



Razvoj analiznih metod za vrednotenje laktoferina in izbranih sirotkininih proteinov

prof. dr. Robert Roškar, prof. dr. Albin Kristl,
doc. dr. Jurij Trontelj, asist. Timeja Planinšek Parfant, Nika Osel

Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo

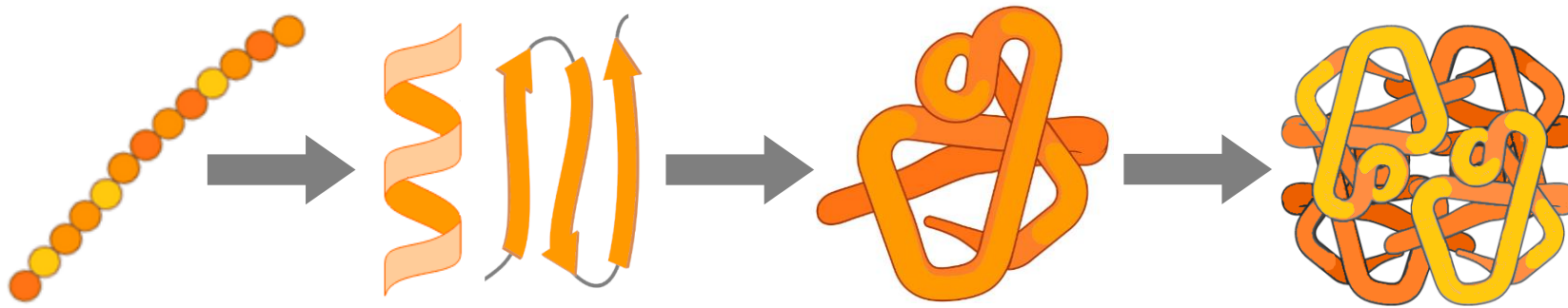
Napredni načini izrabe potenciala sirotke: prehod iz okoljskega problema v dragocen naravni vir
Zaključna konferenca projekta LIFE for Acid Whey – LIFE16 ENV/SI/000335; <http://lifeforacidwhey.arhel.si>



Ljubljana, 15.2.2021

Razvoj analiznih metod za (sirotkine) proteine

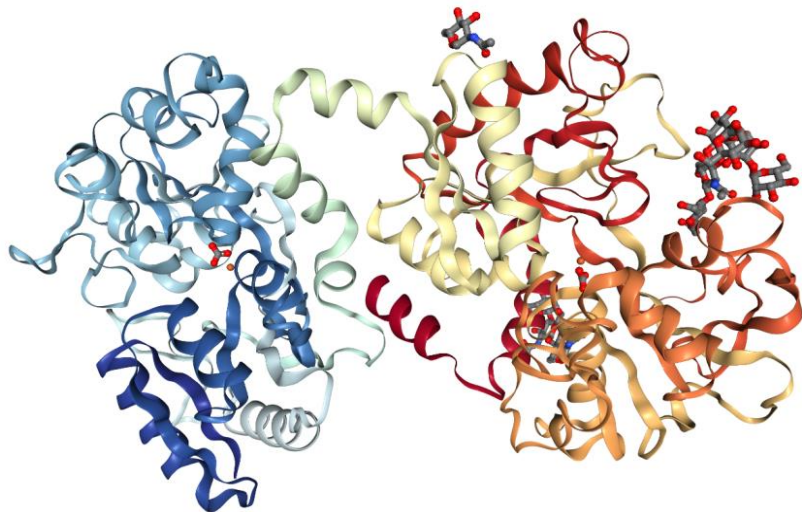
- ▶ Vrednotenje uspešnosti izolacije in čiščenja, razvoj formulacij, vrednotenje stabilnosti ... → **analitska podpora**
- ▶ **Proteini:** kompleksna struktura in Fi-Ke lastnosti, nestabilnost → **kompleksen in večplasten analizni pristop**



Razvoj analiznih metod za (sirotkine) proteine

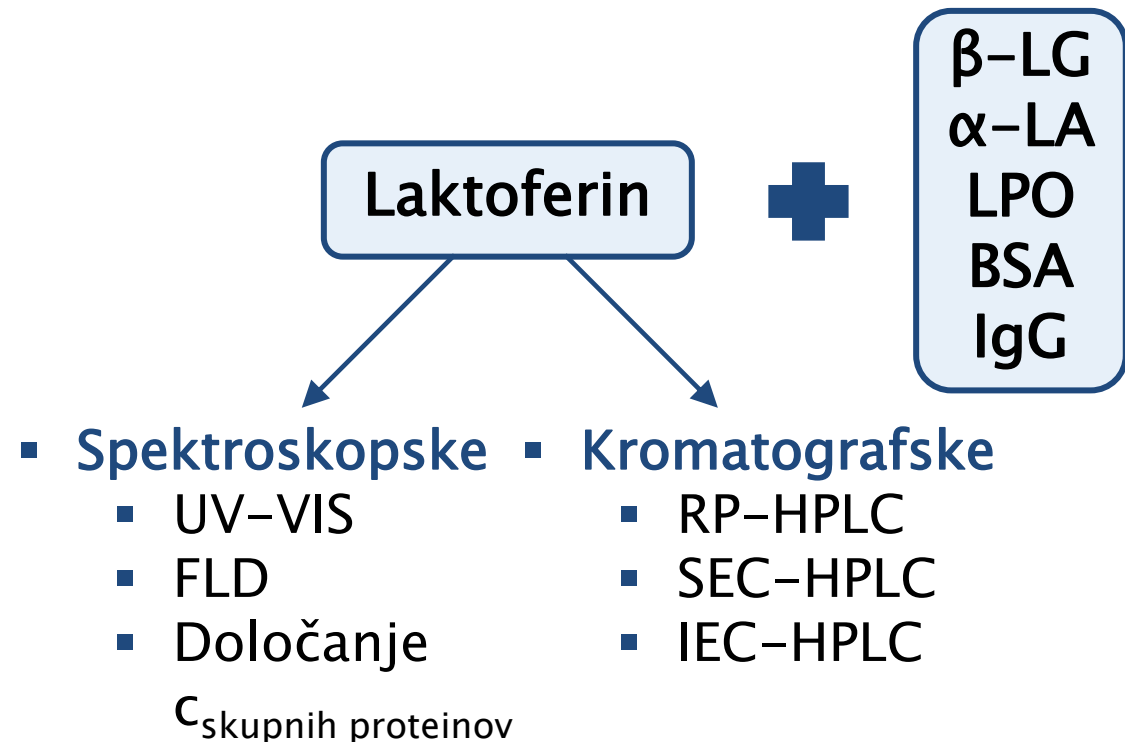
- ▶ Vrednotenje uspešnosti izolacije in čiščenja, razvoj formulacij, vrednotenje stabilnosti ... → **analitska podpora**
- ▶ **Proteini:** kompleksna struktura in Fi-Ke lastnosti, nestabilnost → **kompleksen in večplasten analizni pristop**

Laktoferin

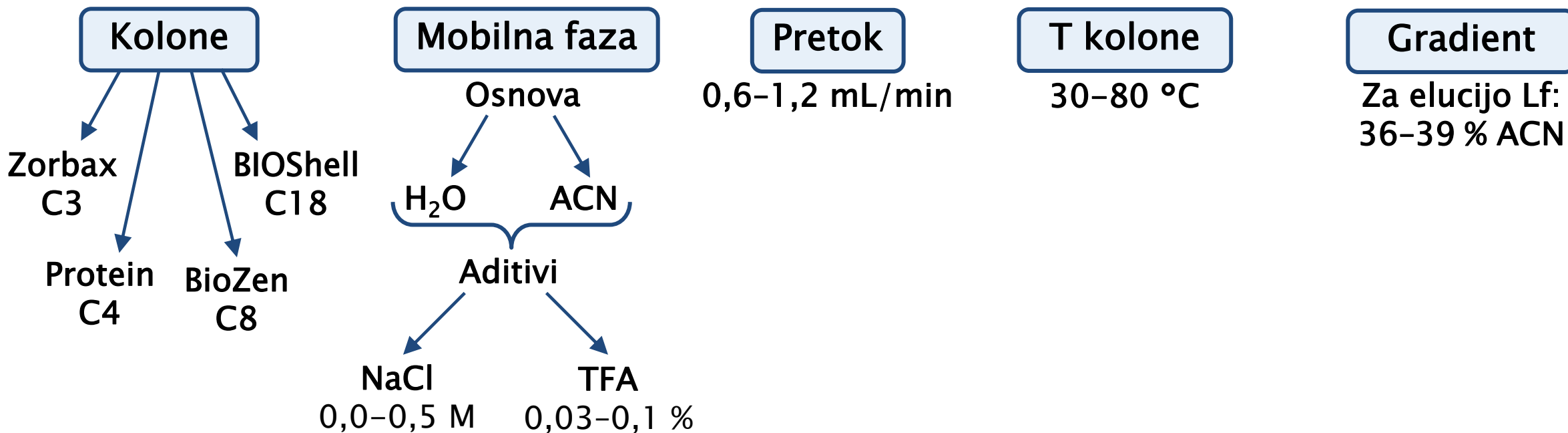


Razvoj analiznih metod za (sirotkine) proteine

- ▶ Vrednotenje uspešnosti izolacije in čiščenja, razvoj formulacij, vrednotenje stabilnosti ... → **analitska podpora**
- ▶ **Proteini:** kompleksna struktura in Fi-Ke lastnosti, nestabilnost → **kompleksen in večplasten analizni pristop**



