

多种油脂肪乳注射液制备工艺与质量评价的初步研究

刘芙蓉, 王 银, 杨雅静, 毛声俊, 金 辉*

(四川大学华西药学院 靶向药物及释药系统教育部重点实验室 四川 成都 610041)

摘要: 目的 研制多种油脂肪乳注射液并初步考察其质量。方法 参考原研制剂 SMOFlipid® 的处方组成, 采用二步法制备多种油脂肪乳注射液, 以外观性状、粒径、pH 值、含量和有关物质等为评价指标, 考察乳化温度、卵磷脂加入方式、初乳剪切转速、时间以及高压均质压力、灭菌温度等关键工艺参数对产品质量的影响, 由此确定样品的制备工艺。在此基础上, 采用溶血性、血管刺激性试验初步评价样品的安全性; 采用长期试验法考察其稳定性。结果 优选的制备工艺为乳化温度 60 °C、剪切速度 $1.9 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、剪切时间 10 min、均质压力 8000 psi、灭菌条件 121 °C、8 min。自制多种油脂肪乳注射液的平均粒径为 306.9 nm, Zeta 电位为 -30 mV, 在 25 °C 条件下稳定性良好, 溶血性、血管刺激性检查均符合要求。结论 温度与时间、高压均质压力、灭菌条件等因素对初乳的质量影响较大, 应进行严格控制, 自制产品的质量可达到原研制剂相关质量标准的要求。

关键词: 多种油脂肪乳; SMOF; 鱼油; 橄榄油; 肠外营养; 制备工艺; 质量研究; 特殊安全性

中图分类号: R94

文献标志码: A

文章编号: 1006-0103(2017)03-0234-04

DOI: 10.13375/j.cnki.wjps.2017.03.004

The pilot study of preparation and quality evaluation of multi-oil fat emulsion injection

LIU Furong, WANG Yin, YANG Yajing, MAO Shengjun, JIN Hui*

(Key Laboratory of Drug Targeting and Drug Delivery System, Ministry of Education, West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To study the preparation of multi-oil fat emulsion injection and evaluate it preliminarily. **METHODS** Referring to the original prescription of SMOFlipid®, two-step method was adopted to prepare the lipid emulsion. The appearance characters, particle size, pH value, content and related substances were taken as the indexes to select and determine the optimal preparation technology of multi-oil fat emulsion injection, and the influencing factors, including the emulsifying temperature, the way adding lecithin, the shearing speed and time, the homogenizing pressure and the sterilization temperature, were investigated. Then, hemolysis and vascular stimulation tests *in vivo* were used to investigate the security, and long-term trials were used to investigate its stability. **RESULTS** The optimized preparation process was emulsifying under 60 °C and shearing 10 mins with $1.9 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ to prepare the initial emulsion, homogenizing at the pressure of 8000 psi, sterilizing at 121 °C in 8 min. The average diameter of the self-made lipid emulsion was 306.9 nm with a Zeta potential of -30 mV. It could stay stable at 25 °C, and without hemolysis and vascular stimulation. **CONCLUSION** It should be strictly controlled for the time and emulsifying temperature as well as the pressure of homogenizing and the sterilization temperature have greater impacts on the quality of the final emulsion. The quality of self-made lipid emulsion meets the requirements of the original agent.

Key words: Multi-oil fat emulsion injection; SMOF; Fish oil; Olive oil; Parenteral nutrition; Preparation technology; Quality evaluation; Special safety test

CLC number: R94

Document code: A

Article ID: 1006-0103(2017)03-0234-04

脂肪乳静脉注射液作为肠外营养的重要能量来源, 在为围手术期病人及危重患者提供营养支持方面发挥着重要作用^[1]。多种油(SMOF, soybean oil, medium-chain triglycerides, olive oil and fish oil)脂肪乳注射液是继长链脂肪乳、中长链脂肪乳的最新一代脂肪乳注射液^[2]。制剂处方中鱼油的引入降低了 $\omega-6$ 与 $\omega-3$ 多不饱和脂肪酸的比例, 减小了炎症反应与血栓形成的风险; 橄榄油的加入则提高了乳剂中 $\omega-9$ 单不饱和脂肪酸的比例, 减少了过

氧化反应; 脂肪酸比例的优化和平衡使 SMOF 达到了营养供能、免疫调节和治疗作用的协调统一, 是目前临床急需的肠外营养液^[3]。迄今为止中国尚无该药的仿制产品, 难以满足市场需求。现对 SMOF 脂肪乳注射液的制备工艺及其质量评价进行了初步研究。

