите в състава на Саридон

Приложимостта на NAS-вариантите освен за едновременен анализ на PAR-CAF-PRO в изкуствени смеси, беше допълнително тествана за твърди лекарствени форми SARIDON®. Резултатите са представени на таблица 17.

Table 17. Аналитичен добив, получен за таблетки Саридон с помощта на NAP CLS,HLA XS,HLA GO и PLS.

Method	Drug	A	Wav range	Recovery(RSD)
NAPCLS	PAR	4	190-300	98.41(2.49)
		2	250-268	98.98(3.13)

	PRO	6	190-300	88.49(1.29)
		2	230-248	103.94(0.99)
	CAF	6	190-300	89.44(2.32)
		4	250-298	94.70(2.73)
HLA XS	PAR	4	190-300	95.53(2.15)
		2	250-268	99.54(3.09)
	PRO	4	190-300	95.53(2.15)
		2	250-268	99.54(3.09)
	CAF	6	190-300	75.89(1.37)
		4	220-298	99.14(3.59)
HLA GO	PAR	4	190-300	98.90(2.41)
		2	250-268	99.14(3.12)
	PRO	7	190-300	84.96(2.35)
		7	210-288	87.16(0.74)
	CAF	6	190-300	88.51(2.03)
		4	270-298	93.61(2.85)
PLS	PAR	8	190-300	92.52(2.36)
		3	250-268	98.71(3.12)
	PRO	10	190-300	88.57(1.19)
		6	210-278	104.92(0.72)
	CAF	7	190-300	96.43(2.43)
		6	260-288	96.43(2.43)

Вижда се , че и тук броят на факторите е значително по-нисък при NAS методите в сравнение с PLS. При трите компонента на таблетката Саридон добивите са значително повишени след селекцията на дължините на вълните.

### Заклучение

NAS моделите показват по-добри характеристики в сравнение с PLS1. За PAR най-добрия модел е HLA GO, за PRO най-добрия модел е HLA XS and за CAF най-добрия модел е NAP CLS.

### Реализиране на графични методи за калибриране

Те са проведени с помощта на програмни кодове за реализиране на описаните графични алгоритми (DR,RS,MCR) . В тях последователно се формират калибрационните и валидационните проби , селекцията на дължините на вълните , изборът на подходящи делители , диференцирането, изваждането или центрирането на спектрите. Кодовете позволяват бърза оптимизация и визуализиране на резултатите от анализа.

### Реализиране на хеометричните методи за калибриране

Многовариационните статистически (PLS1, PLS2) оптимизационни (MCR-ALS) методи за калибриране са проведени с помощта на предложената от нас блок-схема за последователно прилагане на PLS2, PLS1 и MCR-ALS алгоритмите. В първия скрипт става формирането на калибрационните и валидационните матрици, както и селекцията на дължините на вълните и се провежда PLS2 изчисленията, след което става обработване с PLS1 и MCR-ALS алгоритмите. Тези изчисления могат да бъдат проведени както в интерактивен режим с помощта на наличните тоолбоксове и GUI, така и с използването на конкретни m-функции. Така времето за изчисленията се редуцира до 30 минути след измерване на абсорбционните спектри на стандартните разтвори на изходните компоненти. Изполвани са както готови функции от указаните тоолбоксове (MVC1, TOMCAT, MCR ALS), така и собствени модифицирани кодове. Методите за калибриране, базирани на нетния аналитичен сигнал NAP CLS, HLA XS, HLA GO са проведени както с помощта на тоолбкс MVC1, така и собствени модифицирани кодове.

#### IV.ОСНОВНИ ПРИНОСИ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

Основните приноси на дисертационния труд могат да се обобщят така:

1. Разработен е нов спектрофотометричен производен метод за анализ на пилокарпин в лекарствена смес в присъствие на носител – ацетофталат 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 (PLS1,PLS2,PRM), оптимизационни (MCR ALS,MCR ALS) и графични методи за калибриране (MCR,DR,RSM).
3. Сравнени са четири PLS алгоритми (NIPALS,SIMPLS,Kernel, Bidiag) за анализ на трикомпонентна лекарствена форма, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин .Установено 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 NAP CLS, HLA XS, HLA GO с PLS алгоритъм за анализ на трикомпонентна лекарствена форма, съдържаща парацетамол, пропифеназон и кофеин. Установено 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 методи за калибриране – PLS2, PLS1 и MCR-ALS. Общото време за подготовката на данните и изчисленията е в рамките на 30 минути.
7. Реализирани с програмни кодове за графичните методи за обработка на спектралното отношение и на производната спектроскопия (DR,MCR,RSM) и са приложени за анализ на двукомпонентна лекарствена форма, съдържаща доксиламин и пиридоксин.

**Списък на публикациите във връзка с дисертационния труд**

1. Kassarova, M., Gergov, G., Dimitrova E. Drug delivery dispersion of pilocarpine hydrochloride. Technological and analytical investigation. Pharmacia, LI, 3-4, 2004, 9-13.
2. Gergov, G, Alin, A., Doychinova, M., De Luca, M., Simeonov, V., Al-Degs, Y. Assessment of different PLS algorithms for quantification of three spectrally overlapping drugs. Bulgarian Chemical Communications, Volume 49, (2), 2017, 410 – 421.
3. Katsarov, P. D. , Pilicheva, B. A. , Uzunova, Y. I. , Gergov, G. H., Kassarova M. I. Doxylamine/pyridoxine loaded chitosan microspheres as potential nasal drug delivery systems. Bulgarian Chemical Communications, Volume 49, Special Edition B, 2017, 96 – 102.
4. Katsarov P., Gergov, G., Alin, A, De Luca, M, Simeonov, V., Al-Degs, Y. Advanced chemometric methods for resolving binary mixture of doxylamine succinate and pyridoxine hydrochlorid. Acta pharmaceutica. (Submitted)
5. Gergov, G., Alin, A. , Katsarov, P. , Simeonov, V. , Al-Degs, Y. Net analyte signal-based methods for the simultaneous determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine by UV spectrophotometry. Bulgarian Chemical Communications (Submitted)

**Участия на конгреси във връзка с дисертационния труд**

1. Georgi Gergov, Pavel Simeonov. Simultaneous determination of paracetamol, propyphenazone and caffeine in pharmaceutical formulation. Comparison of prediction ability of PCR and PLS using original and derivative spectra. V конгрес по фармация с международно участие, 1-3 април, 2011, Хисаря.- постер
2. Georgi Gergov, Stefan Platikanov, Michele De Luka , Yahya Salem Al-Degs, Vasil Simeonov. Application of chemometric methods for resolving complex drug mixtures. 7th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 10-15 September 2015, Golden Sands, Bulgaria.