Razvoj RP-HPLC metode za Lf



1. stopnja

Optimizacija oblike kromatografskega vrha za Lf

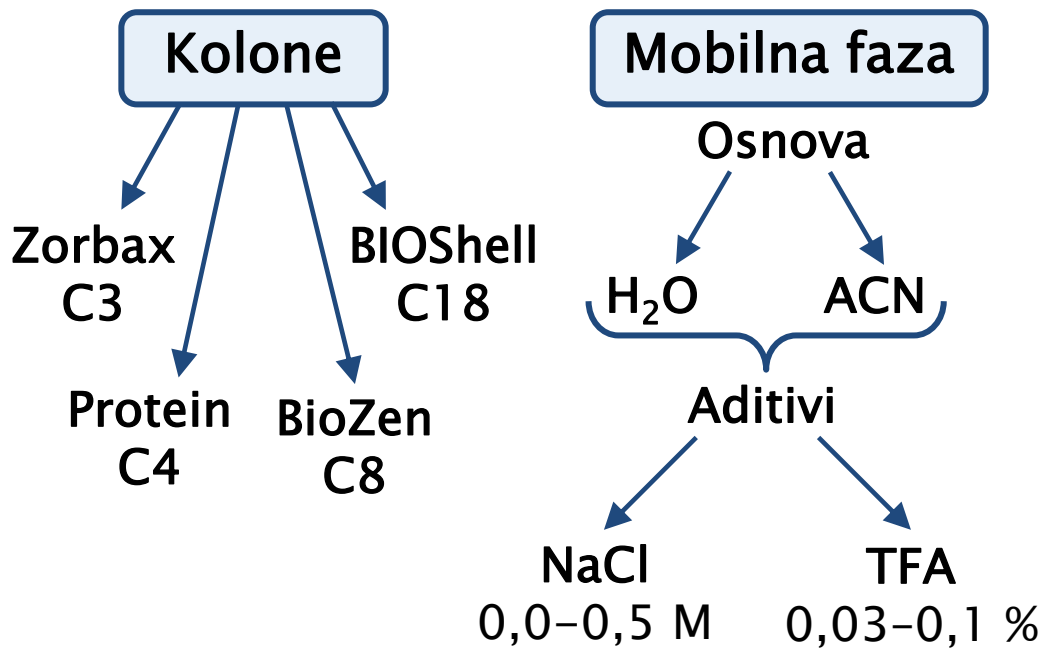
2. stopnja

Stresni vzorci - ločba Lf od razpadnih produktov

3. stopnja

Dodatna optimizacija metode na izbrani koloni

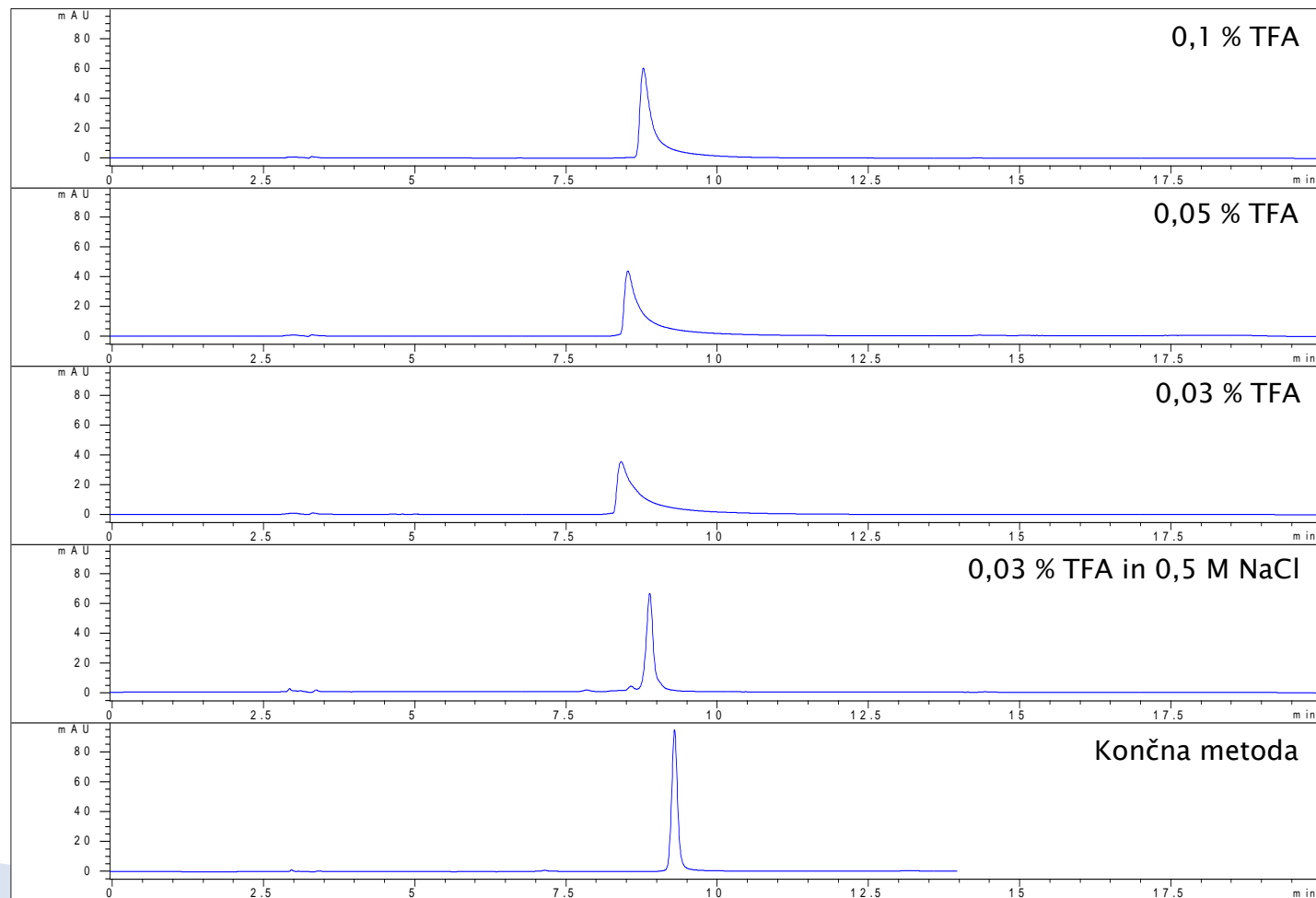
Primer razvoja – kolona Protein C4



Pretok
0,6–1,2 mL/min

T kolone
30–80 °C

Gradient
Za eluciju Lf:
36–39 % ACN



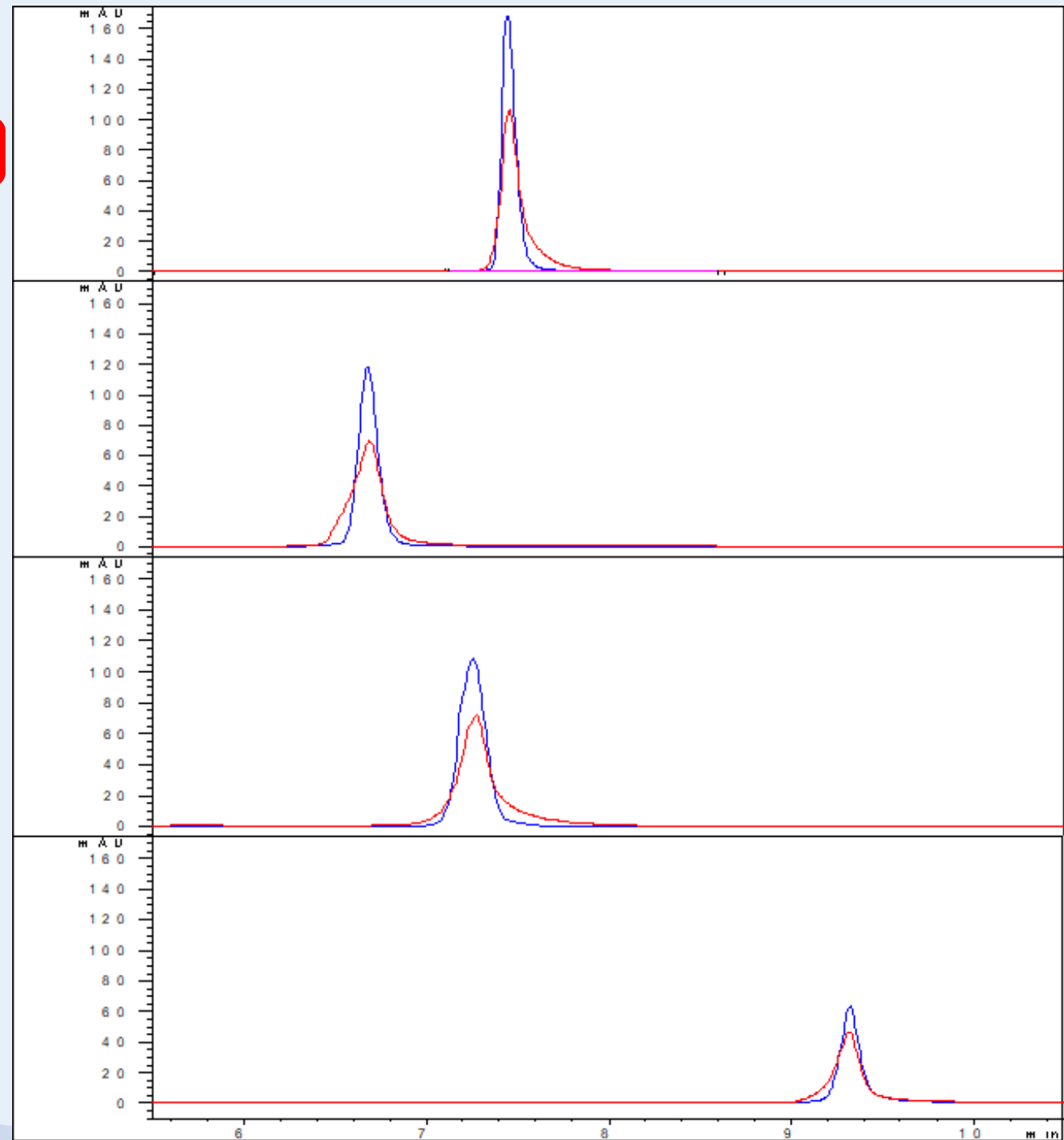
Primerjava RP-HPLC kolon

BioZen C8 ←

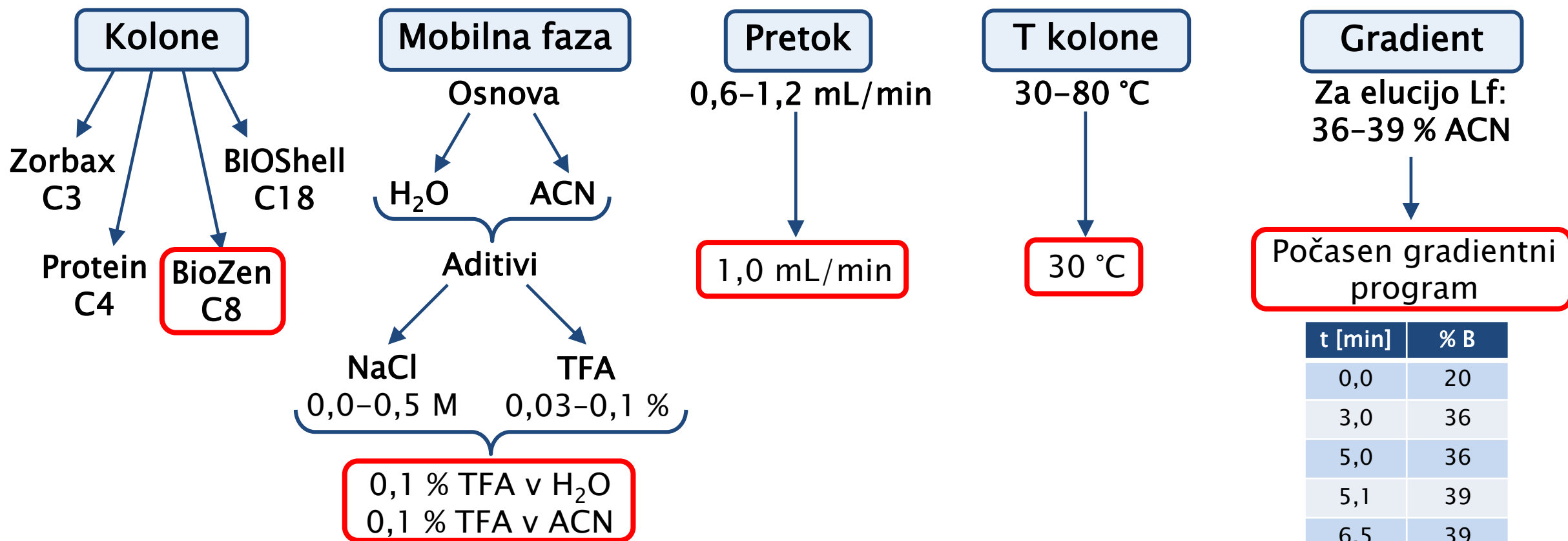
Zorbax C3 ←

BIOShell C18 ←

Protein C4 ←



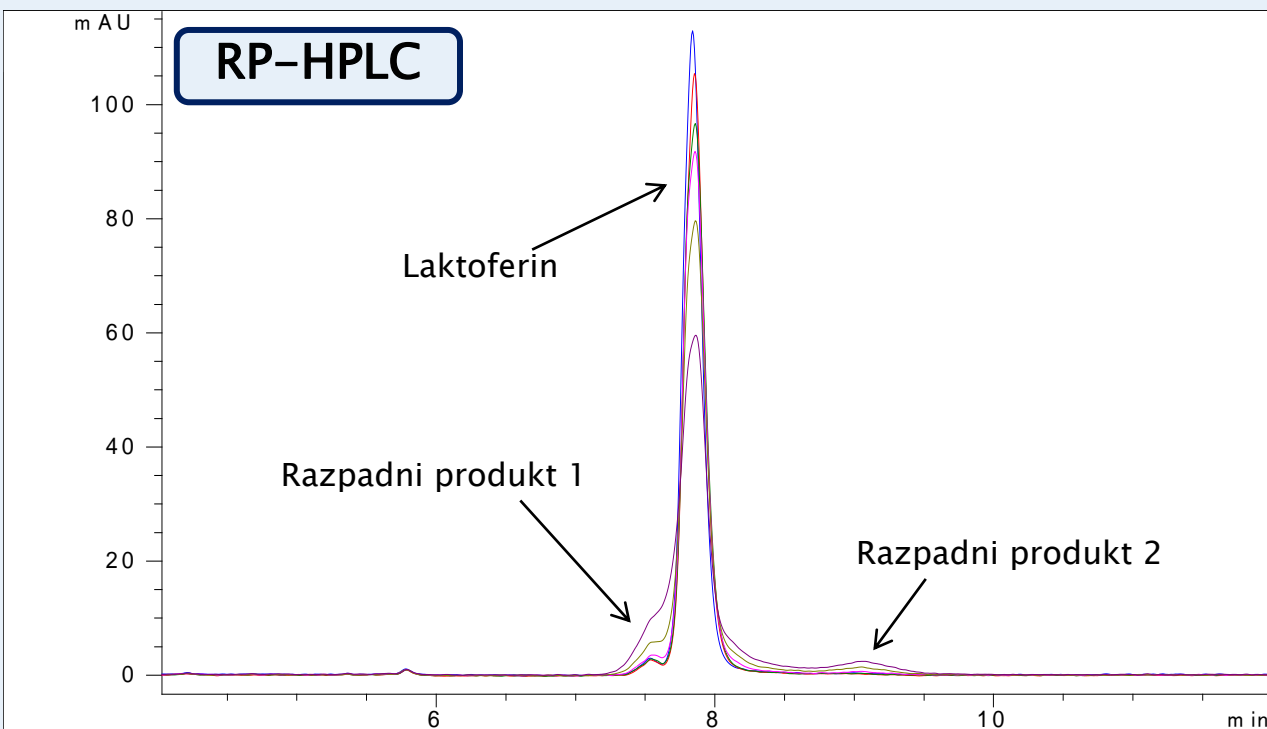
Razvoj RP-HPLC metode za Lf



- ✓ Pri stresnih vzorcih zaznamo do **3 razpadne produkte**.
- ✓ Metodo smo **validirali** v skladu s smernico ICH Q2(R1).

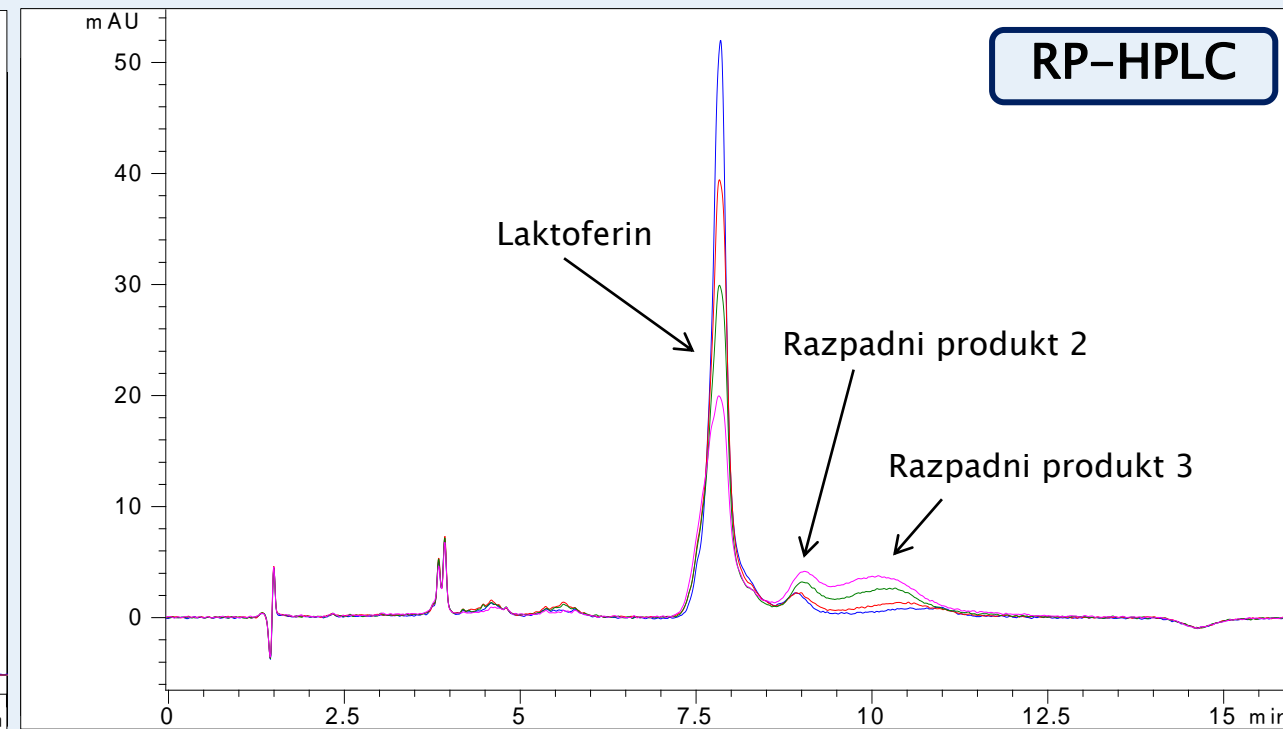
Kromatogrami stresnih vzorcev (RP-HPLC)

