

注射用银杏达莫的安全性评价

何晓静^{1*}, 黄琳仪², 刘玉兰²

(1. 中国医科大学附属第二医院药剂科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016)

[摘要] 目的: 评价国产注射用银杏达莫的安全性。方法: 将注射用银杏达莫配成适当浓度, 观察豚鼠静脉注射后有无过敏反应、家兔静脉注射有无血管刺激性及热原反应、体外溶血试验中是否具有溶血和血球凝集作用, 小鼠静脉注射的急性毒性。结果: 豚鼠静脉注射银杏达莫无过敏反应, 家兔静脉注射银杏达莫无血管刺激性及热原反应, 体外溶血试验无溶血和血球凝集作用, 小鼠静脉给药的 LD₅₀ 及 95% 的可信限为 138.2mg·kg⁻¹ 和 118.5mg·kg⁻¹~158.0mg·kg⁻¹。结论: 注射用银杏达莫可供静脉注射试用给药。

[关键词] 注射用银杏达莫; 安全性评价

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2006)08-0052-04

注射用银杏达莫是由银杏叶提取物与适量双密达莫精制而成, 为中西药复方制剂。银杏叶有效成分为: 银杏黄酮苷、银杏苦内酯、白果内酯等, 具有清除自由基, 抑制细胞膜脂质过氧化反应, 竞争性拮抗血小板活化因子, 抑制蛋白激酶 C, 降低细胞凋亡速度, 修复损伤组织等作用^[1,2], 加入小剂量双密达莫后可进一步加强降低血液黏度, 抑制血小板的活化和聚集, 增强红细胞变形能力及携氧能力, 两者合用临床上用于治疗动脉硬化、心脑血管疾病的防治。本次试验评价了我校药剂教研室采用国产工艺制作的注射用银杏达莫是否符合静脉注射药物的安全性标准, 为其进入临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂 注射用银杏达莫(YXDM, 银杏总黄酮 5mg+ 双密达莫 2mg/支), 批号 20041008, 由沈阳药科大学药剂教研室提供; 甲醛, 批号 20030407, 由沈阳东兴试剂厂生产; 1% 新鲜蛋清(取 1mL 新鲜蛋清加生理盐水至 100mL), 现用现配。

1.2 仪器 HH-S 电热恒温水浴锅: 江苏红旗医疗器械厂。

1.3 动物 豚鼠, ♂ 体重 250~350g; 昆明种小鼠, ♀、♂ 兼用, 体重 18~22g; 新西兰大耳白兔, ♀、♂ 兼用, 体重 1.8~2.5kg, 以上动物均由沈阳药科大学动

物中心提供, 合格证号: 辽实动质字 SCXK[辽]2003-0012 号。

2 方法与结果

2.1 剂量换算 注射用银杏达莫人临床应用剂量是 35mg(5 支)加 250mL 生理盐水中静脉滴注, 根据文献[3], 家兔的用量是 35mg × 0.07/1.5kg ≈ 1.6mg·kg⁻¹; 豚鼠的用量是 35mg × 0.031/0.4kg ≈ 2.7mg·kg⁻¹, 每只豚鼠重量按照 0.4kg 计算, 2.7mg·kg⁻¹ × 0.4kg ≈ 1.1mg, 激发剂量加倍。

2.2 血管刺激性实验^[4] 取体重 2.0~2.5kg 的家兔 6 只, 随机分为 2 组。根据文献[5], 局部刺激性试验最低限度应该使用临床浓度(35mg/250mL ≈ 0.14mg·mL⁻¹)。本次实验, 3 只家兔耳静脉注射银杏达莫 1.6mg·kg⁻¹(计算方法见“2.1”), 给药体积为 5mL·kg⁻¹, 浓度为 0.32mg·mL⁻¹, 符合要求。另外 3 只家兔耳静脉注射等体积的生理盐水, 每日 1 次, 连续 3d, 给药后肉眼观察注射处及远离注射处的血管反应, 结果给药后未见血管有异常反应, 与对照组血管比较无明显差别。依照表 1 标准对血管刺激性进行评分, 结果银杏达莫组及生理盐水组的各家兔得分均为 0。末次给药后 24h, 将家兔处死, 于注射处和远离注射处约 5cm 处各取一段血管, 固定于 10% 的甲醛溶液中, 石蜡包埋, HE 染色, 光镜检查(40 × 3.2), 观察其病理组织学改变(表 2)。病理组织学检查结果表明注射用银杏达莫连续给药 3d, 家兔注射处血管和远离注射处血管组织均未见明显异常改变, 与生理盐水对照组家兔血管比较无明显差别, 两

[收稿日期] 2005-11-11

[通讯作者] 何晓静, Tel: (024) 83956565; E-mail: hxj730119@yahoo.com.cn

组光镜观察评分均为 0, 结论为无血管刺激性。

表 1 血管刺激性肉眼观察评分标准

观察指标	描述	评分
血管充血	正常	0
	充血	1
	血管纹路不清	2
	血管呈紫红色	3
	无水肿	0
周围组织水肿	轻微水肿	1
	明显水肿	2
	严重水肿	3

