

# ANALIZNI PRISTOP ZA VREDNOTENJE STABILNOSTI LAKTOFERINA

## ANALYTICAL APPROACH FOR STABILITY EVALUATION OF LACTOFERRIN

University of Ljubljana  
Faculty of Pharmacy



Nika Osel, Timeja Planinšek Parfant, Jurij Trontelj, Albin Kristl, Robert Roškar  
Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Slovenija, robert.roskar@ffa.uni-lj.si

### UVOD

Laktoferin (Lf) je približno 80 kDa velik globularni glikoprotein, ki veže železo v človeškem mleku. Deluje protimikrobno, protivnetno, imunomodulatorno, protirakavo in ima še številne druge fiziološke vloge (García-Montoya in sod., 2012). Lf je kot protein nestabilen, kar lahko kritično vpliva na kakovost izdelkov. Pri proteinskih učinkovinah moramo zagotoviti kakovost, varnost in učinkovitost med proizvodnjo, shranjevanjem in transportom, kar predstavlja velik izziv. Poleg tega je vrednotenje stabilnosti proteinov kompleksen in večplasten analizni izziv. Proteini se namreč od nizkomolekularnih spojin razlikujejo po večji strukturni kompleksnosti (ICH Q5C, 1995).

### INTRODUCTION

Lactoferrin (Lf) is a globular glycoprotein with a molecular mass of about 80 kDa. As the main iron-binding in human milk it has antimicrobial, anti-inflammatory, immunomodulatory, anticancer, and many other biological activities (García-Montoya et al., 2012). As a protein, it is prone to degradation which critically affects the quality of products. There is a special challenge for proteins to ensure their quality, safety, and efficiency during processing, storage, and transportation; they differ from small molecules in their level of complexity. Therefore, protein characteristics demand a complex analytical approach and special handling in stability testing (ICH Q5C, 1995).

### NAMEN

Primarni namen raziskovalnega dela je bil razviti analizo metodologijo, ki omogoča vrednotenje stabilnosti Lf v predformulacijskih študijah in v končnih izdelkih.

### MATERIALI IN METODE

Standard govejega Lf smo kupili pri Sigm-Aldrich. Analizirali smo tudi komercialno dostopna prehranska dopolnila z Lf. Preizkusili smo reverznofazne (RP) in izključitvene (SEC) kromatografske kolone petih različnih proizvajalcev (Agilent, Phenomenex, Sigma-Aldrich, Vydac in Waters). Uporabili smo Agilentov 1100/1200 HPLC sistem z detektorjem z nizom diod.

### REZULTATI IN RAZPRAVA

Osredotočili smo se na dve komplementarni kromatografski metodi. Med preizkušenimi RP kolonami (C3, C4, C8 in C18) se je najbolje izkazala kolona BioZen™ Intact XB-C8 150×4,6 mm, 3,6 μm (Phenomenex). Pri RP metodi smo optimalno ločbo dosegli s počasnim gradientnim programom in mobilno fazo, ki jo sestavljata 0,1 % TFA v vodi in 0,1 % TFA v acetonitrilu. Pri optimizirani SEC metodi uporabljamo kolono XBridge Protein BEH SEC 150×7,8 mm, 3,5 μm (Waters) in fosfatni pufer z dodatkom NaCl kot mobilno fazo. S stresnimi testi smo potrdili stabilnostno indikativnost kromatografskega analiznega pristopa in ugotovili, da je Lf najbolj občutljiv pri bazičnih pogojih in povišani temperaturi. V različnih vzorcih smo z RP metodo zaznali do 3 razpadne produkte Lf, s SEC metodo pa smo zaznali agregate in fragmente Lf (Slika 1). Razvite kromatografske metode smo uspešno validirali v skladu s smernico ICH in jih uporabili v stabilnostnih študijah (Osel in sod., 2021).

Obe metodi smo uporabili tudi za vrednotenje vsebnosti Lf v komercialnih izdelkih, pri čemer smo ugotovili določeno stopnjo neujemanja med rezultati. RP metoda je primernejša za kvantitativno določanje Lf, saj lahko medij vzorca bistveno vpliva na kromatografski odziv pri SEC metodi.

Analizni pristop smo dodatno razširili s spektroskopskimi tehnikami (fluorimetrija, UV spektroskopija, določanje koncentracije celokupnih proteinov). Ugotovili smo, da so za kvalitativno in kvantitativno vrednotenje stabilnosti Lf primernejše kromatografske metode, vendar pa lahko z enostavnejšimi, hitrejšimi in dostopnejšimi spektroskopskimi tehnikami v nekaterih primerih pridobimo koristne komplementarne informacije o stabilnosti Lf.

### ZAKLJUČKI

Razvili smo stabilnostno-indikativni analizni pristop za vrednotenje stabilnosti Lf, ki temelji na komplementarnih RP in SEC kromatografskih metodah. Pristop omogoča ovrednotenje stabilnosti Lf v različnih vzorcih, pri čemer lahko zaznamo tudi razlike v mehanizmi razpada. Poleg tega je analizni pristop uporaben tudi pri kontroli kakovosti izdelkov z Lf.

### CONCLUSIONS

A stability-indicating analytical approach for the evaluation of Lf stability based on complementary RP and SEC chromatographic methods was established. It allows the evaluation of Lf stability in various samples, including the ability to detect differences in degradation mechanisms. Moreover, it can be used for the quality control of products containing Lf.

### ZAHVALA

Raziskava je bila financirana s projektom LAKTIKA (št. pogodbe OP20.03521) Operativnega programa EKP 2014 – 2020.



This research was funded by the project LAKTIKA (contract No. OP20.03521) in the frame of the Operational Programme ECP 2014 – 2020.



### REFERENCE

García-Montoya IA in sod. *Biochim Biophys Acta*. 1820:226–236 (2012).  
ICH Q5C (1995).  
Osel N in sod. *Pharmaceutics*. 13(7): 1065 (2021).

Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir, Ljubljana, 15.2.2022  
Zaključna konferenca projekta LIFE for Acid Whey - Whey – LIFE16 ENV/SI/000335 (Reuse of acid whey for extraction of high added value bioactive proteins)  
<http://lifeforacidwhey.arhel.si>

### REFERENCES

García-Montoya IA et al. *Biochim Biophys Acta*. 1820:226–236 (2012).  
ICH Q5C (1995).  
Osel N et al. *Pharmaceutics*. 13(7): 1065 (2021).