1 实验部分

1.1 仪器、试药与动物

HENC 高速剪切仪(德尔特混合设备有限公

作者简介: 刘芙蓉(1992—), 女, 正攻读药剂学专业的硕士学位。Email: 928980984@qq.com

* 通信作者(Correspondent author) Email: jinhui_1974@126.com

司); NanoGenizer 高压均质机(苏州微流纳米生物技术有限公司); Nicomp380 Z3000 粒度电位分析仪(苏州微流纳米生物技术有限公司); 气相色谱仪、高效液相色谱仪(美国安捷伦)。注射大豆油、注射中链油(铁岭北亚药用油有限公司); 精炼橄榄油、精炼鱼油、油酸钠(德国); 蛋黄卵磷脂(上海艾维特医药科技有限公司); 甘油(湖南尔康制药股份有限公司); dl- α -生育酚(上海瑞永生物科技有限公司); 0.9% 氯化钠注射液(四川科伦药业股份有限公司); 水为超纯水; 其余试剂为分析纯。I级日本大耳白家兔[四川省实验动物专委会养殖场, 生产许可证号: SCXK(川)2015-14]。

1.2 方法与结果

1.2.1 多种油(SMOF)脂肪乳注射液的处方

参考欧盟批准上市的 SMOFlipid[®] 多种油脂脂肪乳注射液处方^[4], 采用与原研产品相同的处方, 以6%大豆油、6%中链油、5%橄榄油及3%鱼油为油相, 1.2%蛋黄卵磷脂为乳化剂, 0.0135% dl- α -生育酚为抗氧化剂, 0.03%油酸钠为稳定剂, 2.5%甘油为等渗调节剂, 适量氢氧化钠溶液或稀盐酸为pH调节剂。

1.2.2 SMOF 脂肪乳注射液制备工艺的筛选

将磷脂混悬液分别置不同温度水浴中, 采用滴体积法测定不同温度下的滴体积^[5], 并计算表面张力, 以温度为横坐标对测定的表面张力作图(图1)。温度低于60℃时, 表面张力随温度升高而减小, 说明磷脂乳化能力逐渐增强; 高于60℃时, 表面张力随温度升高而增大, 可能是由于磷脂遇热不稳定而氧化, 致乳化能力降低。据此, 初乳化的温度确定为60℃。乳化剂的分散通常包含两种方式: 卵磷脂分散于油相中或卵磷脂分散于水相中。以pH值、离心稳定性、粒径及室温留样15d的稳定性为评价指标, 对采用不同乳化剂分散方式所制得的乳剂产品(未灭菌)进行质量比较。结果表明: 磷脂分散于油相中比分散于水相中所制备的乳剂粒径更小, 稳定性更优(表1)。据此, 确定将磷脂分散于油相中来制备初乳。初乳制备与高压均质是脂肪乳制备的关键, 其中初乳化温度、剪切转速、时间以及高压均质压力对脂肪乳成品质量具有较大影响。据此, 采用正交设计试验法, 选择初乳化温度(A)、剪切转速(B)、剪切时间(C)以及高压均质压力(D)等影响因素, 每个因素3个水平, 考察其对脂肪乳质量的影响。以pH值、粒径、PDI、Zeta电位和室温留样15d的稳定性为综合评价指标, 优选出最佳工艺。考察因素水平见表2, L₉(3⁴)实验表和结果见表3, 综合

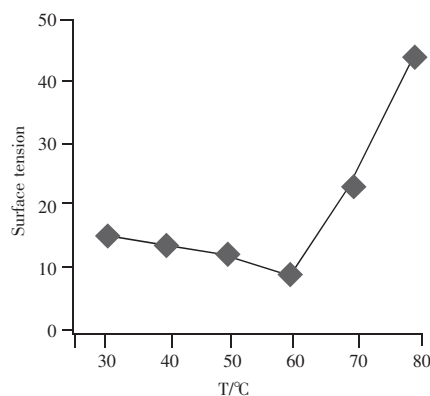


图1 不同温度对表面张力的影响

Figure 1 Surface tension of phospholipid suspension at the different temperatures

表1 磷脂加入方式对乳剂稳定性的影响

Table 1 Effects of phospholipid dispersed in water or oil phase on the stability of prepared emulsion

| 评价指标 | 分散于油相 | 分散于水相 |
|-----------|---------|-----------|
| pH | 8.58 | 8.64 |
| 离心稳定性 | 稳定, 无分层 | 稳定, 无分层 |
| 粒径/nm | 308.4 | 369.9 |
| 室温15d的稳定性 | 乳白色, 均一 | 淡黄色, 轻微漂油 |