Izolat Lf



Vzorec izolata Lf, ki je bil različno dolgo časa (0-4 h) izpostavljen povišani temperaturi ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Izdelek z Lf



Vzorec komercialno dostopnih kapsul z Lf, ki je bil različno dolgo časa (0-1 h) izpostavljen povišani temperaturi ($T = 60\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Razvoj SEC-HPLC metode za Lf

Koloni

BioSep

XBridge

Pretok

0,5–1,0 mL/min

Mobilna faza

Fosfatni pufer

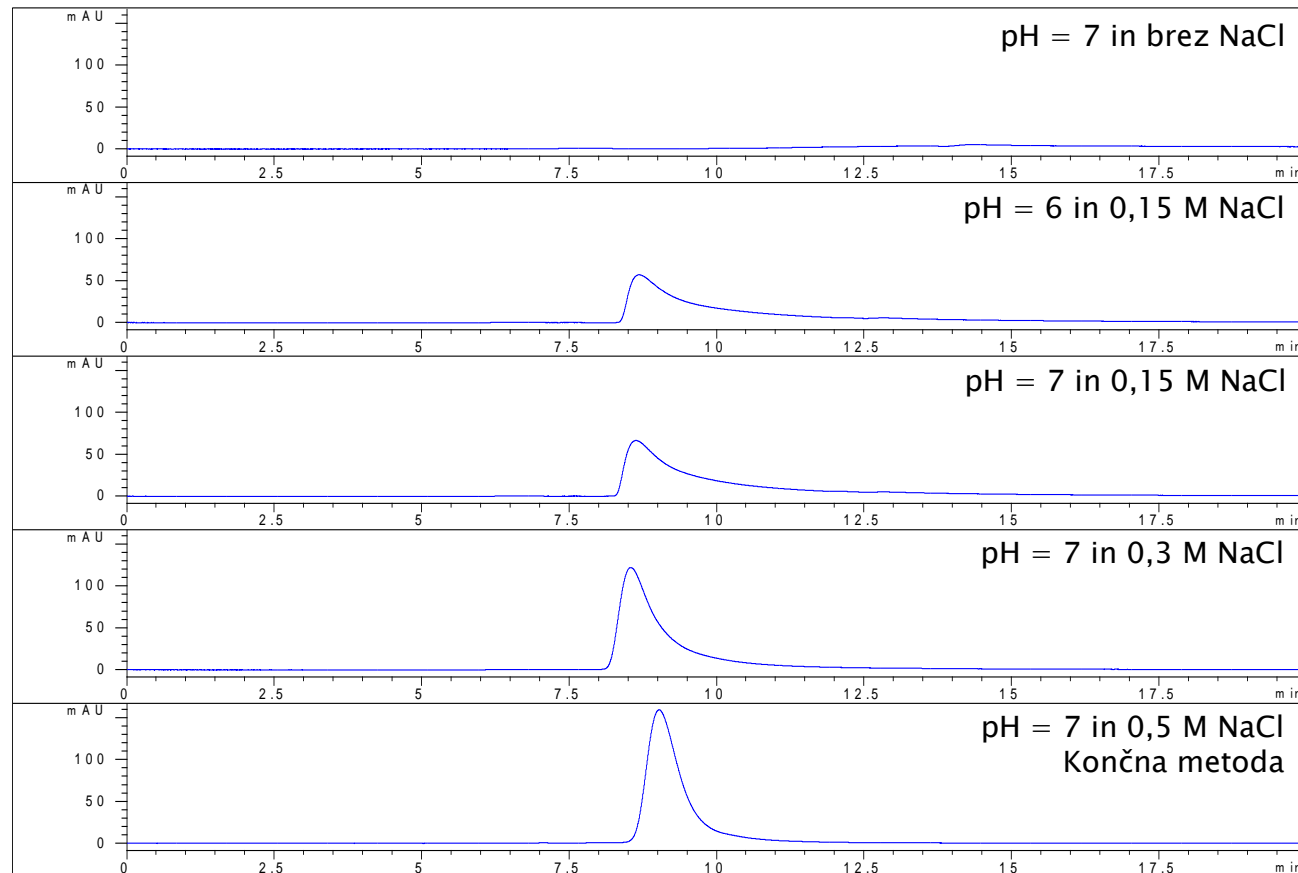
C_{pufra}

pH

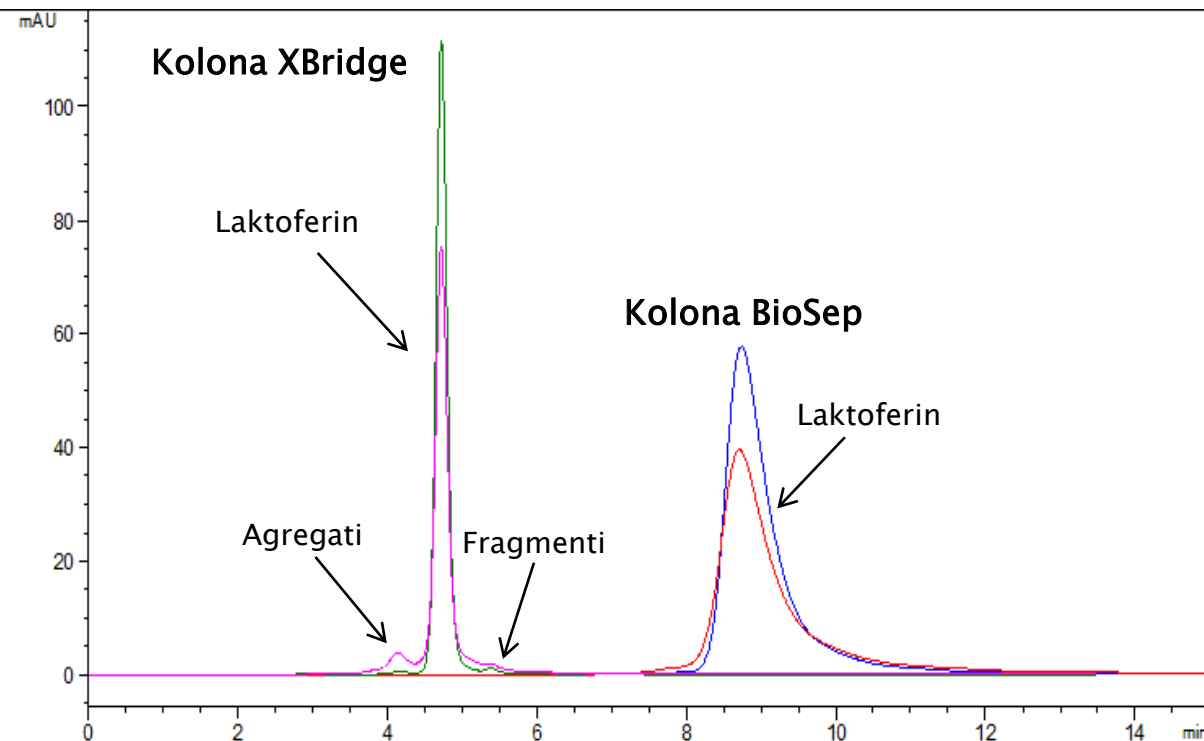
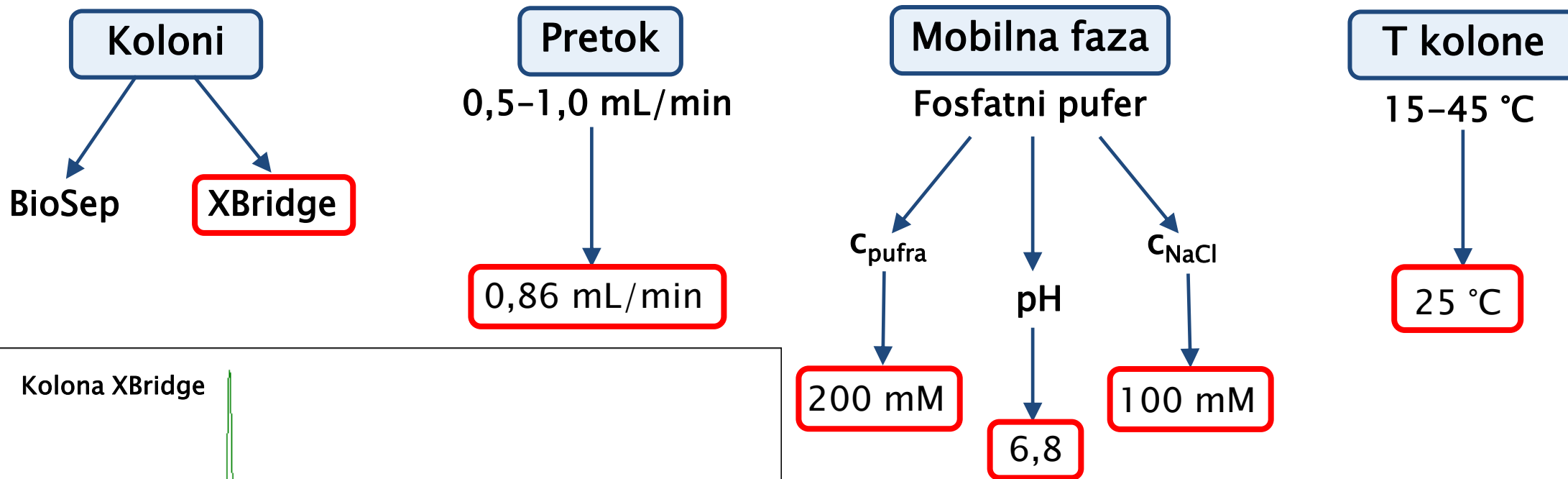
C_{NaCl}

