



РЕПУБЛИКА СЕВЕРНА МАКЕДОНИЈА
УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВОСКОПЈЕ
УНИВЕРЗИТЕТСКА ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ
СТУДИИ

Број:
Датум: __.20__ година
Скопје

ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ
СТУДЕНТСКИ ПРАШАЊА 2

До
Фармацевтски факултет во Скопје
Совет на студиската програма по фармација

ПРИЈАВА

за учество на годишна конференција во VI (шести) семестар во академска 2021/2022 година

Студент	Блерта Пајазити
Број на индекс	37/др
Ментор	Проф.д-р. Руменка Петковска
Студиска програма	Трет циклус докторски студии од областа фармација
Студиска подпрограма	
Поле на истражување	фармација
Тема	Chemometrics approach for optimization of capillary electrophoretic conditions for the separation of insulin analogues
Година на запишување на докторски студии	2015/16
Број на остварени кредити	
Забелешка	

Скопје, 05.11.2021 година.

Студент

Ментор

Faculty of Pharmacy¹, Ss. Cyril and Methodius University in Skopje, North Macedonia; Department of Inorganic and Analytical Chemistry², Medical and Health Science Centre, University of Debrecen, Hungary; Department of Pharmacy³, Faculty of Medicine, University of Prishtina "Hasan Prishtina", Prishtina, Kosovo

Chemometrics approach for optimization of capillary electrophoretic conditions for the separation of insulin analogues

B. PAJAZITI^{1,3}, M. ANDRASI², D. NEBIJA^{3*}, L. ANASTASOVA, R. PETKOVSKA¹

Received July 22, 2021, accepted August 21, 2021

*Corresponding author: Dashnor Nebija, University of Prishtina "Hasan Prishtina", Faculty of Medicine, Department of Pharmacy, 10000 Prishtina, Kosovo
dashnor.nebija@uni-pr.edu

Pharmazie 76 (2021)

doi: 10.1691/ph.2021.1758

Six insulin analogues with high degree of chemical similarity were separated using Capillary Electrophoresis (CE). In order to improve the method performance, optimization and development the Design of Experiment (DoE) approach has been used and this strategy provided related statistical models. This methodology delivered the information regarding the influence of main factors in the method development and explained the interaction of relevant factors in terms of shortening the analysis time. The response surface methodology (RSM) design employing Central Composite Face Centered (CCF) Design analyzed the effect of the most influencing factors, including background electrolyte pH and concentration, applied voltage and temperature. This study demonstrated that the approach of analyzing the influence of each parameter in the migration behavior of analyzed peptides was capable to assess the best electrophoretic conditions for the separation of insulin analogues.

1. Introduction

The analysis on human insulin and its analogues has been usually performed using numerous analytical methodologies and these peptides has been analyzed in different matrices, including determination of insulin in body fluids for clinical and forensic purposes, and the analysis in pharmaceutical formulations for quality control purposes (Thevis et al. 2005). In order to analyze complex rDNA derived products, such as insulin and its analogues, various analytical methodologies, including immunochemical methods (Webster et al. 1990; Simmons et al. 2019) and chromatographic methods, such as HPLC were used. Owing its performance HPLC has been commonly used as a method of choice for the quality control purposes of pharmaceutical formulations containing insulin and its analogues (Khaksa et al. 1998; Sawicka et al. 2006). In addition, HPCL has been applied as a standard pharmacopeia method for the quality determination of insulin and its related substances and it is routinely used in the quality control setting. Nevertheless, the common application of HPLC in this field potentially leads to substantial contamination of environment with organic solvents (Altria et al. 2006).

On the other hand, CE has already matured as a suitable method for determination of therapeutic peptides and proteins. This methodology is particularly important due to many advantages such as high sensitivity, selectivity, low sample consumption, low amount of buffers needed, shorter analysis time and high resolution (Kunkel et al. 1997; Yomota et al. 1997). These advantages make CE very suitable method for quality control of biological medicines, particularly for qualitative and quantitative analysis of peptide drugs, assessment of their purity and related substances, chiral analysis and the determination of enantiomeric purity (Watson 2007). Nevertheless, as an analytical technique, CE has several limitations, for instance in comparison to HPCL, it demonstrates lower sensitivity and more parameters require optimization, it has lower robustness and reproducibility. These disadvantages primarily are caused from the adsorption of charged species to the capillary wall and the presence of Joule heating creating variances in the electroosmotic flow. These disadvantages might be very

important in pharmaceutical industry setting where method development, and optimization including its performance are critical issues (Harris 2010).

