

用于全肠外营养的海豹油脂肪乳的处方工艺研究

苏健芬, 郭喆霏, 卓世添, 温新国, 彭新生, 王荣昌, 吴传斌

(中山大学药学院 广东省高校创新药物制剂工程技术研究中心 中山大学药物制剂工程研究开发中心, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 优化用于全肠外营养的海豹油脂肪乳的处方和工艺, 并考察其性质。方法 通过高速剪切法制备初乳, 再用高压均质法制备脂肪乳; 以平均粒径、多分散系数 (PDI)、Zeta 电位、离心稳定性常数等为评价指标, 通过归一化多项指标, 用正交设计法优化制剂处方, 同时考察影响其质量的工艺因素; 将根据优化处方和工艺制得的制剂分别置 4、25 e 考察稳定性。结果 最佳处方 (w) 为: 海豹油 20%, 卵磷脂 E-80 01%, 泊洛沙姆 188 0.9%; 优化工艺为: 氮气保护下, 采用 60 MPa 压力均质 8 次, 灌封, 121 e、灭菌 15 min 所制备的脂肪乳 pH 值为 7.0~7.5 平均粒径为 (251.0±3.1) nm, PDI 为 (0.056±0.012), Zeta 电位为 (-39.3±4.7) mV, 主要脂肪酸二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸、二十二碳六烯酸的质量分数分别为 (21.35±0.04)%、(0.95±0.02)%、(2.54±0.02)%; 在 4、25 e 下避光放置 3 个月制剂稳定。结论 本处方工艺制备的脂肪乳性质稳定。

关键词: 全肠外营养; 海豹油; 脂肪乳; 高压均质法

中图分类号: R 944 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1006-8783.2011.02.001

文章编号: 1006-8783(2011)02-0111-05

Study on formulation and preparation process of seal oil based lipid emulsion for total parenteral nutrition

SU Jian-fen, GUO Zhe-fei, ZHUO Shi-tian, WEN Xin-guo, PENG Xin-sheng, WANG Rong-chang, WU Chuan-bin (School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangdong Research Center for Drug Delivery Systems Research & Development Center of Pharmaceutical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510006, China)

Abstract Objective To prepare stable seal oil based lipid emulsion for total parenteral nutrition (TPN) by optimizing its formulation and preparation process and investigate the physical properties. Methods The coarse emulsion obtained by high-shear mixing was homogenized into a fine monodispersed emulsion with a high pressure homogenizer. The physical stability of emulsions was evaluated by the mean size, PDI (polydispersion index), Zeta potential and stability parameters of centrifugation. The formulation was optimized by orthogonal design with normalized value and processing parameters that affecting the properties of the emulsion. The seal oil based lipid emulsion was placed under the condition of 4 e and 25 e respectively to investigate its stability. Results The optimized formulation and process parameters were as follows: oil (seal oil) phase 20%, egg lecithin (E-80) 0.9%, poloxamer 188 (F-68) 0.9%, 60 MPa, 8 circles under nitrogen circumstance. A fine lipid emulsion was prepared under good processing control with ivory appearance and a little bluish opalescence. The average particle size was (251.0±3.1) nm, PDI (0.056±0.012), the Zeta potential (-39.3±4.7) mV, and the pH 7.0~7.5, and the contents of EPA, DPA, DHA in emulsion were (21.35±0.04)%, (0.95±0.02)%, (2.54±0.02)% respectively. The seal oil based lipid emulsions at 4 e and 25 e were stable for at least 3 months. Conclusion The optimized formulation and preparation process are feasible to prepare seal oil based lipid emulsion with good properties.

Key words: total parenteral nutrition; seal oil; lipid emulsion; high pressure homogenization

收稿日期: 2010-12-22

基金项目: 科技部国际科技合作与交流专项项目 (2008DFA31080)

作者简介: 苏健芬 (1985-), 女, 硕士研究生, 电话: 020-39943343, Email: suphen_sq@163.com; 通讯作者: 吴传斌 (1963-), 男, 博士, 教授, 从事缓控释制剂与靶向制剂研究, Email: cbw2000@yahoo.com.