T kolone

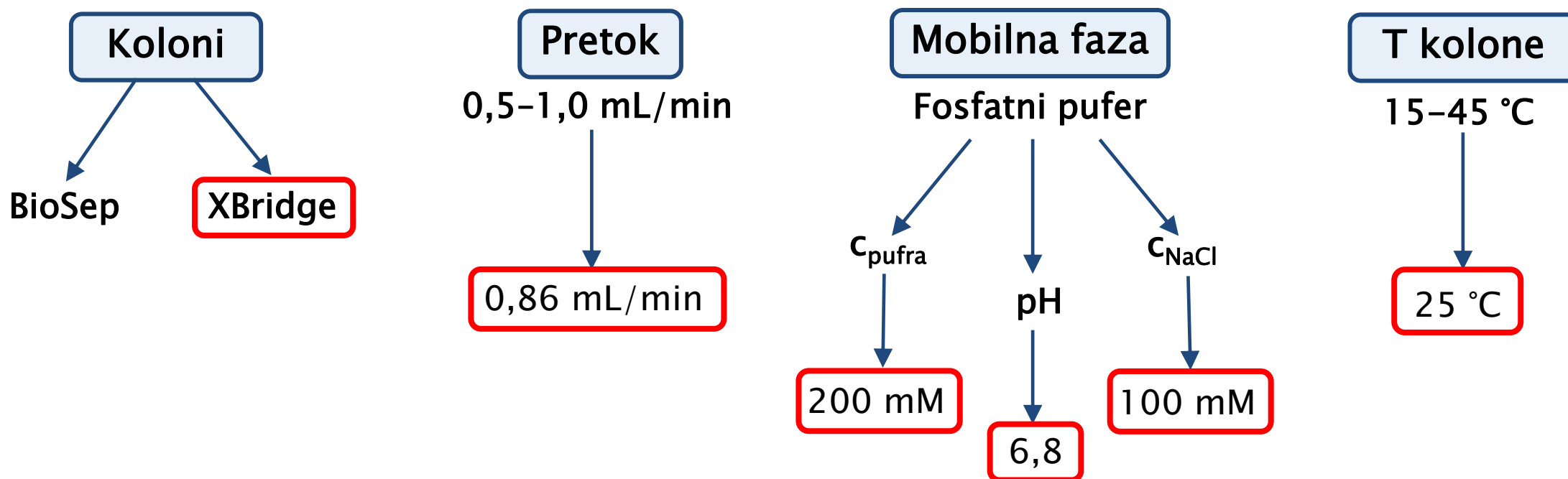
15–45 °C



Razvoj SEC-HPLC metode za Lf

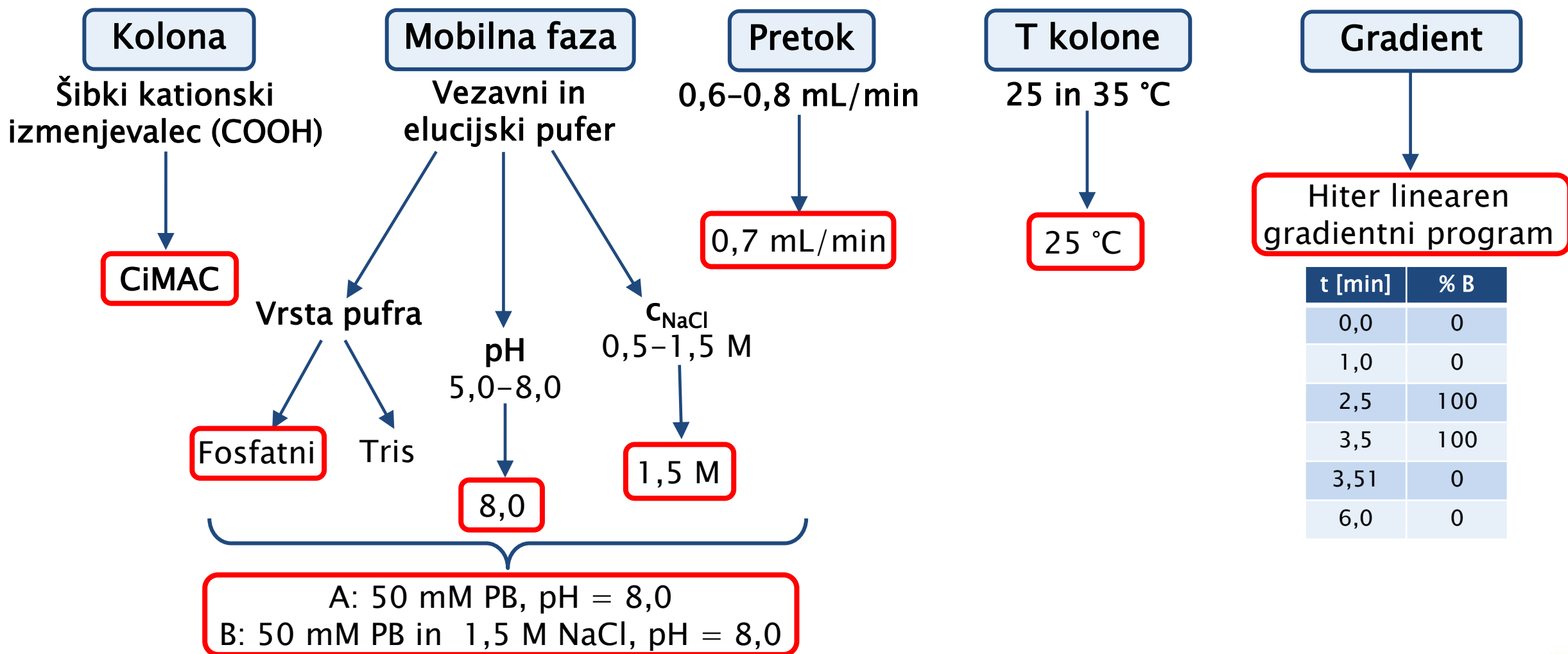


Razvoj SEC-HPLC metode za Lf



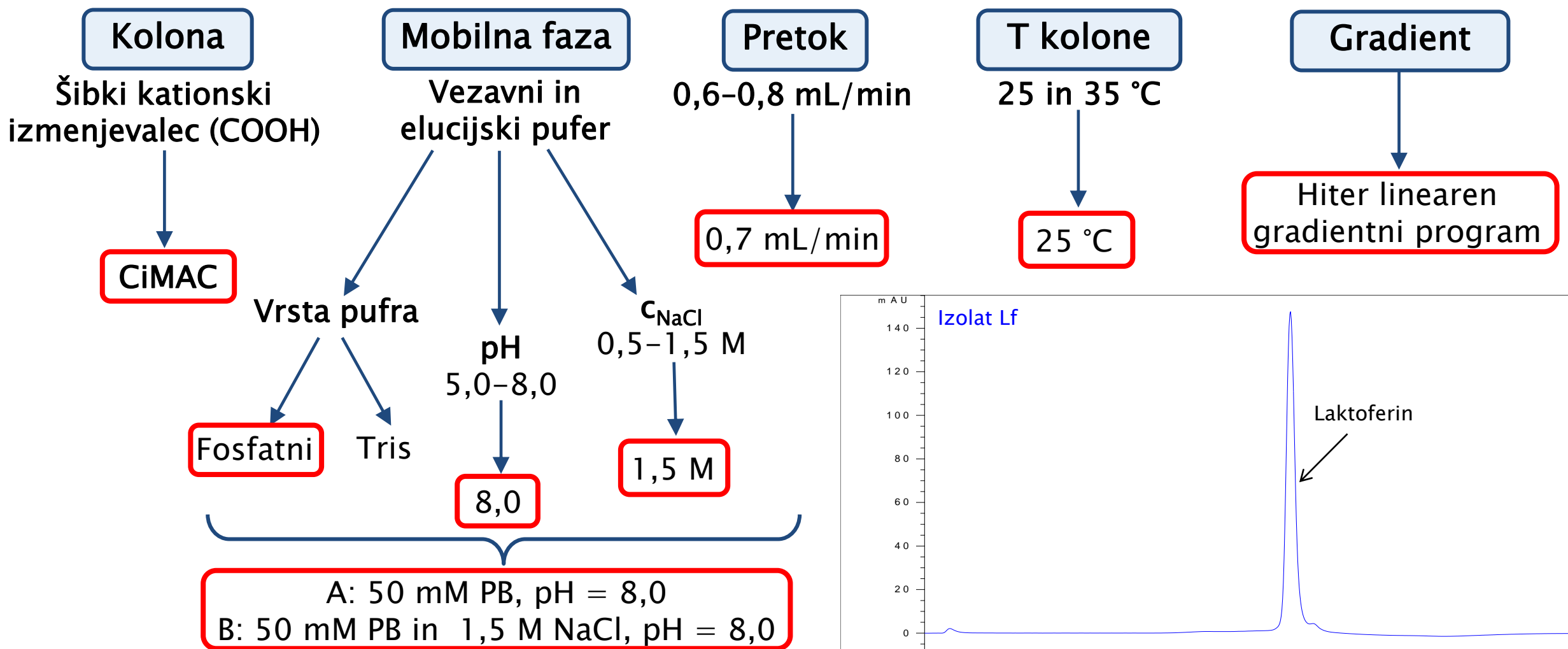
- ✓ Z metodo lahko zaznamo **agregate in fragmente Lf**.
- ✓ Metodo smo **validirali** v skladu s smernico ICH Q2(R1).
- ✓ **Komplementarna metoda**.
- ✗ Slabša kot RP-HPLC metoda z vidika validacijskih parametrov, vpliva medija na odziv in zahtevnejšega rokovanja s kolono.

Razvoj IEC-HPLC metode za Lf



t [min]	% B
0,0	0
1,0	0
2,5	100
3,5	100
3,51	0
6,0	0

Razvoj IEC-HPLC metode za Lf

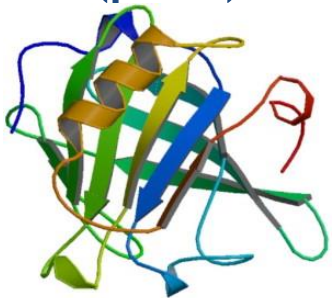


✓ Kratka metoda.

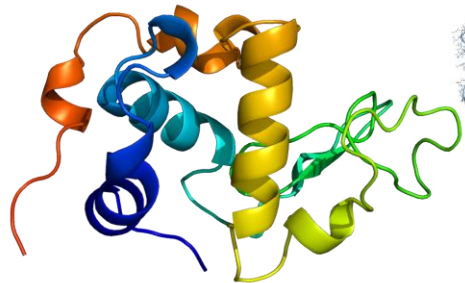
✓ Selektivno določanje Lf (in LPO) ob prisotnosti drugih sirotkinih proteinov.

Razvoj metod za izbrane sirotkine proteine

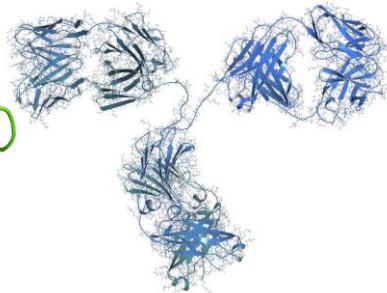
β -laktoglobulin
(β -LG)



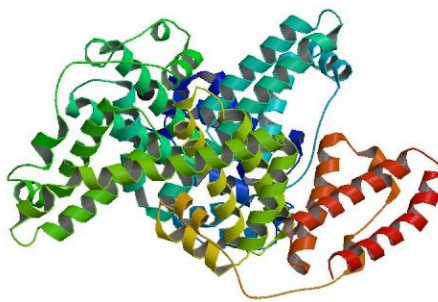
α -laktalbumin
(α -LA)



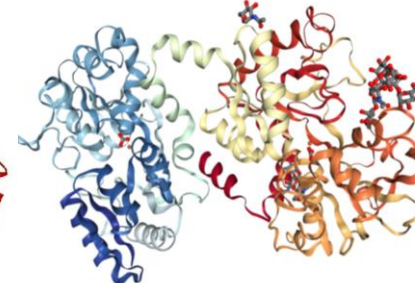
Imunoglobulin G
(IgG)



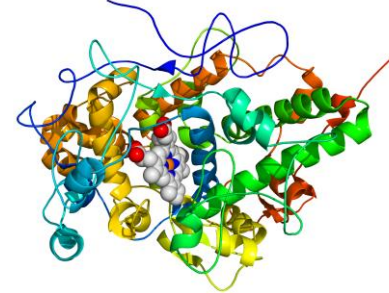
Goveji serumski albumin (BSA)



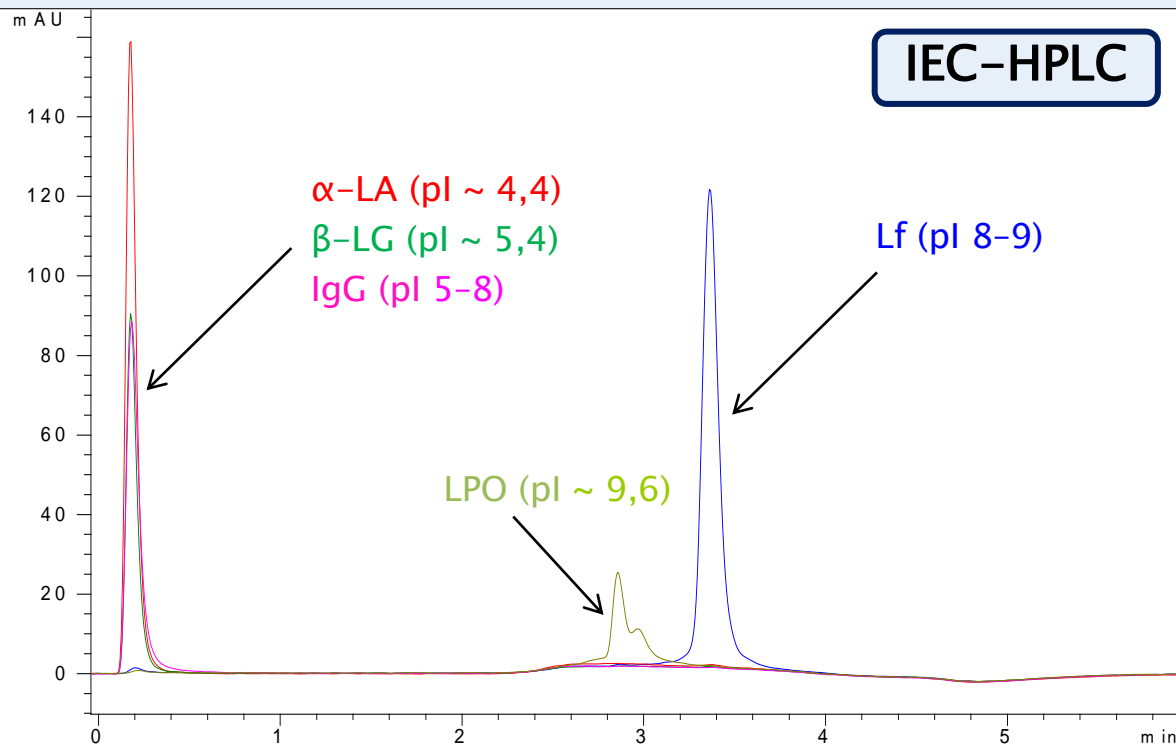
Laktoferin
(Lf)



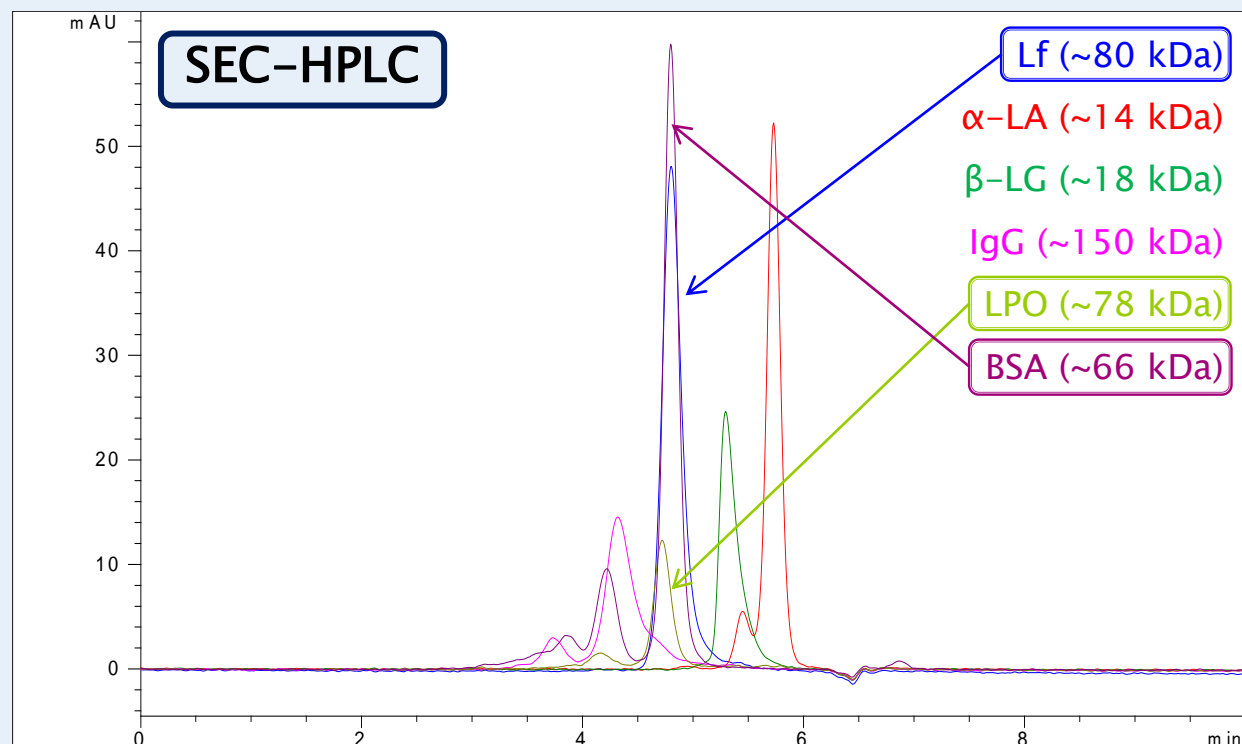
Laktoperoksidaza
(LPO)