To improve the separation process, CE coupled with chemometric optimization can provide a complete profile of separation, offering the useful information of factors influencing the separation as well as their interactions. The principle of DoE is arrangement of the experiments at changed combination of factors with the purpose of gaining the maximum information with minimal runs. This process is arranged by changing all the applicable factors simultaneously, according to a planned set of experiments which determine the effect of each factor and their significance (Aboul-Megied and Abdel-Megied 2019; Orlandini et al. 2014; Harnisch et al. 2018). In order to overcome aforementioned drawbacks of CE, different modelling techniques have been developed with the aim to improve method development and optimization. Since for the development of a CE method more parameters are required to be optimized, the use of conventional technique (one-factor at a time) has proved to be time consuming, and after finishing such experiments the data do not represent the combined effect of many factors. The DoE approach helps to better understand the interactions between different factors is possible and the analysis of smaller number of data is required, which helps the process of method optimization and constructions of statistical models. The optimization and analysis of response of multivariate systems could be determined by RSM (Dutta and Basu 2011). CE permits numerous of these factors to be varied within a programmed sequence. Thereby the instrument can be programmed to use different background electrolytes operating at various voltages and temperatures. These automated services make the procedure of experimental designs in CE method optimization particularly attractive (Riggs et al. 2001). Literature data revealed that for the optimization of a chiral separation of anti-Alzheimer and antifungal drugs by CE full factorial experimental design has been employed (Abdel-Megied et al. 2018). In this study, the influence of two parameters (buffer pH and concentration of cyclodextrins) was studied. The "main effect" of variation of each parameter was calculated for electrophoretic resolution for each drug. In other study, reported in the reference

Table 1: Literature references of CCD designs with CE methods

Studied analytes	Influencing factors	Number of experiments	Software used	References
DL-alanine, DL-aspartic acid, DL-glutamic acid, glycine, γ -amino-n-butyric acid (GABA)	Buffer conc., SDS conc., voltage	19 experiments	Mokle 5.0 and Codex program	(Wan et al. 2001)
sodium salt of Pentosan Polysulfate	Injection pressure, injection time, voltage	20 experiments	Minitab Inc. Release	(Prochazka et al. 2003)
d,l-tryptophan-methylester hydrochloride (TrMe), d,l-tyrosine-methylester hydrochloride (TyMe) and methyl- β -cyclodextrin (Me-CD)	Cyclodextrin concentration, crown-ether concentration and buffer concentration	15 experiments	Nemrod software	(Elek et al. 2005)
zofenopril calcium (ZOF) and hydrochlorothiazide (HCT) in presence of two major impurities	pH, buffer concentration, voltage	20 experiments	Design-Expert® Software	(Fayed et al. 2018)
chondroitin sulfate, dermatan sulfate, and hyaluronic acid	Buffer concentration, pH, applied voltage	20 experiments	MATLAB	(Chindaphan et al. 2019)
lansoprazole and rabeprazole	CD concentration, voltage, temperature	20 experiments	Design Expert 7.0	(Papp et al. 2019)

(Mamani et al. 2006) for the optimization of a CZE method for determination of tetracyclines, a fractional factorial design approach has been employed. The estimated factors were pH, temperature and sodium carbonate concentration. As noted in the Table 1, the response surfaces are appropriate to be used for the optimization of the CE method development and optimization. This approach implies that the most influencing factors affecting the performance of the technique are recognized. Design methodologies of this type offer a graphical illustration of the data over the planned ranges, and they can be used to choose the optimal performance of the method. Response surfaces can be obtained by employing various designs such as central composites and Box-Behnken design. In Table 1 literature review information using the aforementioned design approaches in CE is presented. Plackett-Burman experimental design was used for method optimization and robustness for the enantioseparation of dexmedetomidine and separation of mizolastine and its related impurities (Krait and Scriba 2018; Orlandini et al. 2007). The structural variations of insulin analogues consist in small variation in the amino acid sequence, consequently the CE separation of insulin analogues represents challenging task. At the best of our knowledge, currently no papers address the application of this methodology for the optimization of CE method for the determination of insulin and its analogues. Hence, in this work, we present an investigation of the principal factors affecting migration behavior of insulin and its analogues. Application of response surface methodology for the optimization of a CE method with the aim to improve the separation of peptides with high degree of chemical similarity was used.