结果判断标准: ≤ 0.5 无刺激性, ≤ 2.5 轻微刺激性, ≤ 4.5 中刺激性, ≤ 6.0 重刺激性。

表 2 血管刺激性光镜观察评分标准

观察指标	描述	评分
血管充血	内皮及管壁完整	0
	内皮受损	1
	血管内血栓	2
	血管破裂	3
周围组织水肿	正常	0
	水肿	1
	出血	2
	炎性细胞浸润	3

结果判断标准: ≤ 0.5 无刺激性, ≤ 2.5 轻微刺激性, ≤ 4.5 中刺激性, ≤ 6.0 重刺激性。

2.3 过敏实验^[3] 取雄性豚鼠 18 只, 体重 250~350g, 随机分为 3 组。实验组豚鼠每只腹腔注射银杏达莫 $1.1\text{mg}\cdot 0.5\text{mL}^{-1}$, 隔日 1 次, 共 3 次, 阳性对照组同法注射等容量 1% 新鲜蛋清, 空白对照组同法注射等容量生理盐水。首次给药后 14d, 每组各取 3 只豚鼠, 实验组豚鼠耳静脉注射银杏达莫 $2.2\text{mg}\cdot 1.0\text{mL}^{-1}$, 空白和阳性对照组豚鼠分别耳静脉注射生理盐水和 1% 蛋清 1.0mL , 给药后立即观察豚鼠有无喷嚏、搔鼻、干呕或咳嗽、竖毛、抽搐、呼吸困难、大小便失禁、休克和死亡等过敏反应症状, 观察 1h, 结果见表 3。注射用银杏达莫组和生理盐水组, 无一过敏症状, 蛋清阳性对照组豚鼠 100% 休克。各组余下 3 只豚鼠 21d 后同法处理, 观察相同指标, 各组结果同 14d。

2.4 体外溶血试验 文献规定^[5], 体外溶血试验最低限度应为临床浓度。家兔耳中央动脉采血, 依文献方法^[3], 玻璃珠搅拌去纤维蛋白, 用生理盐水洗涤

表 3 注射用银杏达莫的过敏试验

试药	(n)	致敏天数	过敏数	休克数	死亡数	过敏
银杏达莫	3	14	0	0	0	(-)
	3	21	0	0	0	(-)
生理盐水	3	14	0	0	0	(-)
	3	21	0	0	0	(-)
1% 蛋清组	3	14	3	3	3	(+)
	3	21	3	3	3	(+)

注: (-) 无过敏反应; (+) 有过敏反应。

后离心 (1000r/min, 10min), 反复数次直至上清液无红色, 然后按体积比用生理盐水配成 2.0% 红血球混悬液供试验用。

每组取试管 7 支, 按表 4.5 所示各管分别加入注射用银杏达莫不同体积药液和红血球混悬液, 管 6 不加药, 加生理盐水作空白对照, 管 7 加蒸馏水作完全溶血对照。轻轻摇匀后, 各管置 37℃ 水浴中放置 3h, 分别于 15, 30, 45, 60, 120, 180min 各记录 1 次, 共 6 次。依照表 6 标准肉眼观察有无溶血现象。试验结束后, 将各试管充分振摇, 观察有无沉淀和凝集现象, 结果见表 4~5。注射用银杏达莫体外溶血试验未见溶血及血球凝集现象, 与生理盐水比较, 无明显差别。蒸馏水组则完全溶血, 产生红色透明溶液。常规方法作红细胞镜检, 未见红细胞破裂及形态异常。

表 4 注射用银杏达莫 ($0.14\text{mg}\cdot \text{mL}^{-1}$) 的体外溶血试验

试管号	1	2	3	4	5	6	7
银杏达莫 (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0	蒸馏水 2.5
生理盐水 (mL)	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5	0
2.0% 红血球悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
有无溶血	-	-	-	-	-	-	+

判断: (-) 表示无溶血现象, 无凝集, 无沉淀反应; (+) 表示完全溶血。

表 5 注射用银杏达莫 ($0.7\text{mg}\cdot \text{mL}^{-1}$) 的体外溶血试验

试管号	1	2	3	4	5	6	7
银杏达莫 (mL)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0	蒸馏水 2.5
生理盐水 (mL)	2.4	2.3	2.2	2.1	2.0	2.5	0
2.0% 红血球悬液	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
有无溶血	-	-	-	-	-	-	+

判断: (-) 表示无溶血现象, 无凝集, 无沉淀反应; (+) 表示完全溶血。

表 6 红细胞溶血、凝集判断标准

反应级	外观描述
全溶血	溶液澄明红色,管底无细胞残留,用(+)表示
部分溶血	溶液澄明红色或棕色,管底有少量红细胞残留,用(±)表示
无溶血	红细胞全部下沉,上层液体无色透明,用(-)表示
凝集	红细胞聚集成块,振荡后不能分散