IEC-HPLC

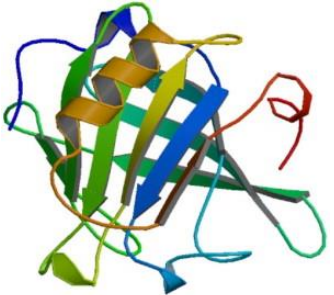


SEC-HPLC

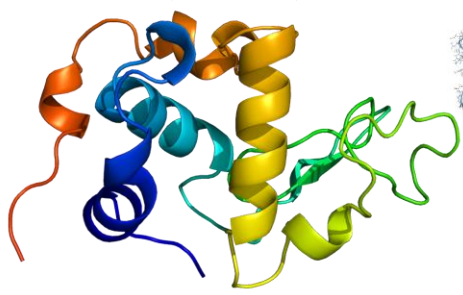


Razvoj metod za izbrane sirotkine proteine

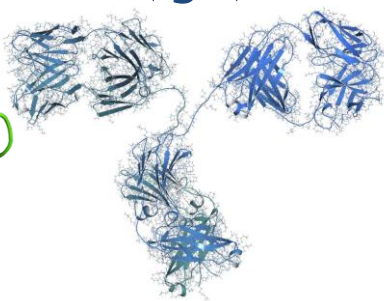
β -laktoglobulin
(β -LG)



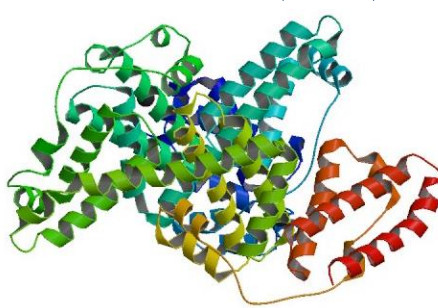
α -laktalbumin
(α -LA)



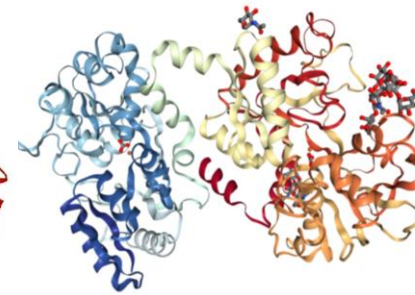
Imunoglobulin G
(IgG)



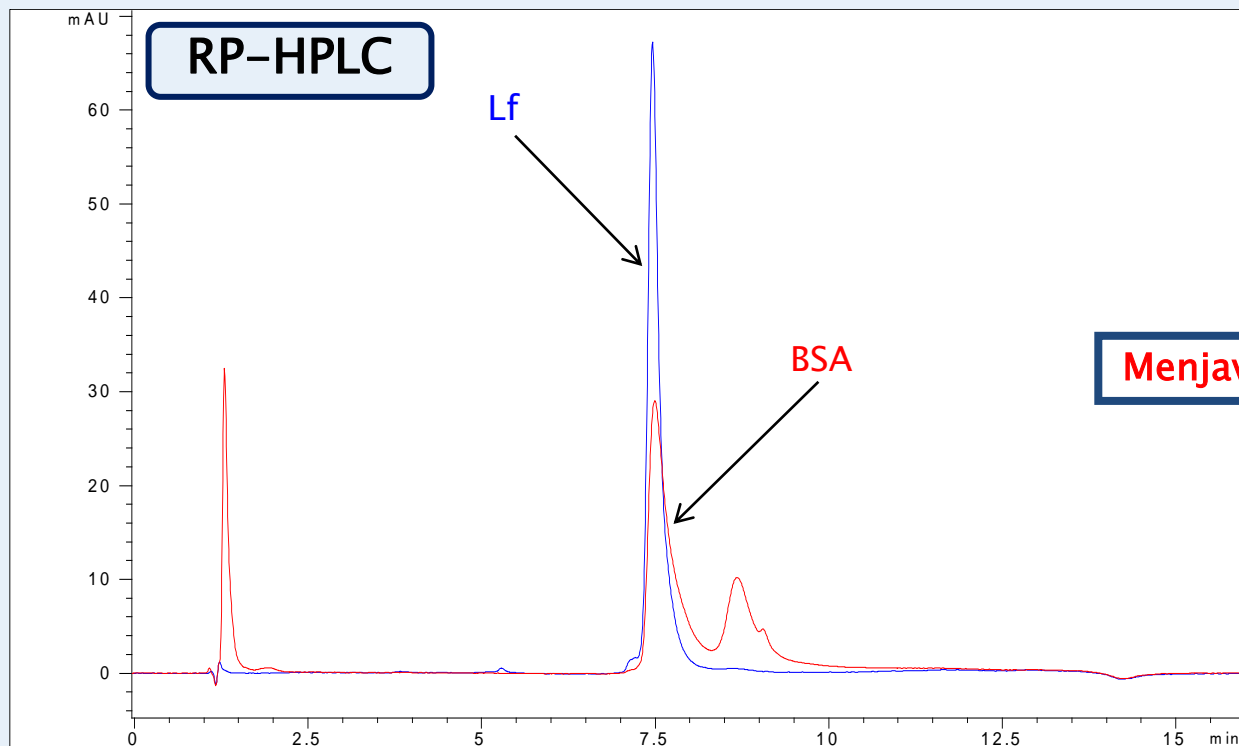
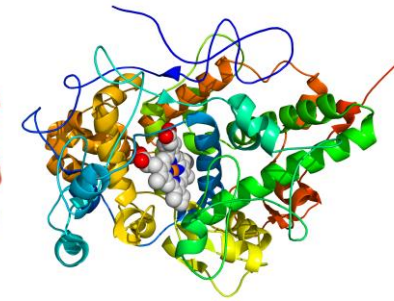
Goveji serumski albumin (BSA)



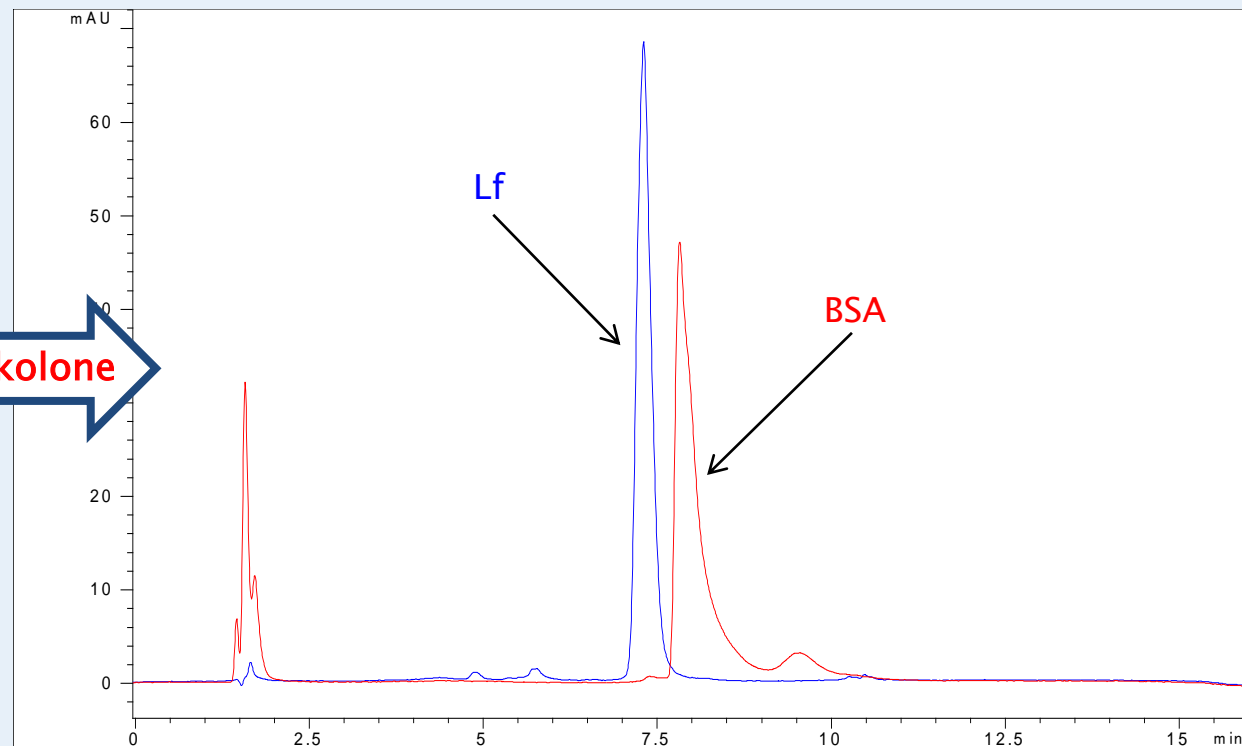
Laktoferin
(Lf)



Laktoperoksidaza
(LPO)

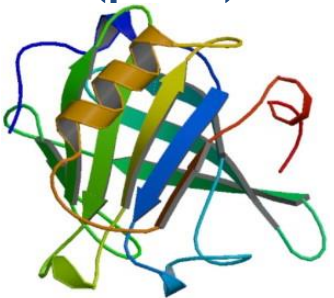


Menjava kolone

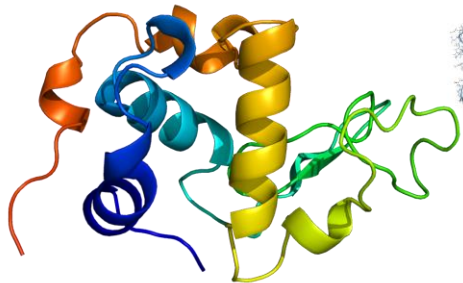


Razvoj metod za izbrane sirotkine proteine

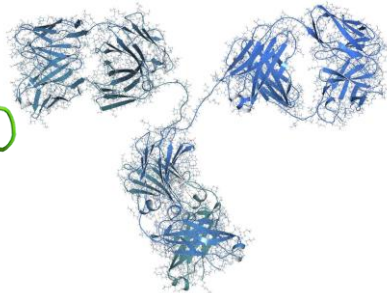
β -laktoglobulin
(β -LG)



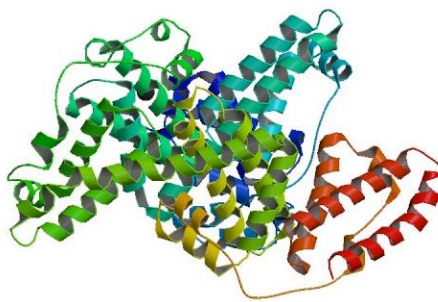
α -laktalbumin
(α -LA)



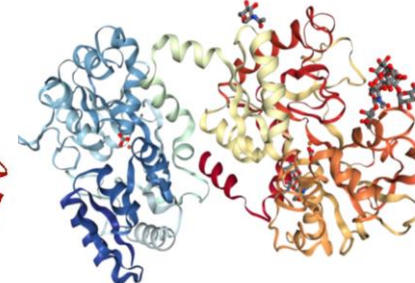
Imunoglobulin G
(IgG)



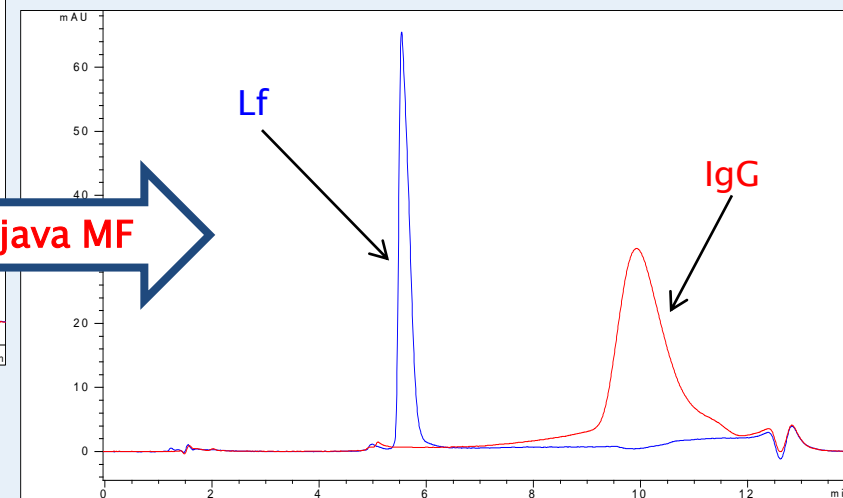
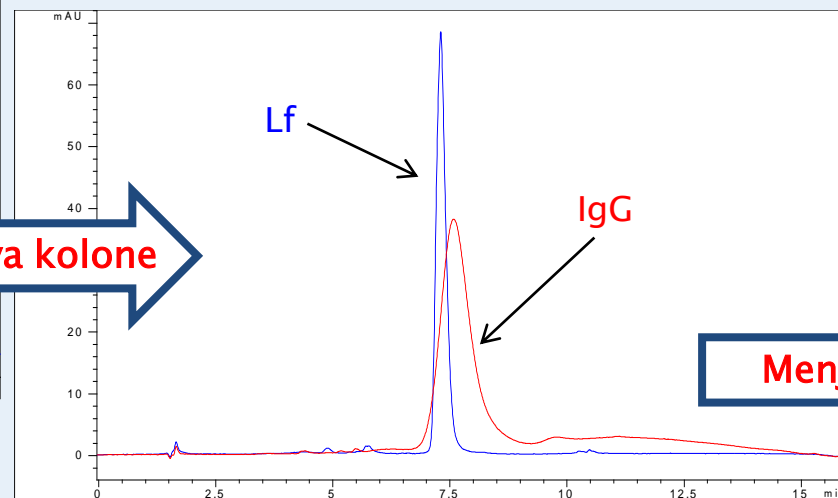
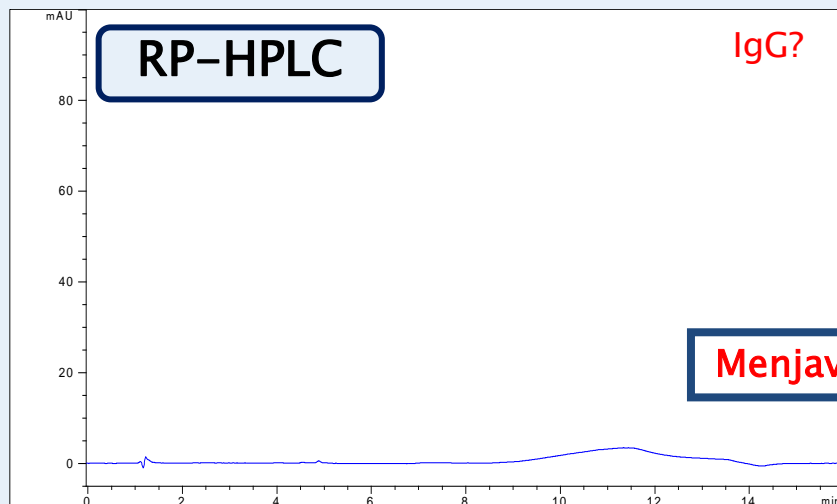
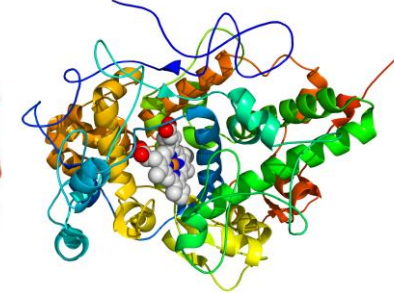
Goveji serumski albumin (BSA)