2. Investigations, results and discussion

Capillary Zone Electrophoresis (CZE) which is known as a simple and fast technique was employed for the separation of insulin and its analogues. Applying CZE method the migration times were influenced by several factors, which were analyzed with a RSM design called CCF Design. For each product a list of experiments, was performed and the selected factors were changed simultaneously.

The analysis for six insulin analogues was performed using this experimental design. Upon the completion of CE experiments ran in different conditions, the migration time for each drug has been calculated, and the influence of these factors on the migration behavior was studied.

As depicted in Fig. 1, using the coefficient plot the coefficients related to scaled and centered variables were analyzed. As seen from the plot, one factor varies from 0 to 1, in coded unit, while the other factors were kept in averages to investigate the change of response. In all cases the factor with most influence was the voltage; the voltage increase was inversely related to the migration time. The voltage influence was more significant than any other factor, or the combination of the factors (pH and BGE concentration, pH and voltage or BGE concentration and voltage). This can be explained by the fact that the increasing of voltage in CE results a higher field strength, which causes increase of Electro Osmotic Flow (EOF). Consequently, the migration time of analytes will decrease and their electrophoretic mobility will increase. Other influencing factor is pH of BGE, which also has an important effect on the separation time. Changes of the buffer pH affect separation by modifying the charge of the analyte and by changing the

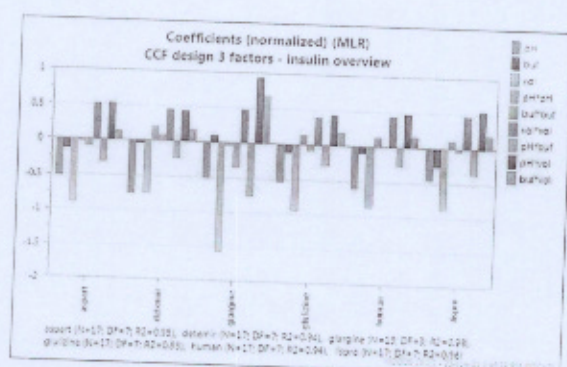


Fig. 1: Coefficient plot of the selected factors (separated and combination of factors) influencing the migration behavior of six insulin analogues. pH = pH of BGE, buf = concentration of BGE, vol = voltage applied

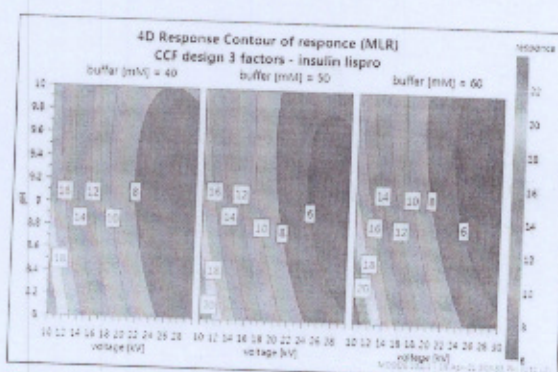


Fig. 2: Response surface plots for insulin lispro. Buffer strength has been kept between 40 mM and 60 mM.

electroosmotic flow. These findings suggest that the pH variation appears to be the most effective method of controlling a CE separation and consequently analysis time.

The contour diagrams of response are shown in Fig. 2 where buffer concentration as the factor with the lowest and non-significant influence in response was kept as a fixed value. From the coefficient plots of each insulin analogue, it was assumed that the most influencing and significant factors were the applied voltage and pH of the buffer.

According to the contour diagrams the migration behaviors of each insulin analogue is very similar due to their high degree of chemical similarity. The applied voltage in the electrophoretic system is the factor with the most significant influence in the response. The voltage increase is inversely related to the migration time. Similar effect was noted for the pH of the buffer.