表2 正交试验的因素水平表

Table 2 Factors and levels of Orthogonal experiment design

| 水平 | 制备温度/ °C (A) | 剪切转速/ $\times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ (B) | 剪切时间/ min (C) | 均质压力/ psi (D) |
|----|-----------------|------------------------------------------------------------|------------------|------------------|
| 1 | 50 | 1.6 | 5 | 8000 |
| 2 | 60 | 1.9 | 10 | 10000 |
| 3 | 70 | 2.1 | 15 | 12000 |

表3 正交试验设计表和结果

Table 3 Experimental arrangements and results of Orthogonal experiment

| No. | A/°C | B/ $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ C/min | D/psi | 试验评分 |
|-----|------|-------------------------------------------|-------|------|
| 1 | 1 | 1 | 1 | 75.0 |
| 2 | 1 | 2 | 2 | 71.0 |
| 3 | 1 | 3 | 3 | 66.0 |
| 4 | 2 | 1 | 2 | 74.5 |
| 5 | 2 | 2 | 1 | 85.0 |
| 6 | 2 | 3 | 2 | 81.0 |
| 7 | 3 | 1 | 3 | 77.5 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 76.5 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 79.5 |
| k1 | 70.7 | 75.7 | 75.0 | 79.8 |
| k2 | 80.2 | 77.5 | 78.8 | 76.5 |
| k3 | 77.8 | 75.5 | 74.8 | 72.3 |
| R | 9.5 | 2.0 | 4.0 | 7.5 |

评分方差分析见表4。由正交试验和方差分析结果可知: 各因素对正交结果的影响顺序为A>C>B(D为误差项)。样品的质量受制备工艺因素影响的顺序为水浴温度>剪切时间>剪切转速>均质压力, 各因素水平的最佳组合为A₂B₂C₂D₁, 即水浴温度60℃, 剪切速度 $1.9 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 剪切时间

10 min, 均质压力 8000 psi。乳剂属热力学不稳定系统, 过高的灭菌温度将影响脂肪乳的粒径, 同时其可能加速卵磷脂的降解, 降低 pH 值, 增加制剂中有关物质的含量。因此, 适宜的灭菌条件对脂肪乳的质量具有显著影响。据此, 采用热压蒸气灭菌法, 筛选样品的灭菌时间, 分别考察在 121 °C 条件下 8、12、15 min 时的灭菌效果。以 pH 值、粒径及室温留样 1 个月时有关物质溶血磷脂(LPC)含量为指标进行综合比较。结果表明: 样品在 121 °C 条件下灭菌

表 5 灭菌条件的筛选

Table 5 Screening the sterilization conditions

| 灭菌时间/min | 灭菌前 | | | | 灭菌后放置 1 个月 | | | |
|----------|------|-------|------|--------|------------|-------|------|--------|
| | pH | 粒径/nm | 外观 | 有关物质/% | pH | 粒径/nm | 外观 | 有关物质/% |
| 8 | 8.67 | 288.4 | 乳白均一 | 0.29 | 8.34 | 305.5 | 乳白均一 | 0.41 |
| 12 | 8.67 | 288.4 | 乳白均一 | 0.29 | 8.06 | 333.7 | 乳白均一 | 0.39 |
| 15 | 8.67 | 288.4 | 乳白均一 | 0.29 | 7.73 | 357.9 | 轻微漂油 | 0.49 |

1.2.3 制备工艺的验证 按原研产品处方与优化的制备工艺, 取油酸钠、甘油溶于 80% 处方量的注射用水中作为水相, 于 60 °C 恒温备用; 将 D1- α -生育酚、卵磷脂加入大豆油、中链油、鱼油、橄榄油的混合油中, 搅拌至均匀分散作为油相, 于 60 °C 恒温备用; 高速剪切条件下将油相缓慢加入水相, 剪切转速 $1.9 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 时间 10 min, 制得初乳; 将初乳补足余量注射用水后进行高压均质, 压力为 8000 psi, 连续均质 3 次, 制备得到终乳; 充氮, 灌装, 轧盖, 灭菌(121 °C, 8 min), 制得多种油脂肪乳注射液成品。