Laktoferin
(Lf)

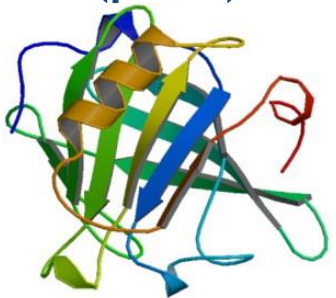


Laktoperoksidaza
(LPO)

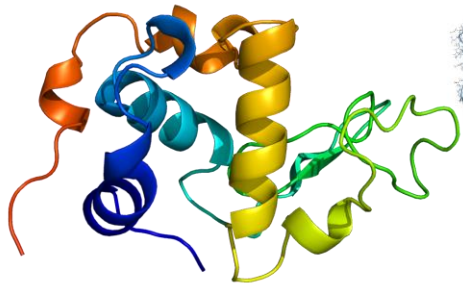


Razvoj metod za izbrane sirotkine proteine

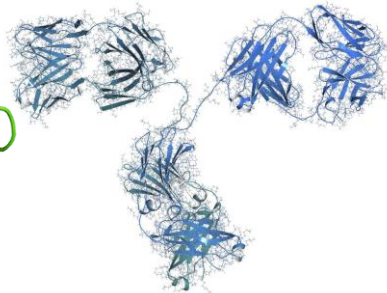
β -laktoglobulin
(β -LG)



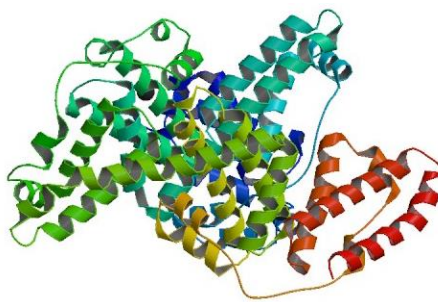
α -laktalbumin
(α -LA)



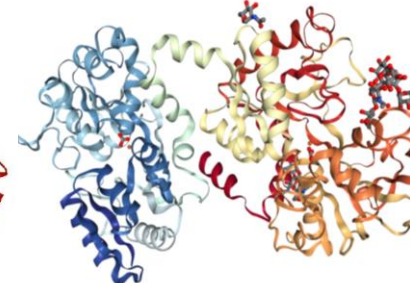
Imunoglobulin G
(IgG)



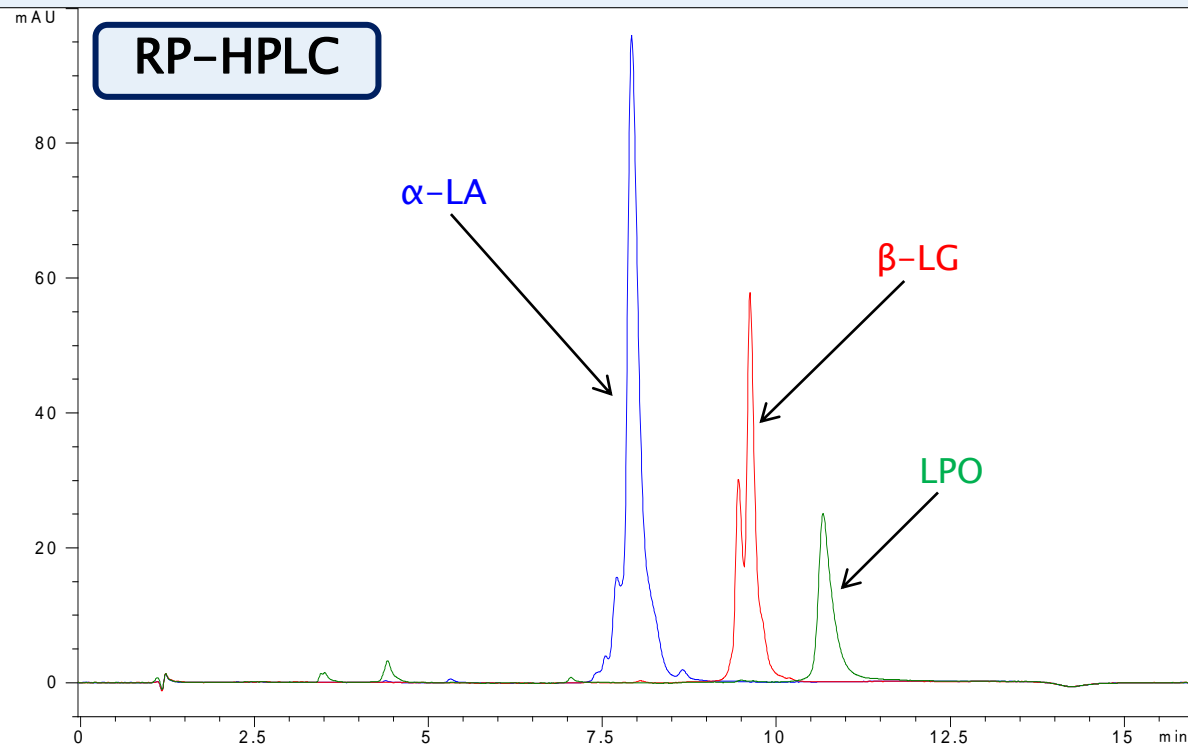
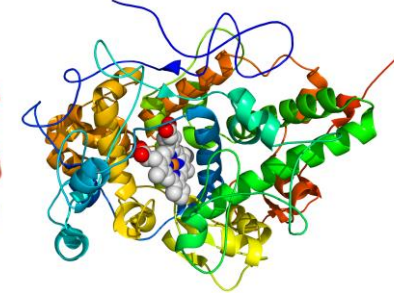
Goveji serumski
albumin (BSA)



Laktoferin
(Lf)

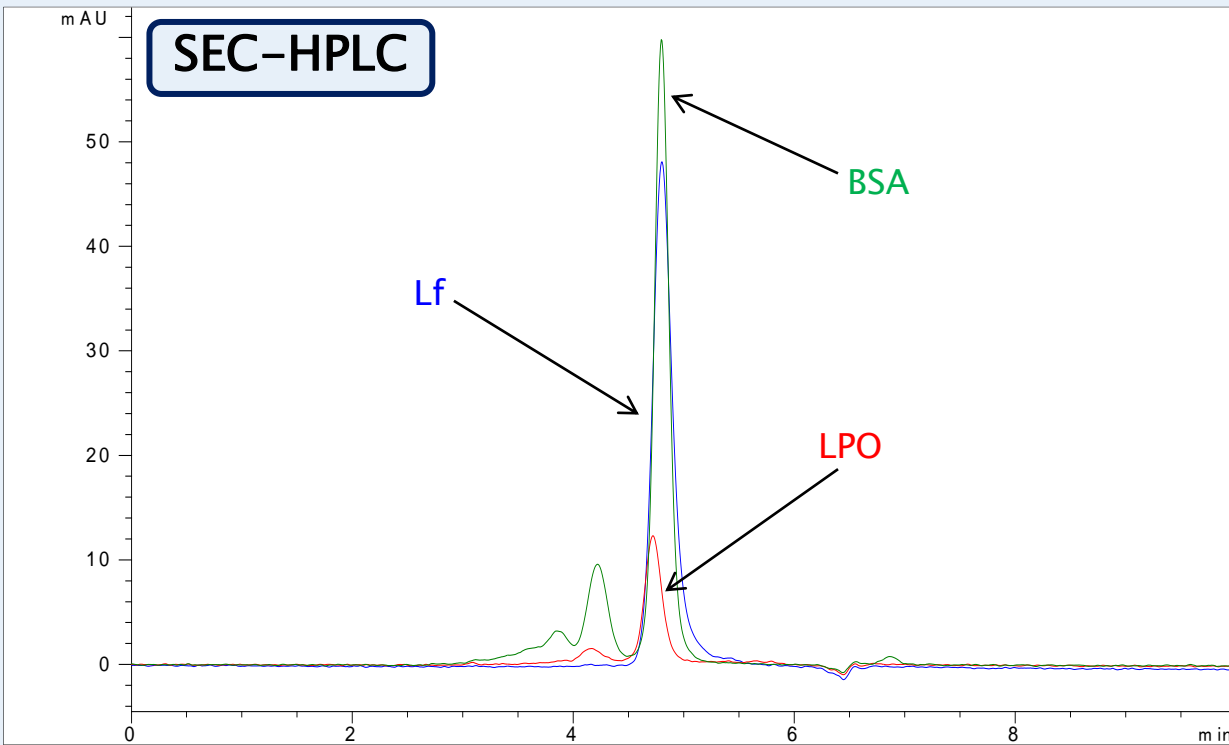


Laktoperoksidaza
(LPO)

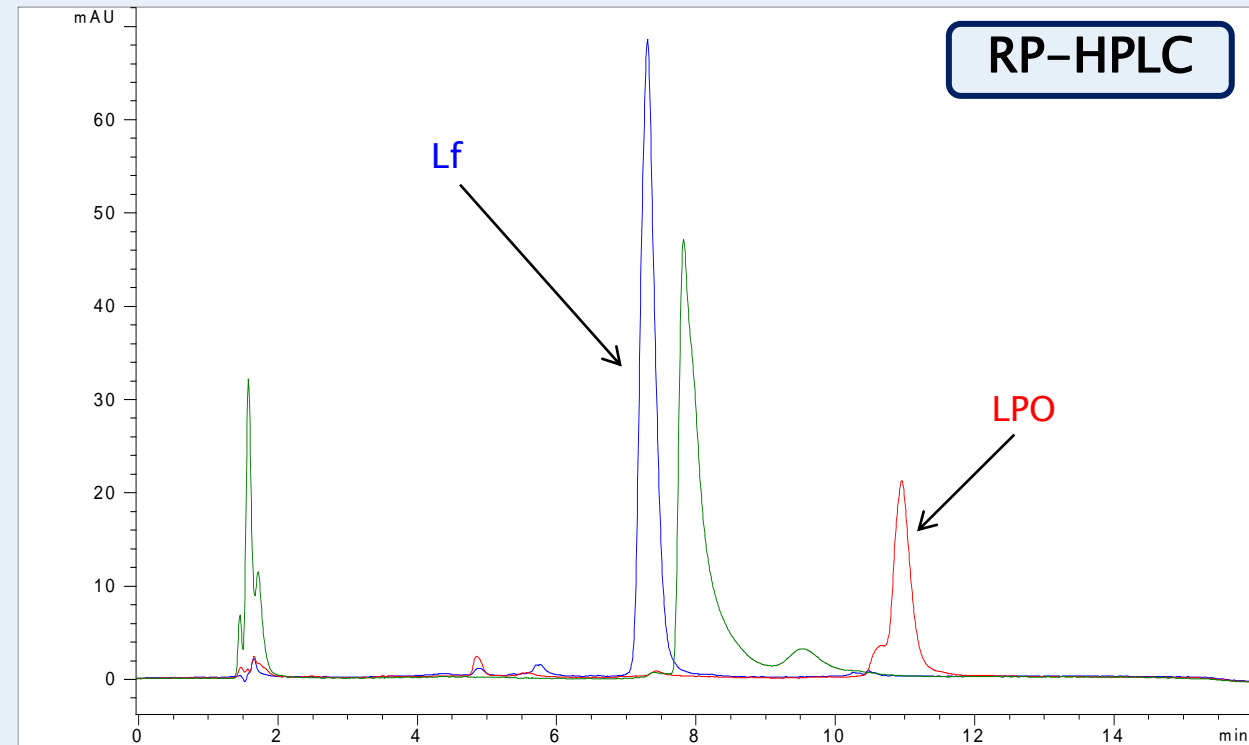


2D-LC

- ▶ Kompleksni vzorci? → Težave z ločbo → Rešitev: 2D-LC?