Using the diagrams above, it is possible to find the optimal range of the most influential factors including pH and buffer concentration, in terms of analysis time reduction. Considering that, using CE for determining proteins and peptides a long condition time is needed to remove the adsorbed molecules in capillary wall, the proper analysis for this determination would need 8-10 min. Depending of each insulin analogue, the optimal range of selected factors to achieve these preferred analysis time would be: applied voltage 20-25 kV, the buffer pH: 8.5-9.5 for the buffer concentration 40 mM ammonium acetate.

In Fig. 3, the observed vs. predicted plot for insulin lispro is presented. It displays the observed *versus* predicted values of the response. This is additional proof of the good model where the points fall on the 1:1 line very closely.

In Fig. 4, the representative electropherogram of each insulin analogue in the chosen range for optimal conditions are shown.

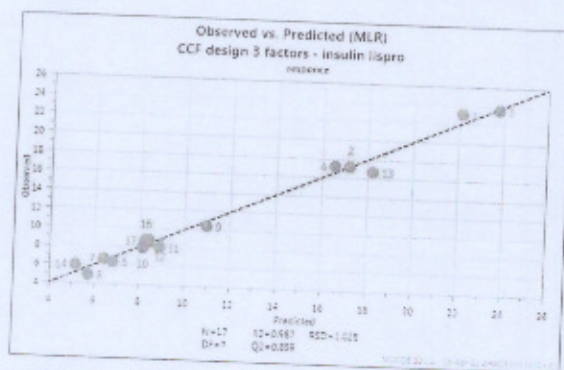


Fig. 3: CCF design 3 factors - insulin lispro.

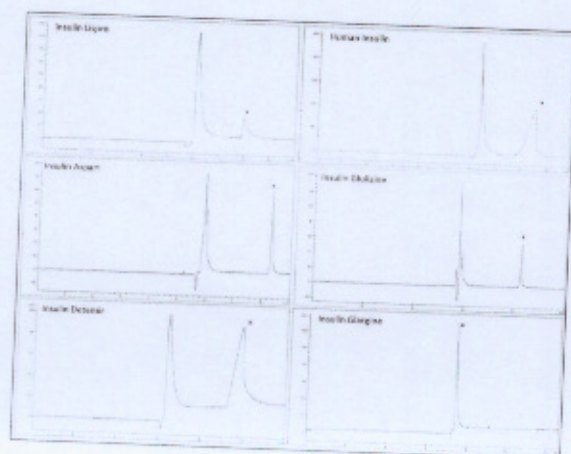


Fig. 4: Representative CE electropherograms of separation of insulin analogues. * = the main compound (insulin). Measurements conditions: BGE: 40mM ammonium acetate, pH 9, voltage 20 kV, temperature 25°C.

3. Experimental

3.1. Chemicals and reagents

Acetic acid, ammonium acetate, ammonia, hydrochloric acid and sodium hydroxide were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). All reagents used were of analytical grade. Prior analysis, samples were filtered using the syringe membrane filter. Pharmaceutical formulations containing insulin and analogues - Humulin®R (Lilly) and Humalog® (Lilly), Lantus® SoloStar® (Sanofi), Apidra® SoloStar® (Sanofi), NovoRapid® Penfil® (Novo Nordisk), Levemir® FlexPen® (Novo Nordisk) were used.

3.2. Instrumentation

In this study we used the CE 7100 system (Agilent, Waldbronn, Germany). Electrophoretic separations were carried out using fused silica capillaries (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, USA) with an internal diameter of 50 µm and a total length of 65 cm in positive mode using constant voltage.

Before the first use, the capillary was washed with 0.1 M NaOH (15 min), with water (15 min) and with the buffer electrolyte (10 min). At the beginning of each working day, the capillary was flushed with 0.1M NaOH for 15 min. For CZE separations between each injection, the capillary was preconditioned for 18 min with 0.1M NaOH, 6 min with acetonitrile and 24 min with the running buffer. This strong preconditioning was used to remove all possible adsorbed materials. The samples were introduced at the cathodic end of the capillary; injections were performed using -50mbar pressure for 4s. Since the proteins tend to adsorb on the inner surface of the capillary, high pH was applied.