1.2.4 脂肪酸的含量测定 按气相色谱法(《中国药典》2015 年版四部通则)并参考欧洲药典, 测定样品中辛酸、癸酸、油酸、亚油酸、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)的含量, 以聚乙二醇为固定液, 采用 DB-WAX 毛细管色谱柱(30 m \times 0.25 mm)测定, 程序升温, 起始温度为 50 °C, 保持 1.2 min, 以 $5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 170 °C, 再以 $1.5 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 220 °C, 保持 28 min。氮气流速 $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量 $1 \text{ } \mu\text{L}$ 。并对该法进行了方法学验证, 结果符合相关规定, 理论板数按辛酸计算不低于 2×10^3 , 辛酸甲酯、癸酸甲酯、油酸甲酯、亚油酸甲酯、EPA 甲酯和 DHA 甲酯峰的分度符合相关要求($R > 1.5$)。按此法测定 3 批自制产品中脂肪酸的含量, 结果表明: 样品中辛酸、癸酸、油酸、亚油酸、EPA 和 DHA 脂肪酸的含量均符合原研制剂的质量标准(表 6)。

1.2.5 溶血磷脂酰胆碱(LPC)的含量测定 按高效液相色谱法并参考相关文献^[6-7], 确定样品中有关物质 LPC 的色谱条件为: 采用 Ultimate Ult5Si415

8 min, 其灭菌前后 pH 值、粒径及有关物质的变化较小(表 5)。据此, 确定本品的灭菌条件为 121 °C、8 min。

表 4 综合评分方差分析

Table 4 Overall rating and variance analysis

| 变异来源 | SS | F | F 比值 | P |
|------|---------|---|--------|-------|
| A | 160.056 | 2 | 17.675 | 0.078 |
| B | 42.722 | 2 | 4.718 | 0.175 |
| C | 106.889 | 2 | 11.804 | 0.054 |
| D | 9.056 | 2 | - | - |

色谱柱(150 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相为正己烷-异丙醇-水(5:80:20), 流速 $0.7 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 波长 206 nm, 柱温 25 °C, 进样量 $20 \text{ } \mu\text{L}$, 检测器为紫外检测器。并对该法进行了方法学验证, 结果符合相关规定, 理论板数按 LPC 计算不低于 2×10^3 , LPC 与溶剂峰的分度良好($R > 1.5$)。按此法检测 3 批自制样品中的 LPC, 结果表明: 3 批自制样品中 LPC 的含量分别为 0.29、0.33、0.32 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 均符合原研制剂质量标准的限度要求($\leq 1.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)。

表 6 各脂肪酸的含量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)Table 6 Results of the fatty acids content($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 脂肪酸 | 样品含量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 原研制剂含量标准/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ |
|-----|--------------------------------------|------------------------------------------|
| 辛酸 | 30.3 ± 1.8 | 26-48 |
| 癸酸 | 20.4 ± 0.9 | 10-30 |
| 油酸 | 49.4 ± 1.4 | 46-70 |
| 亚油酸 | 41.3 ± 1.2 | 28-50 |
| EPA | 3.1 ± 0.5 | 2-7 |
| DHA | 4.9 ± 0.5 | 2-7 |

1.2.6 溶血性和血管刺激性的试验 参照 2013 年 5 月下发的《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则(征求意见稿)》, 以 0.9% 氯化钠注射液为阴性对照品, 灭菌注射用水为阳性对照品, 进行溶血性试验。于家兔心脏取 10 mL 血, 除去纤维蛋白原, 用 0.9% 氯化钠注射液洗涤至上清液不显红色, 弃上清液后, 将压积红细胞用 0.9% 氯化钠注射液配成 2% 混悬液。于洁净试管中依次加入 2% 红细胞悬液、0.9% 氯化钠注射液或等体积灭菌注射用水、供试品, 加毕, 混匀, 置 $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的恒温水浴锅中温育 3 h。结果表明: 阳性对照管中加液后 15 min 内即全部溶血, 而自制样品试验组和阴性对照管中

3 h 内均未出现溶血或凝聚情况,说明样品溶血性检查符合要求。根据《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则(征求意见稿)》规定^[9],采用家兔自体左右侧自身对比法,以0.9%氯化钠注射液为阴性对照,进行血管刺激性试验,结果显示:家兔耳缘静脉滴注给予2 g的10 mL·kg⁻¹自制样品,每天1次,连续给药7次,家兔的中枢和运动神经系统、植物神经系统、呼吸系统、心血管系统、消化系统、泌尿生殖系统、皮肤和皮毛、眼等一般情况观察均未见任何明显异常表现,肉眼观察每只家兔给药部位的血管均无刺激性,无任何中毒性反应症状;病理组织学检查显示:家兔对照侧和给药侧耳缘静脉及周围组织未见明显病理改变,每只家兔的对照侧及给药侧耳缘静脉组织的结构清楚,管径大小正常,未见明显的血管扩张、充血及血栓,内皮细胞排列整齐,核清晰,未见明显内皮细胞肿胀、坏死脱落;血管周围组织正常,未见明显水肿、出血及炎细胞浸润(图2)。因此,认为样品对家兔耳血管无刺激作用,符合静脉注射用制剂的质量要求。