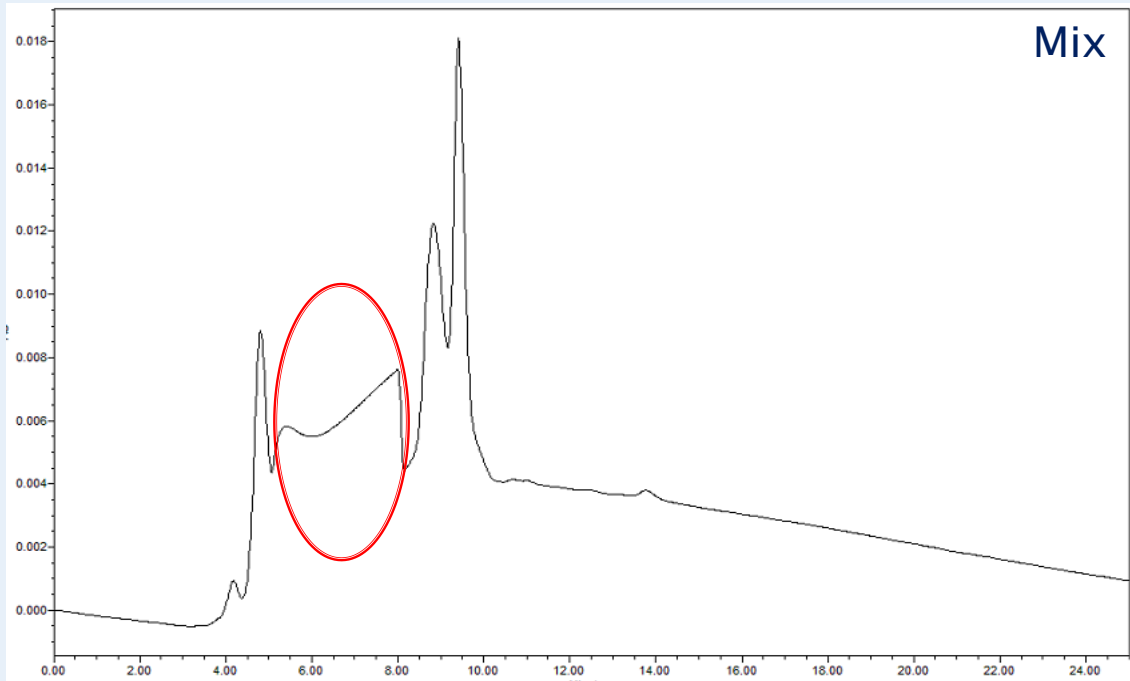
Osnova za 1. dimenzijo 2D-LC metode



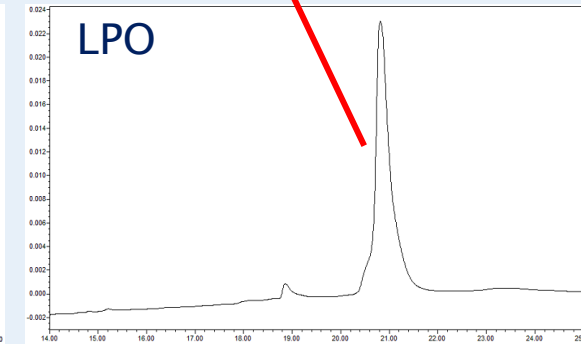
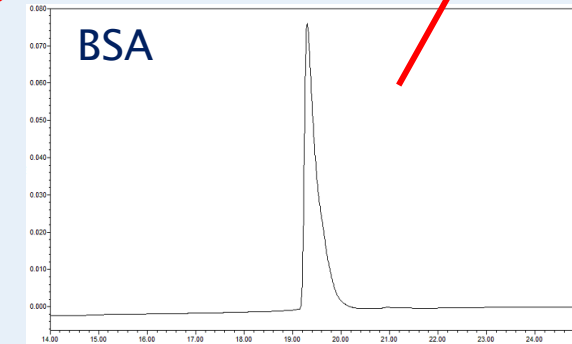
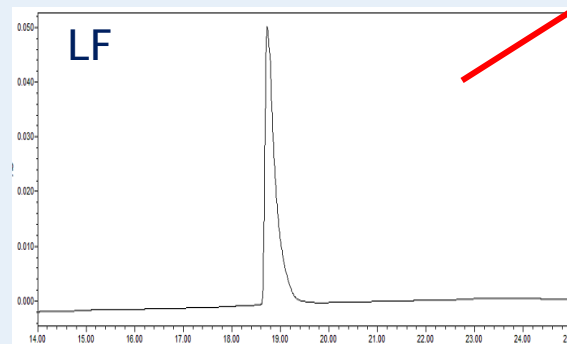
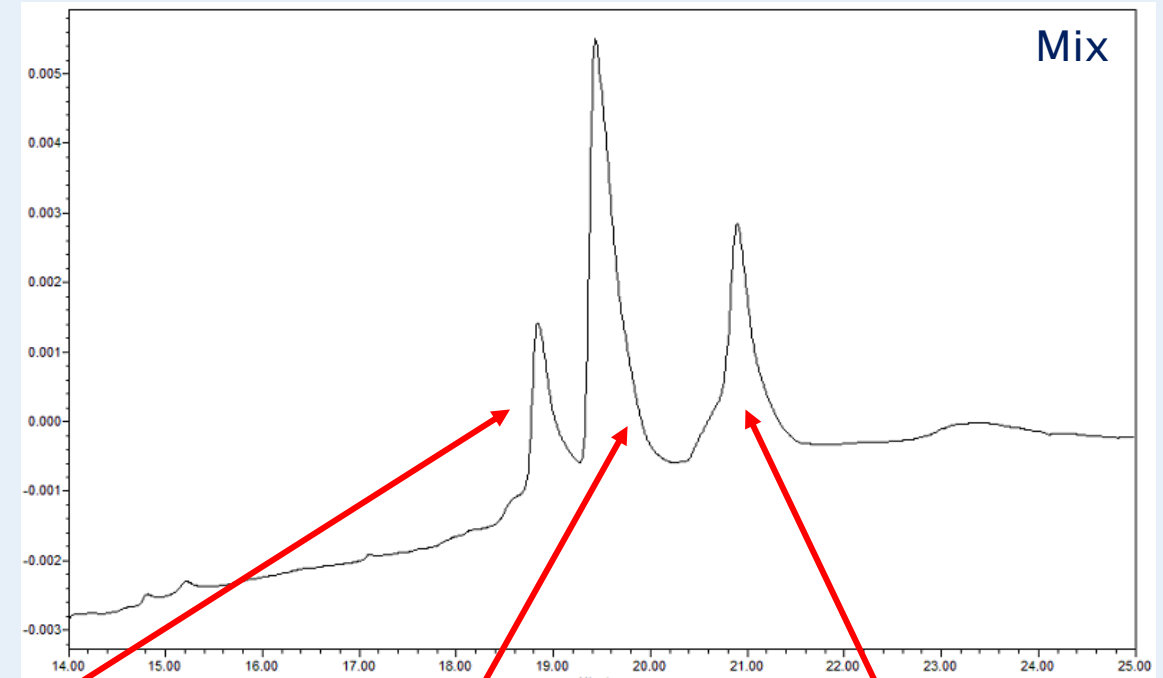
Osnova za 2. dimenzijo 2D-LC metode

2D-LC

1. dimenzija

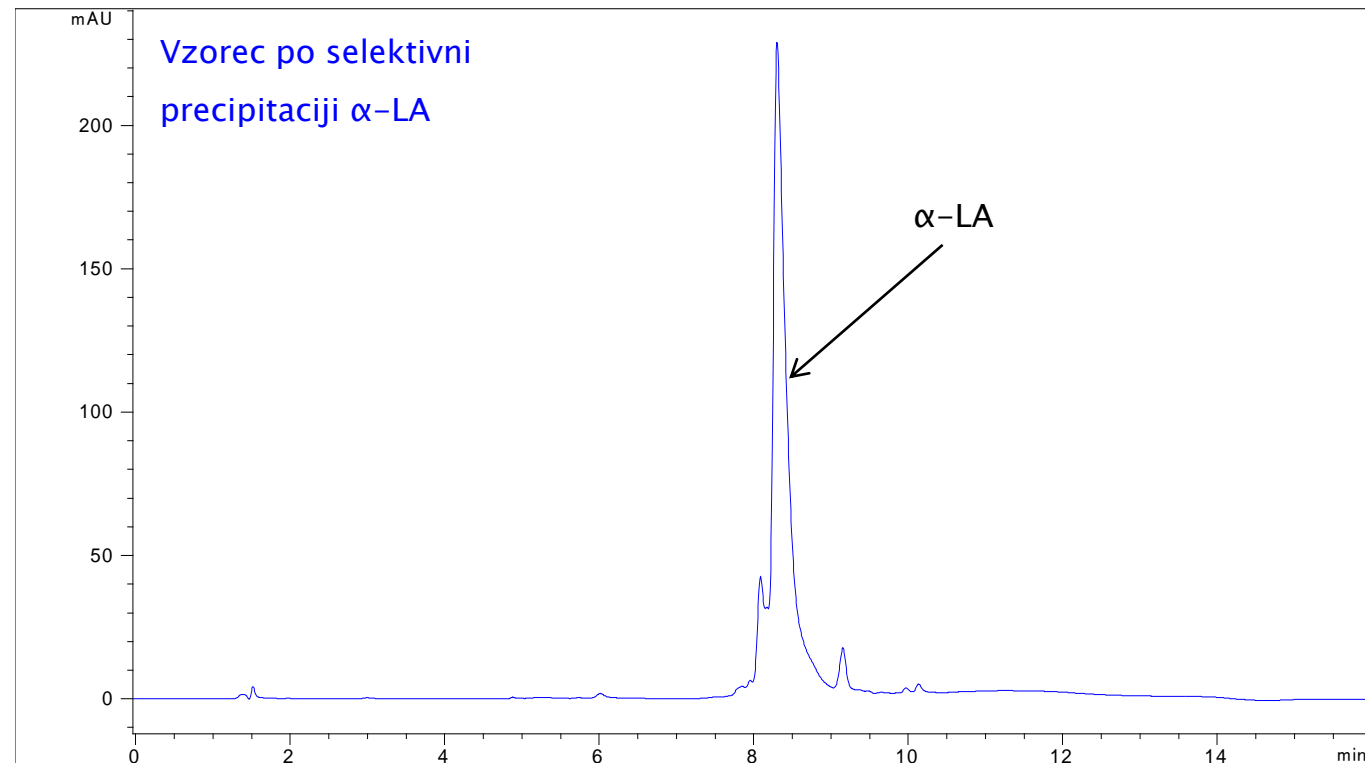


2. dimenzija



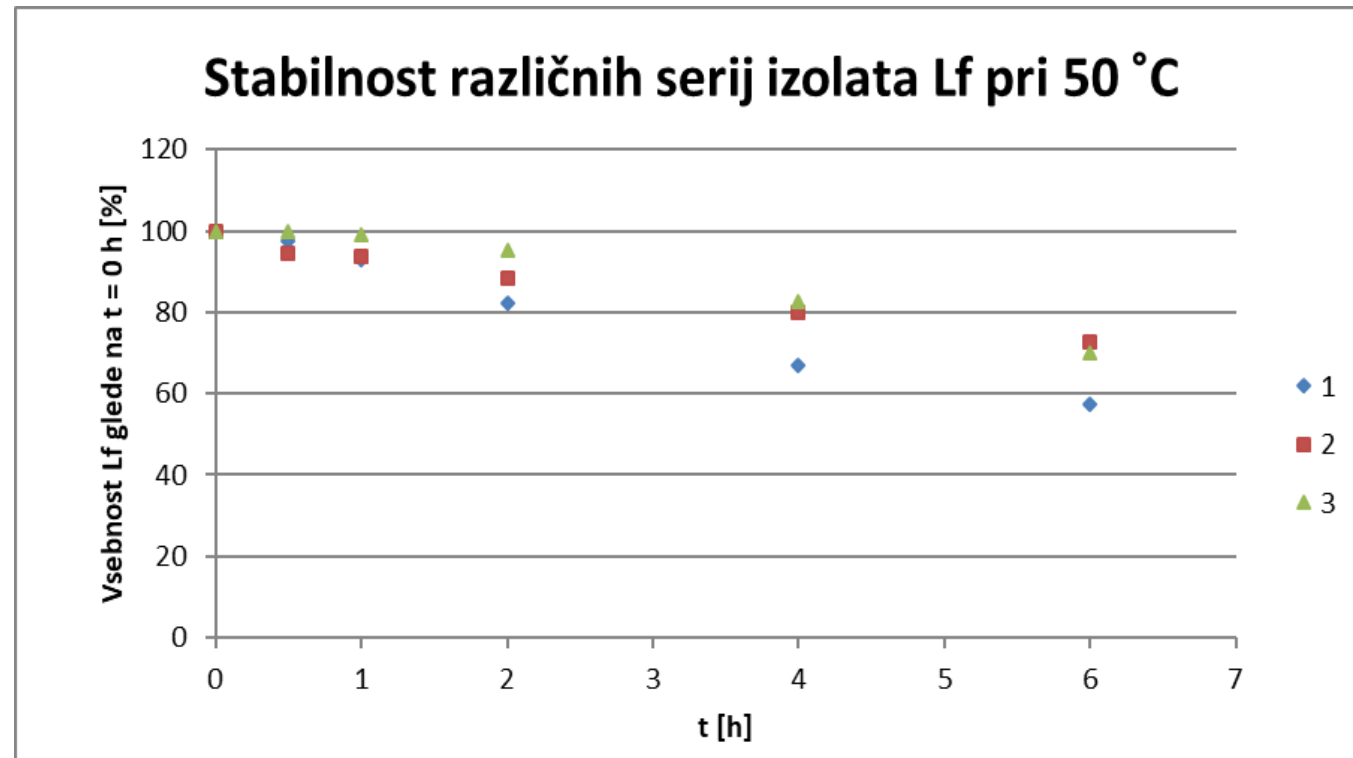
Aplikacija metod

- ▶ Vsebnost sirotkinih proteinov v različnih vzorcih
 - Vrednotenje uspešnosti izolacije proteinov iz sirotke in postopkov čiščenja
 - Vsebnost Lf v komercialno dostopnih prehranskih dopolnilih