3.3. Experimental design

The factors that have the higher influence in the migration behavior of each insulin analogue were the pH and buffer concentration of the background electrolyte and the voltage applied. The traditional method optimization is based on varying one factor at a time, and is called "one-factor-at-a-time", while the other factors are kept constant. Using this technique, a large number of individual experiments is involved and such method is time consuming. Therefore, the effect of these factors individually and their interaction (combination of the factors) were analyzed by RSM design called CCF. This multivariate method delivers optimal conditions with reduced number of experiments. The total number of experiments was calculated by the formula $2^k + 2k + 1$, where k represents the number of factors (Asghar et al. 2014; Mangili et al. 2015). The statistical software Minitab® was used for the DoE.

The levels of factors selected for optimization were the following: BGE: pH (8, 9, 10), BGE concentration (40, 50, 60), voltage (10, 20, 30). The number of total experiments calculated for these 3 factors was 15. Nevertheless, the center point was repeated with three different temperature values (15 °C, 22.5 °C and 30 °C) to consider the effect of this factor as well.

References

- Abdel-Meged AM, Hanafi RS, Aboul-Enein HY (2018) A chiral enantioseparation generic strategy for anti-Alzheimer and antifungal drugs by short end injection capillary electrophoresis using an experimental design approach. *Chirality* 30: 165-176.
- Aboul-Enein HY, Abdel-Meged AM (2019) A chiral generic strategy for enantioseparation of acidic and basic drugs using short end injection capillary electrophoresis: application to design of experiment. In: Phillips TM, (ed) *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis. Methods in Molecular Biology*, vol 1972. Humana, New York, p 127-136.
- Altria K, Marsh A, Slagter-van de Griend C (2005) Capillary electrophoresis for the analysis of small-molecule pharmaceuticals. *Electrophoresis* 27: 2263-2282.
- Asghar A, Abdul Raman AA, Daud WMAW (2014) A comparison of central composite design and Taguchi method for optimizing Fenton process. *Sci World J* 2014: 1-14.
- Chindaphan K, Wongravee K, Nhujak T, Disayabutra T, Srisai-Art M (2019) Online preconcentration and determination of chondroitin sulfate, dermatan sulfate and hyaluronic acid in biological and cosmetic samples using capillary electrophoresis. *J Sep Sci* 42: 2867-2874.
- Dima M, Basu JK (2011) Statistical optimization for the adsorption of acid fuchsin onto the surface of carbon alumina composite pellet: an application of response surface methodology. *J Environ Sci Technol* 5: 42-53.
- Elek J, Mangilings D, Ivanyi T, Lázár I, Heyden YV (2015) Enantioselective capillary electrophoretic separation of tryptophan- and tyrosine-methyl esters in a dual system with a tetra-*o*-sulfamoyl-crown-ether derivative and a cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal* 38: 601-608.
- Fayed AS, Rezk MR, Marzouk HM, Abbas SS (2018) A capillary zone electrophoresis method with multiresponse chemometric optimization for the simultaneous determination of zofenopril calcium and hydrochlorothiazide in presence of hydrochlorothiazide major impurities. *J Chromatogr Sci* 56: 461-471.
- Harnisch JL, Chien Y, Scriba GKE (2018) Capillary electrophoresis method for the chiral purity determination of pregabalin derivatized with dansyl chloride. *Chromatographia* 81: 719-725.
- Harris DC (2010) *Quantitative Chemical Analysis* Eighth Edition. WH Freeman and Company, New York, vol 2007.
- Kroksa G, Nafim K, Bhat M, Udupa N (1998) High-performance liquid chromatographic determination of insulin in rat and human plasma. *Anal Biochem* 260: 92-95.
- Krai S, Scriba GKE (2018) Quality by design-assisted development of a capillary electrophoresis method for the chiral purity determination of dexmedetomidine. *Electrophoresis* 39: 2575-2580.