网络出版时间: 2011-03-24 11:43, 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1413.R.20110324.1143.010.html>

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

全肠外营养 (total parenteral nutrition, TPN) 是临床营养支持的重要组成部分, 主要支持患者的营养状态, 参与机体免疫功能、生理功能的调控, 加速组织的修复, 促进患者的康复, 适合不能经口进食、严重创伤、感染、昏迷等病人使用^[1]。目前临床使用的脂肪乳以植物油为原料。植物油中 X-6 不饱和脂肪酸产生的代谢中间体会引起炎症反应及抑制细胞介导免疫^[2]。此外, 植物油含有维生素 K, 使得在临床上部分患者输注时要加入一些抗凝剂^[3]。植物油脂肪乳在临床应用的不足促使了鱼油脂肪乳的开发。鱼油中 X-3 多不饱和脂肪酸 (X-3 polyunsaturated fatty acid X-3 PUFA) 能降低促炎中间体的产生, 并产生有效的抗炎中间体, 有利于治疗炎症和败血症^[4]。但是, 鱼油不具备良好的化学稳定性, 易被氧化为反式脂肪酸, 而且鱼油脂肪乳还存在代谢缓慢的缺点^[5]。

海豹油相比鱼油而言, 因含有丰富的维生素 E、角鲨烯及功效强大的特殊脂溶性物质, 具有化学稳定性良好, 适合作为人体脂蛋白脂肪酶的作用底物, 拥有更优秀的 X-3 PUFA 组分等特点^[6], 更适合被开发为全肠外营养脂肪乳。海豹油内富含 EPA (二十碳五烯酸)、DPA (二十二碳五烯酸)、DHA (二十二碳六烯酸) 3 种重要的 X-3 PUFA (见图 1), 且质量分数高达 20% ~ 33%^[7]。研究表明, 这 3 种不饱和脂肪酸对人体有多种独特的生物学活性, 具有一定的治疗作用^[8]。本文将海豹油制成用于全肠外营养的脂肪乳注射液, 并对其处方及工艺进行优化。

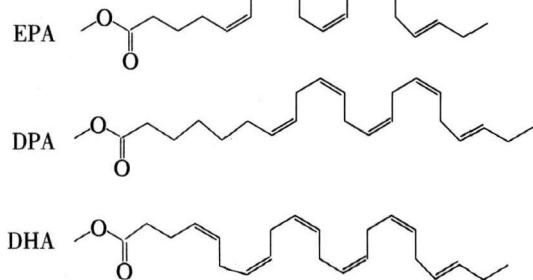


图 1 EPA、DPA、DHA 结构图

Figure 1 Structure of EPA, DPA, DHA

1 仪器与材料

FA25 型实验室高剪切分散乳化机 (上海弗鲁克机电设备有限公司), 微射流高压均质机 (上海惠翼代理), Emu ls+F lex2C3 型高压均质机 (Avestin Inc), 微射流超高压均质机 (上海惠翼代理)。

, Zetasizer Nano ZS90 纳米电位分析仪 (Malvern Instruments Ltd), PSS 激光粒度仪 (上海惠翼代理)。

精制海豹油 (加拿大北大西洋生物医药公司馈赠), 注射用蛋黄卵磷脂 (E-80 Lipoid Co Ltd), 注射用油酸 (Lipoid Co Ltd), 泊洛沙姆 188 (F-68 BASF Co Ltd), 其他试剂均为注射级。

2 方法与结果

2.1 考察指标

2.1.1 粒径 取脂肪乳, 用超纯水适当稀释, 稀释液装进粒径比色皿, 迅速放入粒径仪测定, 记录 d (d 表示平均粒径), $d_{0.9}$ ($d_{0.9}$ 表示小于该直径的所有微粒体积占全部微粒总体积的 90%), 多分散系数 (polydispersion index, PDI)。

