

OVREDNOTENJE STABILNOSTI LAKTOFERINA V VODNIH RAZTOPINAH

OVERVIEW OF LACTOFERRIN STABILITY IN AQUEOUS SOLUTIONS

University of Ljubljana
Faculty of Pharmacy



Nika Osel, Timeja Planinšek Parfant, 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 multifunkcionalen globularni glikoprotein, ki veže železo. Najdemo ga v izločkih eksokrinih žlez in telesnih tekočinah. Zaradi njegovega potenciala za zdravljenje različnih bolezni se zanimanje za izdelke z Lf povečuje. Vendar pa je Lf kot protein podvržen razgradnji, kar lahko kritično vpliva na kakovost izdelkov (García-Montoya in sod., 2012).

INTRODUCTION

Lactoferrin (Lf) is an 80 kDa multifunctional iron-binding globular glycoprotein that is widely represented in various secretory fluids. The interest in products containing Lf is increasing due to its potential for the treatment of various diseases. However, as a protein, Lf is prone to degradation which critically affects the quality of products (García-Montoya et al., 2012).

NAMEN

Namen raziskave je bil ovrednotiti stabilnost Lf v različnih vzorcih pri različnih pogojih shranjevanja.

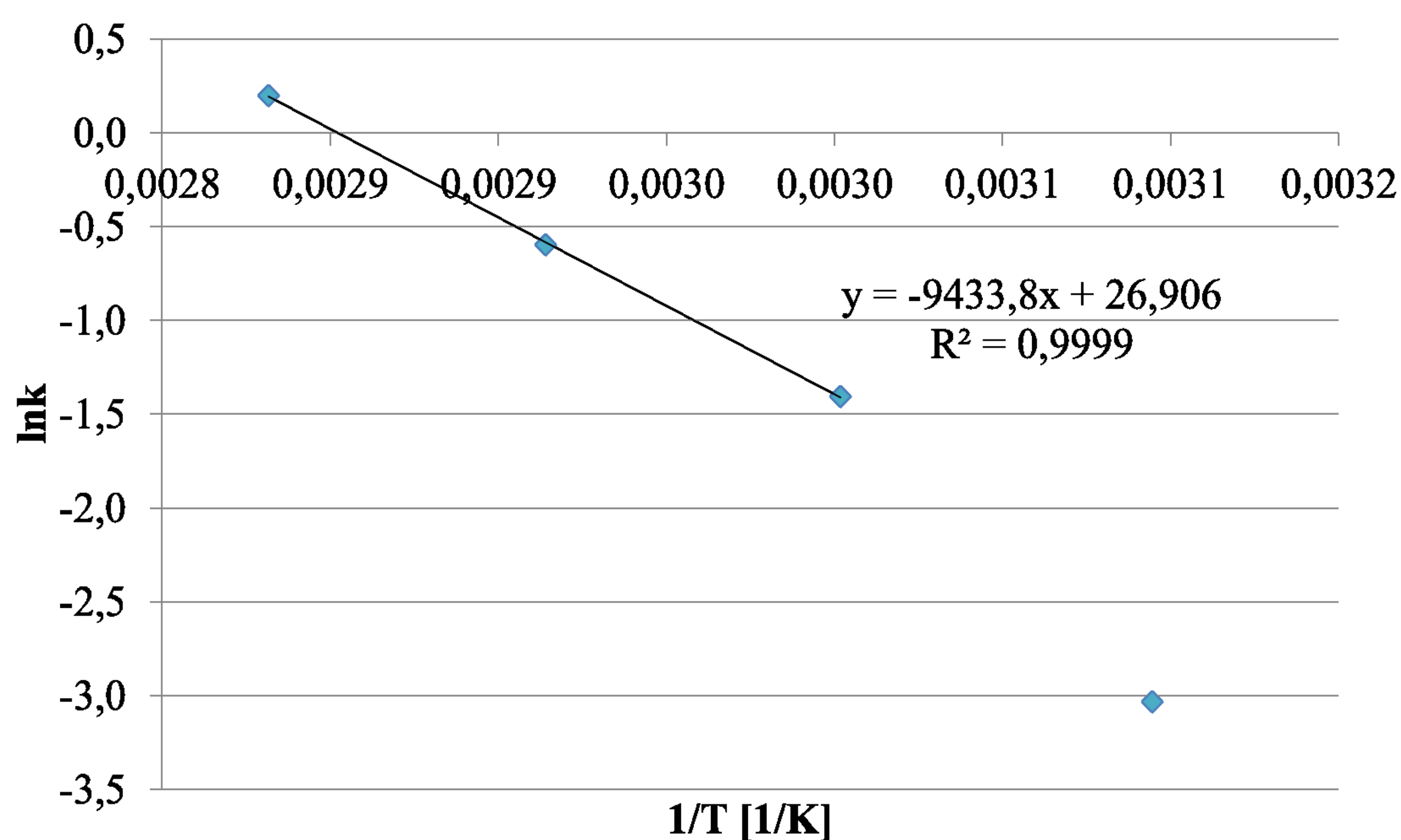
MATERIALI IN METODE

Vzorci smo analizirali z reverzno fazno HPLC metodo na koloni BioZen™ Intact XB C8 (150×4,6 mm, 3,6 μm; Phenomenex), termostatirani na 30 °C. Elucija je potekala po gradientnem programu (0,1 % TFA v vodi in 0,1 % TFA v acetonitrilu) pri pretoku 1,0 mL/min (Osel in sod., 2021). Analize smo izvajali na HPLC sistemu Agilent 1100/1200 z detektorjem z nizom diod. Valovno dolžino detekcije smo nastavili na 280 nm. Analizirali smo tekoče vzorce z Lf (elucije E1 in E3 ter koncentrirana elucija E3) in vodne raztopine trdnih vzorcev (izolati) z Lf, ki je bil izoliran iz sirotke.

REZULTATI IN RAZPRAVA

Stresni testi so pokazali, da je Lf najbolj občutljiv na bazični medij in povišano temperaturo, najmanj pa na izpostavitve svetlobi. V različnih vzorcih smo zaznali največ tri razpadne produkte. Ugotovili smo, da razpad Lf poteka po kinetiki ničtega reda. Arrheniusova enačba je linearna v območju 60–80 °C, med 50 in 60 °C pa se spremeni mehanizem razpada (Slika 1).

Konstante hitrosti razpada so bile za več kot dva velikostna reda nižje pri realnih pogojih shranjevanja kot pri temperaturah nad 50 °C. Vzorci so bili predvidljivo bolj stabilni v hladilniku ali zamrzovalniku kot pri sobni temperaturi (Preglednica 1). Večkratni cikli zamrzovanja in odmrzovanja vzorcev niso vplivali na stabilnost Lf v primerjavi z istimi vzorci, ki niso bili ponovno zamrznjeni. Opazili smo znatne razlike v stabilnosti Lf med vzorci, ki so se razlikovali v koncentraciji in čistosti Lf. To je najverjetneje posledica prisotnosti drugih proteinskih nečistoč ali različnih koncentracij soli. Pri vzorcih z različnimi koncentracijami istega Lf namreč nismo opazili bistvenih razlik v konstantah hitrosti razpada (Preglednica 1).