- Kunkel A, Günter S, Christoph D, Hermann W (1997) Quantitation of insulin by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography method comparison and validation. *J Chromatogr A* 781: 445–455.
- Mammi MCN, Farlan JA, Reyes PGR, Rauh S (2006) Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. *Talanta* 70: 236–243.
- Mangili I, Lasagni M, Huang K, Isayev AI (2015) Modeling and optimization of ultrasonic desulfurization using the response surface methodology based on central composite face-centered design. *Chemometr Intell Lab Syst* 144: 1–13.
- Orlandini S, Giannini I, Gotti R, Pinzanti S, La Porta E, Furlanetto S (2007) Development of a CZE method for the determination of mizolastine and its impurities in pharmaceutical preparations using response surface methodology. *Electrophoresis* 28: 395–405.
- Orlandini S, Gotti R, Furlanetto S (2014) Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review. *J Pharm Biomed* 87: 299–307.
- Papp LA, Hancu G, Gyéresi A, Kelenen H, Szabó ZI, Noszál B, Debóky P, Tóth G (2019) Chiral separation of lansoprazole and rabeprazole by capillary electrophoresis using dual cyclodextrin systems. *Electrophoresis* 40: 2799–2805.
- Prochazka S, Mulholland M, Lloyd-Jones A (2003) Optimisation for the separation of the oligosaccharide, sodium Pentosan Polysulfate by reverse polarity capillary zone electrophoresis using a central composite design. *J Pharm Biomed Anal* 31: 133–141.
- Riggs L, Sierra C, Regnier FE (2001) Automated signature peptide approach for proteomics. *J Chromatogr A* 924: 359–368.
- Sawicka K, Sahota T, Taylor MJ, Tanna S (2006) Development of a reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the analysis of components from a closed-loop insulin delivery system. *J Chromatogr A* 1132: 117–123.
- Simmons B, Johnson D, Delhaye K, Colwell J, Chor E, Santa P, Brewster KR (2019) Development and validation of a noncompetitive electrochemiluminescence-based immunoassay (ECLIA) for specific determination of insulin lispro (Humalog®) in human serum to support pharmacokinetic assessments. *J Immunoassay Immunochem* 40: 314–327.
- Thevis M, Thomas A, Delahaut P, Bosselet A, Schünzer W (2005) Qualitative determination of synthetic analogues of insulin in human plasma by immunocaffinity purification and liquid chromatography–tandem mass spectrometry for doping control purposes. *Anal Chem* 77: 5579–5585.
- Wan H, Ohman M, Blomberg LG (2001) Chemometric modeling of neurotransmitter amino acid separation in normal and reversed migration micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 916: 255–263.
- Watson DG (2007) *Pharmaceutical Analysis: A Textbook For Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Webster HV, Bone AJ, Webster KA, Wilkin TJ (1990) Comparison of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with a radioimmunoassay (RIA) for the measurement of rat insulin. *J Immunol Methods* 134: 95–100.
- Yomosa C, Matsumoto Y, Okada S, Hayashi Y, Matsuda R (1997) Discrimination limit for purity test of human insulin by capillary electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 703: 139–145.

УНИВЕРЗИТЕТ „СВ. КИРИЛ И МЕТОДИЈ“ ВО СКОПЈЕ
ШКОЛА ЗА ДОКТОРСКИ СТУДИИ
ФАРМАЦЕВТСКИ ФАКУЛТЕТ

Студиска програма: Трет циклус за докторски студии од областа фармација

РЕЦЕНЗИЈА

на семинарски труд од V семестар под наслов
„Хеометриски пристап за оптимизација на експериментални услови за раздвојување на
аналози на инсулин со примена на метод на капиларна електрофореза“ на докторандот
магистер по фармација Блерта Пајазити

Со одлука на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет во Скопје, определена е рецензентска комисија за оцена на семинарски труд од трет циклус на докторски студии во состав: проф. д-р. Руменка Петковска, проф. д-р Ана Поцева Пановска и проф. д-р Катерина Брезовска.

По прегледот на доставениот научен труд, Рецензентската комисија го доставува следниот

ИЗВЕШТАЈ

Семинарскиот труд под наслов „Хеометриски пристап за оптимизација на експериментални услови за раздвојување на аналози на инсулин со примена на метод на капиларна електрофореза“ претставува самостојно изработен труд. Во трудот се претставени резултати од оптимизација на метод на капиларна електрофореза со примена на пристапот на хеометриски дизајн на експерименти. Методот е применет за раздвојување и определување на шест аналози на инсулин со висок степен на хемиска сличност.