2.1.2 Zeta 电位 取脂肪乳, 用超纯水适当稀释, 稀释液装进电位比色皿, 迅速放入 Zetasizer 分析仪测定, 记录平均 Zeta 电位。

2.1.3 离心稳定性常数 K 。乳剂的离心稳定性常数 K 。即乳剂离心前后的光密度变化百分率, 可反映

乳剂的物理稳定性。取 4 mL 脂肪乳置 5 mL 离心管中, 以 4000 r/min 离心 15 min 用移液枪精密量取 50 μL 离心管底部的样品置 10 mL 量瓶中, 用超纯水定容。以超纯水为空白, 在 500 nm 处测定吸光度 (A)。同法吸取等量未离心的脂肪乳, 稀释, 同法测得 A_0 , 计算 K_e 。

$$K_e = (A_0 - A) / A_0 \times 100\%$$

2.1.4 透射电镜图 (TEM) 脂肪乳用超纯水稀释适当倍数, 滴在覆有支持膜的铜网上, 静止 10 min 后用滤纸吸干, 再滴加质量分数 3% 磷钨酸溶液于铜网上染色 5 min 置透射电镜下观察并摄制照片。

2.1.5 含量测定 采用气相色谱法测定海豹油脂肪乳中 EPA、DPA、DHA 的含量。

色谱条件: HP-1 mm Wax 毛细管柱 (30 $m \times 0.320$ mm , 0.25 μm) 为色谱柱; 采用程序升温, 起始温度 155 $^{\circ}C$, 保持 1 min , 以 25 $^{\circ}C/min$ 升到 205 $^{\circ}C$, 再以 1 $^{\circ}C/min$ 升到 235 $^{\circ}C$, 最后以 3 $^{\circ}C/min$ 升至 250 $^{\circ}C$, 保持 5 min ; 进样口温度为 220 $^{\circ}C$; 氢火焰离子化检测器, 检测器温度为 280 $^{\circ}C$; 进样量 1 μL ; 分流比为 1B10; 载气流速为 2.0 mL/min 。

标准曲线: 精密称取对照品 100 mg 置 10 mL 量瓶中, 用正己烷稀释至刻度, 作为储备液。精密量取对照品储备液适量, 配制成系列质量浓度的溶液。以各对照品质量浓度 (Q mg/mL) 为横坐标, 对照品

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

的峰面积 (A) 为纵坐标作图, 得出标准曲线, 确定线性范围。EPA、DPA、DHA 的标准曲线分别为:

$$A_1 = 1727.1Q - 1.397 (r = 0.9999),$$

$$A_2 = 1650.5Q - 1.253 (r = 1.0000),$$

$$A_3 = 1667.1Q - 4.118 (r = 0.9999),$$

表明 EPA、DPA、DHA 质量浓度在 0.01~10

ng/mL 范围内与峰面积的线性关系良好。

样品含量测定: 称取海豹油脂肪乳 250 mg 平行 3 份, 分别用三氯化硼法^[11] 甲酯衍生化后, 按色谱条件下运行, 记录峰面积, 代入标准曲线, 计算含量。

2.2 处方考察

2.2.1 油相含量 参照临床用营养脂肪乳, 初步选 择油里 10% 和 20% 进 行 海 豹 油 脂 肪 乳 处 方 考 察。 结 果 表 明: 油 相 含 量 增 大, 乳 剂 粒 径 增 大, 2 种 油 相 含 量 的 乳 剂 粒 径 分 别 为 287、291 nm, PDI 为 0.047、0.1048, Zeta 电位为 -38.8、-38.4 mV, 性质差别不 明显。由于油相含量愈高, 供应能量的能力越大, 故 选定处方油相含量为 20%。