Aplikacija metod

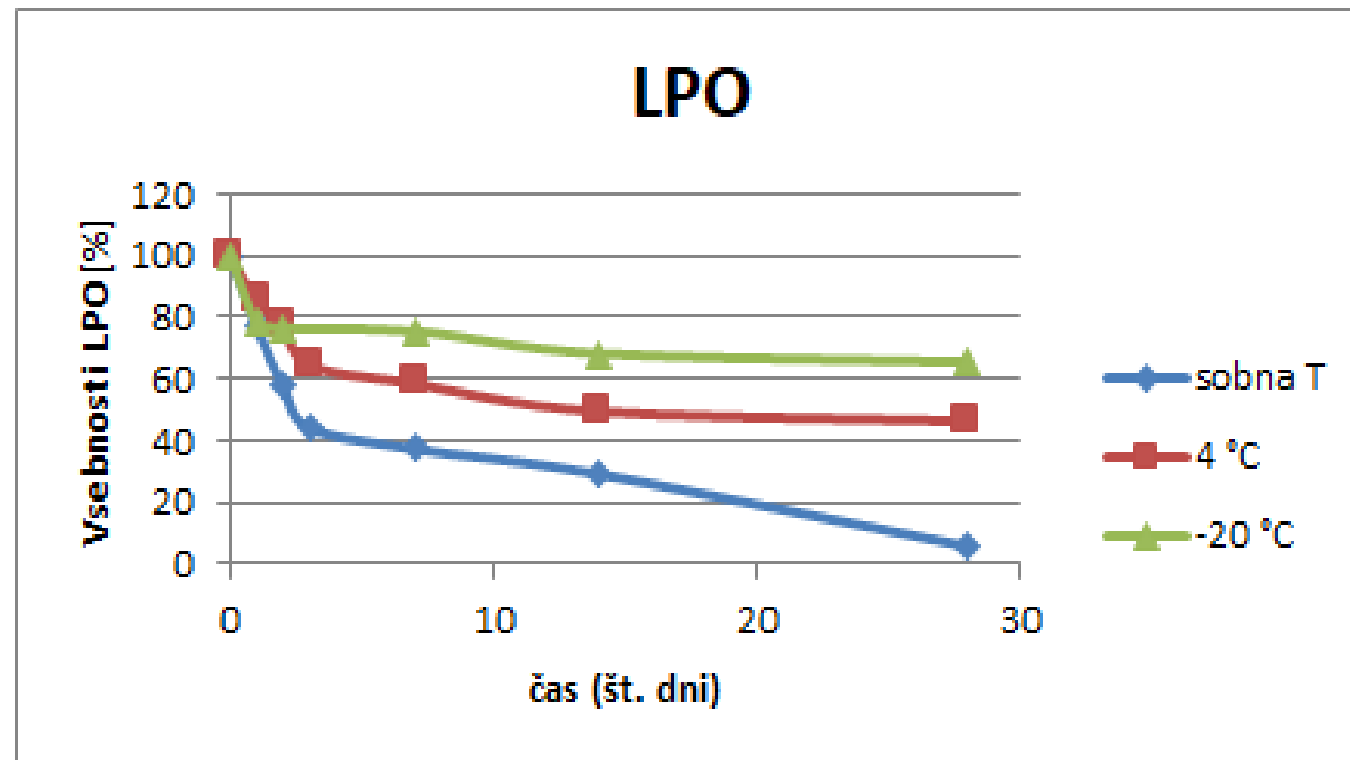
- ▶ Vsebnost sirotkinih proteinov v različnih vzorcih
 - Vrednotenje uspešnosti izolacije proteinov iz sirotke in postopkov čiščenja
 - Vsebnost Lf v komercialno dostopnih prehranskih dopolnilih
- ▶ Stabilnostne študije z Lf in ostalimi sirotkinimi proteini
 - Različne T
 - Različne c Lf
 - Različne serije izolatov in elucij
 - ...



Aplikacija metod

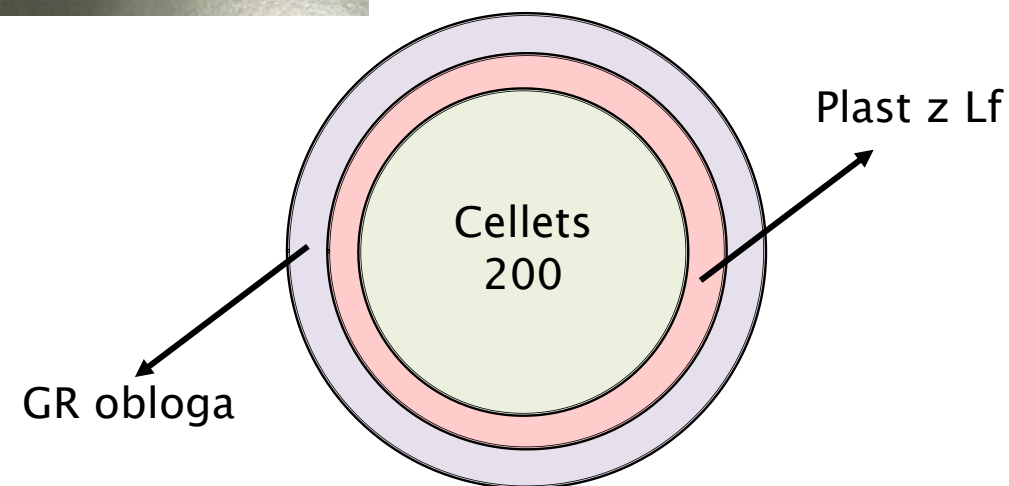
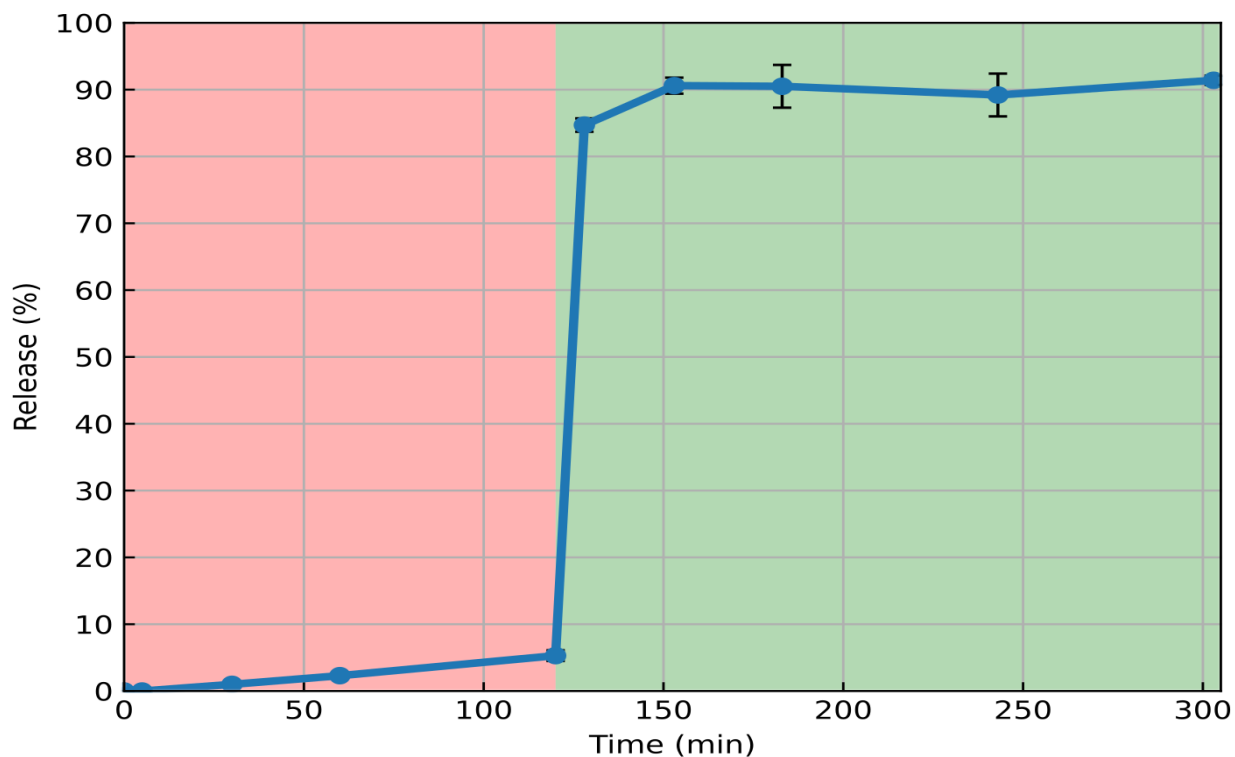
- ▶ Vsebnost sirotkinih proteinov v različnih vzorcih
 - Vrednotenje uspešnosti izolacije proteinov iz sirotke in postopkov čiščenja
 - Vsebnost Lf v komercialno dostopnih prehranskih dopolnilih

- ▶ Stabilnostne študije z Lf in ostalimi sirotkinimi proteini
 - Različne T
 - Različne c Lf
 - Različne serije izolatov in elucij
 - ...



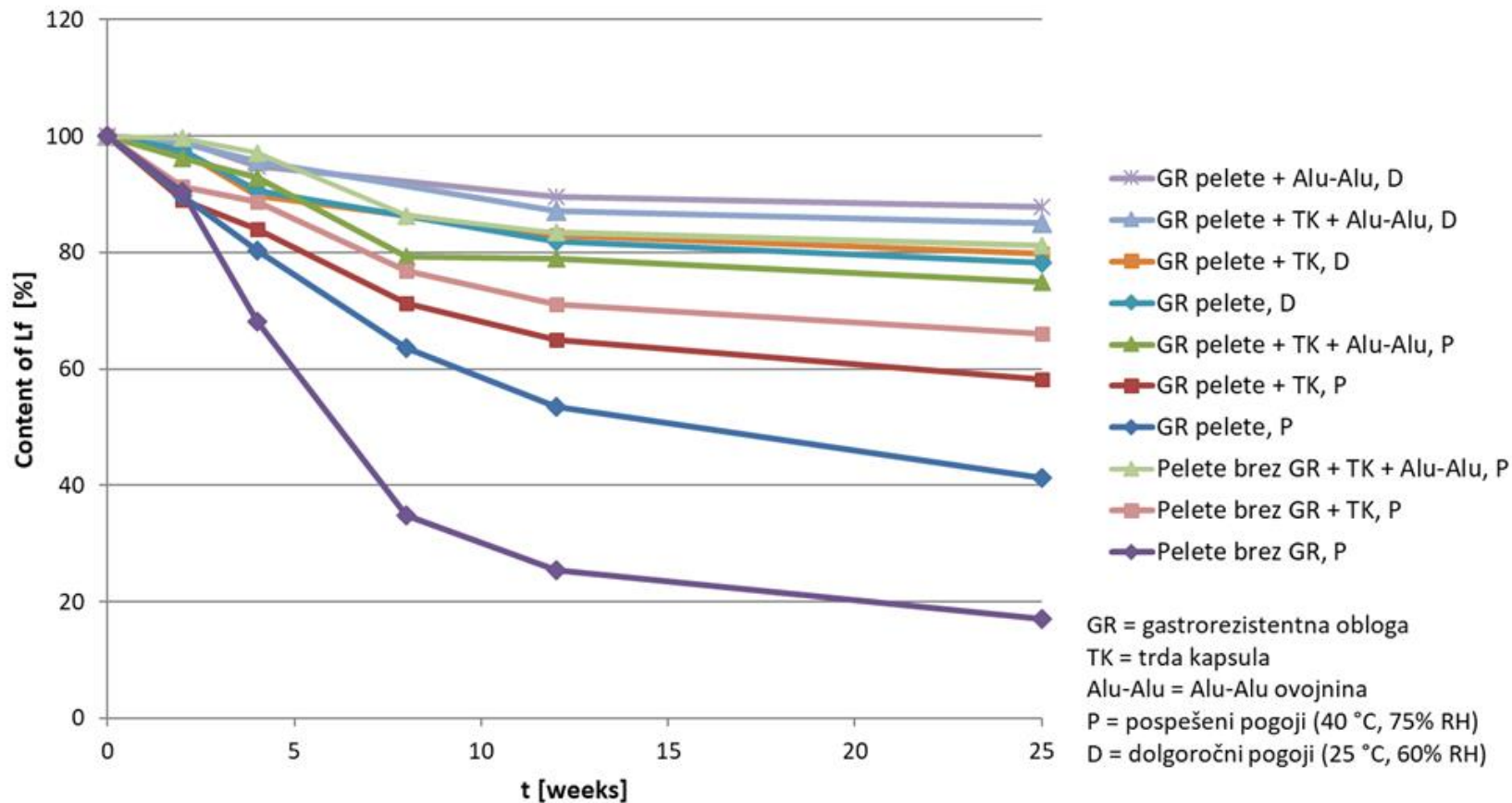
Aplikacija metod

- ▶ Analitska podpora razvoju formulacije z Lf
 - Vsebnost Lf v izhodnem materialu za izdelavo formulacij
 - Vsebnost Lf v formulacijah z Lf (pelete, GR pelete, mikrosfere)
 - Koncentracija Lf po sproščanju



Aplikacija metod

- ▶ Stabilnostna študija – pelete z Lf: vpliv pogojev shranjevanja in ovojnine na stabilnost Lf



Patentna prijava (Grilc B., Bjelošević M., Roškar R., Osel N., Kristl A., Gašperlin M.): Farmaceutvska formulacija z laktoferinom, za ohranjanje zdravega ravnovesja črevesne mikrobiote

Sklepi

LAKTIKA

- ▶ Razvoj ustrezne analizne metodologije je nujen za ovrednotenje vsebnosti in stabilnosti sirotkinih proteinov
- ▶ Uporaba na številnih področjih v okviru projekta Laktika
- ▶ Objavljen raziskovalni članek
- ▶ Vložena patentna prijava za razvito formulacijo z Lf
- ▶ Pogled naprej: LC–MS?



Article

Stability-Indicating Analytical Approach for Stability Evaluation of Lactoferrin

Nika Osel, Timeja Planinšek Parfant, Albin Kristl and Robert Roškar *

Pharmaceutical composition with lactoferrin for regulation of healthy balance of human intestine microbiota

Authors: Blaž Grilc, Maja Bjelošević, Nika Osel, Robert Roškar, Albin Kristl, Mirjana Gašperlin

HVALA ZA POZORNOST!

- ▶ Hvala soavtorjem in ostalim sodelujočim pri projektu Laktika.



- ▶ Zahvala gre tudi podjetju Labtim (2D-LC).



- ▶ Raziskava je bila financirana s projektom LAKTIKA – Frakcioniranje in oplemenitenje sirotkinih proteinov ter izraba preostanka za oblikovanje novih funkcionalnih živil in prehranskih dopolnil (OP20.03521) Operativnega programom za izvajanje evropske kohezijske politike v obdobju 2014–2020.