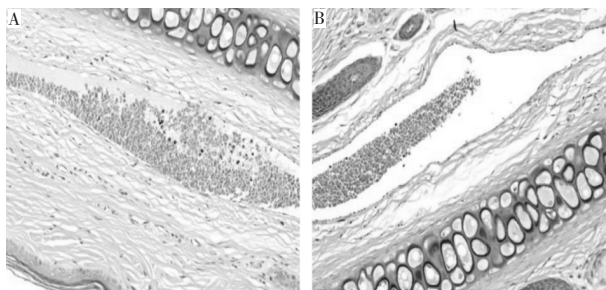


图2 对照组(A)和自制多种油脂肪乳注射液组(B)的病理检查图
Figure 2 Pathological examination charts of control group(A) and the experimental group of multi-oil fat emulsion injection(B)

1.2.7 长期稳定性试验 考察3批自制样品的长期稳定性(25±2℃),分别于0、3、6月时取样并检测其pH值、粒径、Zeta电位、多分散系数(PDI)、脂肪酸及游离脂肪酸的含量。结果表明:自制样品的各检查项目均符合质量标准,放置6个月后,各检查项目无明显变化,样品质量稳定。

2 讨论

多种油脂肪乳注射液是以大豆油、中链油、鱼油及橄榄油等4种油为主要有效成分的静脉乳剂。其主要包括3条代谢通路:能量转换;作为细胞膜磷脂组分;延长游离脂肪酸链。其中,中链油只具备氧化供能作用,与长链甘油三酯比较,其在体内的生化反

应简单,能更快水解氧化为机体提供能量;大豆油所含α-亚麻酸及亚油酸必需脂肪酸,鱼油所含EPA及DHA是细胞膜磷脂的组成成分,同时,EPA是主要抗炎分子类花生酸类物质的前体,与来源于ω-6多不饱和脂肪酸的花生四烯酸相比,其表现出更低的炎症发生可能性。这使脂肪乳剂的研究在提供人体所需的能量和必需脂肪酸的基础上,进一步推动和促进了兼具免疫调节功能和治疗作用脂肪乳的发展。卵磷脂以溶解状态分散于油相中,在制备O/W型乳剂时,分散于油相的卵磷脂可迅速在油水界面形成界面膜,降低了两界面之间的表面张力,促使更为稳定的乳剂形成。初乳的剪切、高压均质对最终样品的质量影响较大,是多种油脂肪乳注射液的关键制备工艺,应严格控制。卵磷脂水解脱去脂肪酸生成溶血磷脂,静脉注射使用时,能使红细胞及其他细胞膜破裂,引起溶血或细胞坏死,脂肪乳注射液中应严格控制溶血磷脂的量,以保证临床用药的安全性。文中采用溶血性、血管刺激性试验初步评价了自制样品的安全性。结果表明:样品不引起溶血和红细胞凝聚反应,溶血性检查合格,对家兔耳血管无刺激作用,符合静脉注射用制剂的质量要求。长期留样条件下,样品各考察指标均无明显变化,稳定性良好,达到原研制剂质量标准的要求,表明所优选的制备工艺合理可行。

参考文献:

- [1] Calder PC, Jensen GL, Koletzko BV, et al. Lipid emulsions in parenteral nutrition of intensive care patients: Current thinking and future directions [J]. Intensive Care Med, 2010, 36(5): 735-749.
- [2] Tian H, Yao X, Zeng R, et al. Safety and efficacy of a new parenteral lipid emulsion (SMOF) for surgical patients: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials [J]. Nutri Rev, 2013, 71(12): 86-86.
- [3] Boisramé-Helms J, Toti F, Hasselmann M, et al. Lipid emulsions for parenteral nutrition in critical illness [J]. Prog Lipid Res, 2015, 60: 1-16.
- [4] SMOFlipid product monograph. Fresenius kabi, 2012.
- [5] 朱瑛瑶, 赵国玺. 液体表面张力的测定-滴体积法介绍 [J]. 化学通报, 1981(6): 341-346.
- [6] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2015.
- [7] 王剑霞, 黄光亮, 陈禧翎, 等. HPLC同时测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱含量 [J]. 中国现代应用药学, 2011(6): 564-566.

收稿日期: 2016-06-12