2.2.2 乳化剂种类 分别用蛋黄卵磷脂 E-80(质 量分数为 1.2%) 和泊洛沙姆 188 F-68(质量分数为 2.0%) 为乳化剂, 离心法和加热法对乳剂的性质进 行考察。结果显示: 以蛋黄卵磷脂 E-80 为单一乳化 剂的脂肪乳离心后不分层, 受热后不易破乳, 较稳 定, 优于以泊洛沙姆 188 F-68 为单一乳化剂的脂肪 乳。但单用蛋黄卵磷脂制备的乳剂颜色偏黄, 灭菌 后放置 2 d 变得不稳定, 粒径分布出现 2 个峰, 可能 有部分乳滴聚集或破裂。在卵磷脂中加入泊洛沙姆 制备的乳剂明显变白, PDI 明显减小, 乳滴粒径分布 更集中, 粒子大小更均匀, 有利于乳剂的长期稳定, 故采用复合乳化剂。

2.2.3 正交设计法优化处方 根据文献和预实验 结果, 选用乳化剂总量 (A, w %)、蛋黄卵磷脂 E-80 与泊洛沙姆 188 F-68 比例 (B, 质量比) 和油酸用量 (C, w %) 3 个因素, 采用 L₉(3) 正交表进行实验 设计, 优化海豹油脂肪乳的处方。⁴

以平均粒径 d_s 、 $d_{0.9}$ 及离心稳定性常数 K_e 为评 价指标, 3 个指标均标准化为 0~1 之间的 / 归一 值 0, 对取值越小越好的因素 (d_s 、 $d_{0.9}$ 、 K_e) 采用 H assan 方法进行数学转换求 / 归一值 0 d_{min} , 公式 如下:

$$d_{min} = (Y_{max} - Y_i) / (Y_{max} - Y_{min})$$

采用综合评分法予以评价。总分 = $d_s + d_{0.9} + K_e$ 。各指标 / 归一值 0 求算几何平均数, 得总评 / 归 一值 0。按以下公式计算得出综合指标 (OD), 总分

越高, 乳剂的质量越好^[10]。结果见表 1、表 2。

$$OD = (d_s d_{0.9} K_e)^{1/K}$$
 式中, K 为指数。

表 1 正交实验方案与结果

Table 1 Designs and results of orthogonal experiments

No	因素			d_s	$d_{0.9}$	K_e	OD
	A	B	C				
1	1.2	1.0B1.0	0.05	291	620	41.1	0.542
2	1.2	1.5B1.0	0.15	322	680	47.3	0.244
3	1.2	2.0B1.0	0.25	330	716	68.2	0.020
4	1.5	1.0B1.0	0.15	258	568	24.6	0.878
5	1.5	1.5B1.0	0.25	268	589	36.9	0.715
6	1.5	2.0B1.0	0.05	301	682	61.6	0.227
7	1.8	1.0B1.0	0.25	251	530	21.9	0.993
8	1.8	1.5B1.0	0.05	276	570	23.7	0.805
9	1.8	2.0B1.0	0.15	289	622	42.3	0.538
K ₁	0.751	2.311	1.512				
K ₂	1.729	1.702	1.536				
K ₃	2.253	0.720	1.686				
R	0.501	0.530	0.058				

表 2 方差分析表

Table 2 Analysis of variance

变异来源	离均差平方和	均方	F	P
A	0.404	0.202	20.910	< 0.05
B	0.448	0.224	23.143	< 0.05
C	0.004	0.002	0.2048	
误差	0.019	0.010		

直观分析结果表明 (表 1): 影响乳剂质量的主 次因素为 E-80BF-68(质量比) > 乳化剂总量 > 油酸 用量, 优化处方为 A₃B₁C₃。方差分析表明 (表 2): 乳化剂总量和 E-80BF-68(质量比) 对实验结果的影 响有统计学意义, 与直观分析结果一致。表明乳化 剂总量越大, E-80BF-68(质量比) 越小, 所制备的乳 剂质量越好。