Slika 1: Arrheniusov graf za vzorec izolata Lf 1 (c = 1,0 mg/mL), ki temelji na konstantah hitrosti razpada 0. reda za razpad Lf med 50 in 80 °C.

Figure 1: Arrhenius plot for Lf isolate sample 1 (c = 1,0 mg/mL) based on zero-order rate constants for the degradation of Lf at 50–80 °C.

Preglednica 1: Konstante hitrosti razpada za različne vodne vzorce Lf pri različnih temperaturah.

Table 1: Degradation rate constants for various aqueous Lf samples at different temperatures.

Vzorec	k [% dan ⁻¹] ^a			
	50 °C	Sobna T	4 °C	-20 °C
Vzorec izolata Lf 1 (c = 1,0 mg/mL)	124,5	/	/	/
Vzorec izolata Lf 2 (c = 1,0 mg/mL)	105,0	/	/	/
Vzorec izolata Lf 3 (c = 1,0 mg/mL)	179,1	/	/	/
Vzorec E1 (c = 0,55 mg/mL)	/	5,585	/	/
Vzorec E3 (c = 1,9 mg/mL)	/	0,438	Stable ^b	Stable ^b
Vzorec koncentrirane E3 (c = 30,5 mg/mL)	/	1,302	0,529	0,814
Vzorec izolata Lf 3 (c = 0,55 mg/mL)	/	0,326	/	/
Vzorec izolata Lf 3 (c = 1,9 mg/mL)	/	0,353	/	/
Vzorec izolata Lf 3 (c = 10,0 mg/mL)	/	0,409	/	/
Vzorec izolata Lf 3 (c = 30,5 mg/mL)	/	0,426	/	/

^a Konstante hitrosti razpada 0. reda. Vsebnost Lf [%] smo izračunali relativno glede na točko nič in jo uporabili za izračun konstant hitrosti razpada. Tako smo dobili primerljive rezultate, saj se je koncentracija Lf v različnih vzorcih zelo razlikovala.

^b Po 4 tednih je razpadlo manj kot 5 % Lf.
/ Nismo ovrednotili.

ZAKLJUČKI

Temperatura je eden od glavnih dejavnikov, ki vplivajo na stabilnost Lf. Pri različnih temperaturah je prišlo do sprememb v hitrosti in mehanizmu razpada. Na stabilnost Lf vpliva tudi prisotnost (proteinskih) nečistot ali različnih koncentracij soli v vzorcih, medtem ko koncentracija Lf v vzorcu ne vpliva na njegovo stabilnost.

CONCLUSIONS

Temperature is one of the main factors affecting Lf stability. Changes in degradation mechanisms and rate constants at different temperatures were observed. Lf stability in various samples was also affected by the presence of other (protein) impurities or different salt concentrations but not by Lf concentration.

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).
Osel N in sod. Pharmaceutics. 13(7): 1065 (2021).

REFERENCES

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