Резултатите претставени во трудот се објавени како самостоен научен труд:
B. Pajaziti, M. Andrási, D. Nebija, L. Anastasova, R. Petkovska, Chemometrics approach for optimization of capillary electrophoretic conditions for the separation of insulin analogues, Pharmazie 76 (2021), doi: 10.1691/ph.2021.1758.

Трудот е структуриран во следните поглавја: вовед, материјали и методи, резултати и дискусија и заклучок. Систематизацијата на деловите во наслови и поднаслови обезбедува соодветно следење на материјата која е обработена во трудот.

Во „Воведот“, докторантката наведува дека според достапните литературни податоци, за карактеризација на протеините, како и за сепарација и квантификација на деградациските производи на инсулинот развиени се повеќе методи со примена на хроматографија, електрофореза и капиларна електрофореза. Капиларната електрофореза (СЕ) има неколку предности, вклучувајќи едноставност, голема брзина, чувствителност, потребна е мала количина на примерокот, соодветна е за раздвојување на пептиди и

протеинианалитички матрици. Меѓутоа, капиларната електрофореза како аналитичка техника, има неколку ограничувања, на пример, во споредба со HPCL покажува помала сензитивност, има помала робусност и репродукцибилност. Овие недостатоци првенствено се предизвикани од адсорпција на наелектризираните видови на капиларниот сид и појава на затоплување на сидот на капиларата со што се предизвикуваат варијации во електроосмотскиот проток.

Примената на хеометриски пристап при оптимизација на СЕ метод може да обезбеди приказ на целосниот профил на процесот на сепарација, како и корисни информации за факторите кои влијаат на раздвојувањето како и нивната интеракција. Поради тоа кандидатката во воведниот дел дава краток осврт на хеометрискиот пристап при оптимизација на СЕ метод. Ваквиот пристап овозможува систематско и планирано испитување и решавање на експерименталните проблеми кои произлегуваат во текот на процесот на оптимизацијата на аналитичките методи и добивање на сигурни информации при анализа на сложени системи.

Дизајнирањето експерименти подразбира систематско планирање и изведба на експериментите, како и воведување на математички критериуми за проценка на добиените експериментални резултати. Коректно применетите математички критериуми (факторски дизајни) за обработка на добиените експериментални резултати овозможуваат максимално искористување на податоците добиени од планираните експерименти и даваат можност за предвидување на нивните оптимални вредности. Оптимизацијата на експерименталните вредности на претходно утврдените значајни експериментални фактори се врши со примена на соодветен факторски дизајн и конструирање на дијаграм на површината на одговорот на експерименталниот систем (Response surface methodology, RSM). Дијаграмот на површината на одговорот на електрофореграмскиот систем дава можност за утврдување на оптималното експериментално подрачје, како и за утврдување на експерименталното подрачје на испитуваните фактори каде се можни меѓуфакторски интеракции.

Земајќи ги предвид овие сознанија, на крајот од воведниот дел, докторантката ги наведува целите на трудот, оптимизација на метод на капиларна зонска електрофореза (CZE) со примена на Централен композитен странично центриран дизајн (Central Composite Face Centered, CCF Design) и конструирање на дијаграм на површината на одговорот на експерименталниот систем (Response surface methodology, RSM).

Во делот „Материјали и методи“, соодветно се прикажани потребните материјали за оптимизација на методи со примена на капиларна зонска електрофореза (CZE) како и дизајнираниот Централен композитен странично центриран дизајн (Central Composite Face Centered, CCF Design) дизајн. Користени се шест аналози на инсулин со висок степен на хемиска сличност (Humulin®R (Lilly) and Humalog® (Lilly), Lantus® SoloStar® (Sanofi), Apidra® SoloStar® (Sanofi), NovoRapid® Penfill® (Novo Nordisk), Levemir® FlexPen® (Novo Nordisk))

Во делот „Резултати и дискусија“, јасно (табеларно и сликовито) се прикажани добиените резултати, а дискусијата е водена разбирливо и со логичен редослед. Прикажано е влијанието на три експериментални фактори: pH на BGE (background electrolyte, a solution of a buffering salt) во експериментален ранг од 8-10, концентрација на

пуфер во експериментален ранг од 40-60 mM и опсег на применетиот напон од 10-30 kV.