2.3 工艺考察

2.3.1 卵磷脂加入方法 卵磷脂的溶解分散是亚 微乳制备的重要步骤。本文考察结果表明, 卵磷脂 加入油相溶解和加入水相分散所制备脂肪乳的粒径 和电位无明显差别, 但磷脂在油相中溶解较慢, 所需 温度较高 (75 e), 而在体积相对较大的水相中容易 均匀分散, 所需温度较低 (50 e), 有利于避免卵磷 脂氧化, 故选用磷脂在水相中分散的方法。

2.3.2 不同微射流超高压均质机 (上海惠翼代理) 的 比较 先制备初乳, 分成 3 份, 在相同工艺参 数下, 分别采用 Nitro-Soav iN S100 IL 2K 型、A vestin Emuls Flex-C3 型、NBD JN-

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305

3000 PLU S 型 3 种微射流超高压均质机 (上海惠翼代理) 均质, 均质后分别测定粒径分布 (图 2)。结果表明: 以 Niro 均质机均质后, 乳滴呈单峰分布且分布范围较窄, 效果较好。

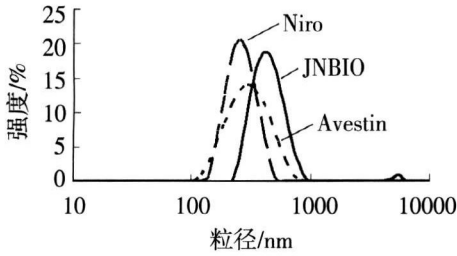


图 2 不同高压均质机对乳剂粒径分布的影响
Figure 2 Effect of different high-pressure homogenizers on size distribution of emulsions

2.3.3 均质压力与次数 分别考察不同微射流超高压均质机 (上海惠翼代理) 压力 40、60、80 MPa 和不同均质次数对脂肪乳性质的影响, 结果见图 3。从图 3 可见: (1) 均质 10 次内, 随着均质压力的增大, 脂肪乳的平均粒径会一直减小, 其中 60 MPa 和 80 MPa 的均质压力均能达到合适的粒径分布, 考虑降低仪器损耗的需要, 选取 60 MPa 的均质压力; (2) 均质次数对乳剂粒径影响不大, 对 PDI 值有明显影响, PDI 先是随着均质次数增加而逐渐减小, 当均质次数达到 8 次时, PDI 减小的趋势已不明显, 甚至有变大的情况出现。结合粒径分布和 PDI 变化情况, 选择均质 8 次。

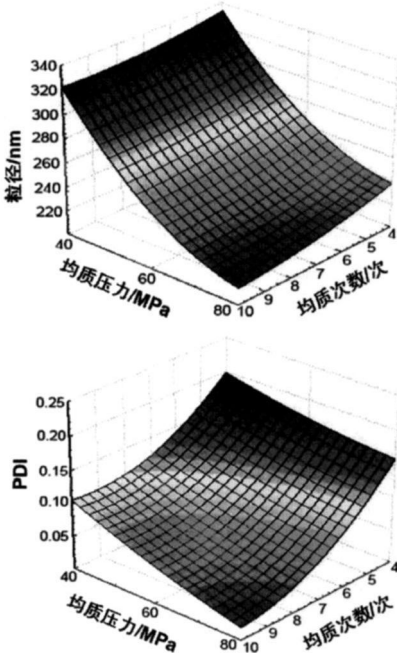


图 3 不同均质压力和均质次数对乳滴粒径和 PDI 的影响
Figure 3 Effect of different homogenizing pressure and cycles on size and PDI of emulsion droplets

2.3.4 灭菌条件 考察 115 e、30 min 和 121 e、15 min 两种灭菌条件对脂肪乳的影响。结果显示: 不同处方乳剂灭菌后, PDI 均比灭菌前大, 其中 121 e、15 min 灭菌后 PDI 变化相对较小, 乳剂无明显变黄, 是较合适的灭菌条件。

2.4 处方和工艺的确定

考虑乳剂的安全性与刺激性, 在满足乳剂质量的前提下, 优化处方 (w) 为: 海豹油 20%, 乳化剂 1.8% (E-80BF-68 质量比为 1.0B1.0), 油酸 0.25%, 甘油 21.25%, 其余为注射用水。优化工艺为: 卵磷脂加入水相中分散, 再加入油相制备初乳; 氮气保护下, 使用 Niro-SoaviNS 1001L 2K 型高压均质机, 60 MPa 压力均质 8 次, 灌封, 121 e、灭菌 15 min 即得。

2.5 乳剂种类的判定

乳剂外观为乳白色, 用亚甲基蓝水性颜料染色时, 外相染成蓝色, 可判定乳剂为 O/W 型^[12]。

2.6 海豹油脂肪乳的质量评价

按 2.4.0 项下, 重复制备 3 批脂肪乳。所得成品外观为乳白色, 无油滴, 无分层, pH 7.0~7.5, 测得平均粒径为 (251.0±3.1) nm, PDI 为 (0.056±0.012), Zeta 电位为 (-39.3±4.7) mV (见图 4), EPA、DPA、DHA 的质量分数分别为 (2.35±0.04)%、(0.95±0.02)%、(2.54±0.02)%。从 TEM 图 (图 5) 可见, 乳滴为球形或类球形, 粒径分布均匀。

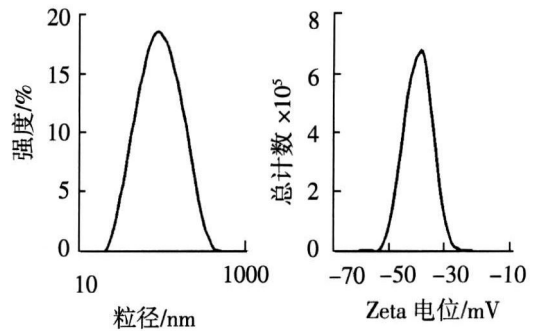


图 4 优化处方工艺制成脂肪乳的粒径分布和电位
Figure 4 Size distribution and zeta potential of emulsion using the optimized formulation and parameters

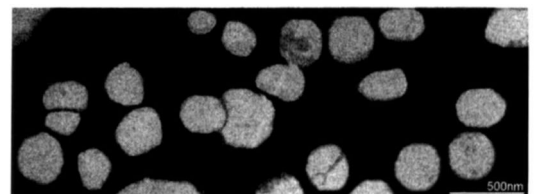


图 5 海豹油脂肪乳透射电镜图
Figure 5 Transmission electron microscopic images of seal oil based lipid emulsion

2.7 稳定性

将样品分别于 4.25 e 条件下放置, 于 0、1、2、3 个月取样, 观察外观性状(色泽、分层、破乳、油滴)、测定平均粒径、Zeta 电位、pH 值, 以及海豹油中 EPA、DPA、DHA 的相对含量(与 0 月含量的比值),

表 3 海豹油脂肪乳稳定性结果

Table 3 Results of stability determination of seal oil based lipid emulsion (n = 3)

月 份	4 e								25 e							
	外观	pH	电位 U/mV	粒径 D/nm	PDI	EPA	DPA	DHA	外观	pH	电位/ U/mV	粒径 D/nm	PDI	EPA	DPA	DHA
0	+	7.43	-39.3	251	0.056	100	100	100	+	7.43	-39.3	251	0.056	100	100	100
1	+	7.39	-39.5	251	0.057	99.71	99.51	99.33	+	7.21	-39.7	252	0.062	98.33	101.68	98.56
2	+	7.38	-39.9	254	0.061	98.39	101.27	98.08	+	7.21	-40.5	251	0.062	98.46	98.43	97.41
3	+	7.35	-40.4	253	0.057	98.65	101.26	98.27	+	7.19	-41.1	254	0.061	97.44	96.46	97.37