Применетата методологија на конструирање на дијаграм на површината на одговорот на експерименталниот систем укажува дека во сите случаи, кај сите анализирани примероци фактор со најголемо влијание е применетиот напон; зголемувањето на напонот е обратно пропорционален со времето на миграција. Влијанието на напонот е позначајно од влијанието на било кој друг испитуван фактор, или комбинација на фактори (pH и BGE концентрација, pH и напон или BGE концентрација и напон). Ова може да се објасни со фактот дека зголемувањето на напонот во CE резултира со повисока јачина на полето, што предизвикува зголемување на електро – осмотскиот проток (EOF). Следствено, времето на миграција на аналитите се намалува и нивната електрофоретична подвижност се зголеми. втор фактор по влијание е pH на BGE, кој исто така има важна ефект врз времето на одвојување. Промените на pH на пуферот влијаат на одвојување со изменување на полнежот на аналитот и со промена на електроосмотски проток. Овие наоди сугерираат дека pH варијацијата се чини дека е најнефективниот метод за контролирање на CE сепарацијата, а со тоа и на времето на анализа. Според контурните дијаграми, однесувањето на миграцијата на секој аналог на инсулин е многу сличен поради нивниот висок степен на хемиска сличност. Користејќи ги дијаграмите на површина на одговор, утврден е оптималниот опсег на факторите со најголемо влијание, вклучувајќи pH и концентрација на пуфер, во однос на намалувањето на времето на анализата. Во зависност од тоа за кој инсулински аналог станува збор, оптималниот опсег на избрани фактори за постигнување на претпочитано време за анализа од 8-10 минути се: применет напон 20-25 kV, pH на пуфер од 8,5-9,5 за концентрација на пуфер 40 mM амониум ацетат.

Во заклучните согледувања, докторантката ги сублимира резултатите од спроведените истражувања, истакнувајќи го значењето на постигнатите резултати. Применетата методологија на оптимизација на метод на капиларна зонска електрофореза (CZE) со примена на Централен композитен странично центриран дизајн (Central Composite Face Centered, CCF Design) и конструирање на дијаграм на површината на одговорот на експерименталниот систем (Response surface methodology, RSM) покажа дека пристапот на анализа на влијанието на секој параметар во миграциското однесување на анализираните пептиди овозможи да се проценат најдобрите електрофоретски услови за одвојување на аналозите на инсулин.

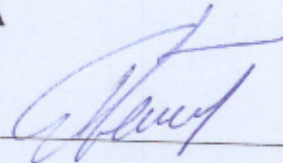
ЗАКЛУЧОК

По прегледот на семинарскиот труд под наслов „Хеометриски пристап за оптимизација на експериментални услови за раздвојување на аналози на инсулин со примена на метод на капиларна електрофореза“ на докторандот Блерта Пајазити, Рецензентската комисија констатира дека станува збор за научен труд кој сеопфатно го обработува значењето на примената на хеометрискиот пристап при оптимизација на метод на капиларна електрофореза за раздвојување на аналози на инсулин со висок степен на хемиска сличност.

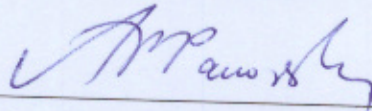
ПРЕДЛОГ

Врз основа на горенаведеното, Рецензентската комисија позитивно го оценува доставениот семинарски труд под наслов „Хеометриски пристап за оптимизација на експериментални услови за раздвојување на аналози на инсулин со примена на метод на капиларна електрофореза“ на докторандот Блерта Пајазити и му предлага на Советот на докторски студии на Фармацевтскиот факултет при УКИМ во Скопје да го прифати и закаже негова презентација.

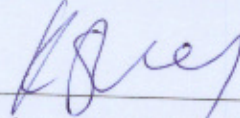
ОЦЕНКА



Проф. д-р. Руменка Петковска



Проф. д-р Ана Поцева Пановска



проф.д-р Катерина Брезовска