注: + 表示均匀的白色乳液, 未见油滴, 不分层。

3 讨论

本文采用正交设计法优化处方时, 以平均粒径(d)为指标, 该指标是乳剂的基本属性, 反映乳滴的均一性。同时考虑到静脉注射乳中的大粒子可能会

堵塞血管^[13-14], 另外选用 d_0 表征乳剂的安全性, 过大可能有阻塞血管的危险。离心稳定性常数 K。则反映乳剂的物理稳定性。海豹油中含有相当比重的 X-3 不饱和脂肪酸

EPA、DPA 和 DHA, X-3 PUFA 比 X-6 PUFA 不饱和度更高, 其碳链更长^[7], 相对大豆油等植物油而言, 较易氧化, 生产工艺难控制。因此, 各项实验操作务必在充氮条件下进行, 以减少蛋黄卵磷脂和海豹油的氧化, 保证脂肪乳的稳定性和安全性。本文通过处方工艺筛选, 采用复合乳化剂, 增大乳化膜的强度, 改善乳滴的稳定性, 最终在较少乳化剂总量下, 制备得到了性质优良、稳定的海豹油脂肪乳。

参考文献:

- [1] 周玲, 肖本富, 夏运. 全肠外营养的临床应用 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2003, 23(6): 797-798
- [2] DAN L W, RAQUEL S T, TH IAGO M J. New parenteral lipid emulsion for clinical use [J]. JPEN, 2006, 30(4): 351-367.
- [3] GEERT J A W, HI ILP C C. Immune modulation by parenteral lipid emulsions [J]. Am J Clin Nutr, 2007, 85: 1171-1184

- [4] KONSTANTIN M, WERNER S. Fish oil in critical illness

结果见表 3。

结果表明, 本品于 4 e 和 25 e 放置 3 个月后, 各项指标无显著变化, 粒径分布基本一致, 含量变化不明显, 表明该制剂稳定性良好。

- [J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008(11): 121-127.

- [5] ALFONSO V, NIETO S, BRUCE K C, et al. Inhibitory effect of bovine fish oil oxidation [J]. JAOCS, 1991, 68(12): 935-937.

- [6] 李湛军, 王召, 徐康森. 海狗油 X-3 脂肪酸的研究进展及作用机制 [J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5): 561-567.
- [7] 林兰, 忻余, 徐康森. GC-MS 法测定海狗油中不饱和脂肪酸 [J]. 药学进展, 2002, 26(4): 229-231.
- [8] 施汀兰, 冉长清. 海狗油不饱和脂肪酸的一般药理研究 [J]. 重庆中草药研究, 2006, 2(54): 14-21.
- [9] 崔福德. 药剂学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 32.
- [10] 苏健芬, 江桂生, 郭喆霏. 气相色谱法测定肠外营养用海豹脂肪乳(20%)主要脂肪酸的含量 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(12): 印刷中.
- [11] 陈亚飞, 程速远, 孙宇, 等. 毛细管气相色谱法测定海狗油胶丸中 X-3 多不饱和脂肪酸的含量 [J]. 药物分析杂志, 2004, 24(5): 499-501.
- [12] 吴伟, 崔光华, 陆彬. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评/归一值 0 的应用 [J]. 中国药学杂志, 2000, 35(8): 30-533

- [13] SHIBATA H, SAITO H, YOMOTA C, et al. Pharmaceutical quality evaluation of lipid emulsions containing PGE1: Alteration in the number of large particles in infusion solutions [J]. Int J Pharm, 2009, 378: 167-176
- [14] 李少英, 廖颂明, 何谨, 等. 正交试验法筛选 30% 脂肪乳注射液的工艺条件 [J]. 广东药学, 1999, 9(1): 22-23.

(责任编辑: 陈翔)

上海惠翼流体设备工程有限公司

Market@nanofluidizer.com TEL: 18516292305