2.5 急性毒性试验(LD₅₀)^[3] 根据预试验的结果,100%死亡的剂量为 210mg·kg⁻¹,无死亡的剂量为 70mg·kg⁻¹,剂距取 1:0.85。取 60 只小鼠,体重 18~22g,随机分为 6 组,♀ ♂各半。各组小鼠分别尾静脉注射银杏达莫 210.0、178.5、151.7、128.9、109.6mg·kg⁻¹,空白对照组给予等体积生理盐水(0.20 mL·10g⁻¹)。给药结束后连续观察 14d,并记录小鼠毒性反应和死亡情况。解剖死亡小鼠,肉眼观察主要脏器的病理变化。结果显示,大剂量组小鼠给药后四肢强直、呼吸急促、抽搐,并逐渐减弱至死亡;小剂量组小鼠给药后少动、呼吸急促,后可爬行,并逐渐恢复。大剂量组小鼠 2min 内陆续出现死亡;低剂量组小鼠死亡时间在 5~10min,存活小鼠活动减少、毛竖立,24h 后逐渐恢复正常。死亡的小鼠进行尸检,经肉眼观察发现其肝脏、脾脏、肾脏等主要脏器均有不同程度充血。存活小鼠常规饲养两周,观察期间小鼠摄食饮水、一般状况及活动等均无异常改变,体重从 20.6 ± 0.8g 增至 29.7 ± 1.1g。采用 Bliss 法计算小鼠的 LD₅₀ 为 138.2mg·kg⁻¹,相当于人用剂量 30 倍(138.2mg·kg⁻¹ × 0.02kg × 387.2/35mg ≈ 30),95% 可信限为 118.5mg·kg⁻¹~158.0mg·kg⁻¹。

表 7 小鼠静脉注射注射用银杏达莫的急性毒性试验(n=10)

银杏达莫 (mg·kg ⁻¹)	对数剂量 (X)	动物死亡数 (只)	死亡率 (%)	机率单位 (Y)	LD ₅₀ 95% 可信限 (mg·kg ⁻¹)
210.0	2.32	10	100	4.06	
178.5	2.25	8	80	4.75	138.2
151.7	2.18	6	60	5.25	(118.5~158.0)
128.9	2.11	4	40	5.82	
109.6	2.04	2	20	7.17	

2.6 热原试验^[3] 取家兔 6 只,体重 1.8~2.5kg,♀ ♂兼用。依照文献[7]要求,选取体温合格的家兔 3 只,测定其正常体温后 15min 内,自耳缘静脉缓缓注入温热至 38℃ 的注射用银杏达莫 1.6mg/(2mL·

kg⁻¹)。注射后每隔 1h 测量体温 1 次,共测 3 次。以 3 次体温中最高的 1 次减去正常体温为试验家兔体温的升高度数,结果见表 8,结论为注射用银杏达莫热原试验合格。

表 8 注射用银杏达莫热原实验

编号	体重 (kg)	注射前平均体温 (℃)	注射后体温(℃)			升温 (℃)	结论
			1h	2h	3h		
1	2.2	39.1	39.2	39.2	39.3	0.2	
2	2.4	39.5	39.5	39.6	39.5	0.1	合格
3	1.9	39.3	39.7	39.5	39.3	0.4	

3 讨论

药物刺激性、过敏性、热原反应和溶血性是指药物制剂经眼、耳、鼻、口腔、呼吸道、关节腔、皮肤、直肠、阴道、静脉、动脉、肌肉、皮下、静脉旁和鞘内等非口服途径给药,对用药局部产生的毒性(如刺激性和过敏性等)和/或对全身产生的毒性(如过敏性、热原反应、溶血性等),它是临床前安全性评价的重要组成部分。药物的活性成分及其代谢物、辅料、有关物质及理化性质(如 pH 值、渗透压等)均有可能引起刺激性和/或过敏性和/或溶血性和/或热原反应的发生,而严重的毒性可以影响用药的安全有效性,因此药物在临床应用前应该研究其制剂在给药部位使用后引起的局部和/或全身毒性,以提示临床应用时可能出现的毒性反应、毒性靶器官、安全范围、临床研究监测指标并为临床解毒或解救措施提供参考,保障临床用药的安全有效。动物毒性试验是指动物 1 次或 24h 内多次给予受试物后,一定时间内所产生的毒性反应。所有拟用于人的药物通常需要进行动物急性毒性试验。从新药开发的客观规律来看,急性毒性试验处在毒理研究的早期阶段,所获得的信息有助于重复给药毒性试验的剂量选择,初步揭示受试物可能的毒性作用靶器官,同时也会暴露一些迟发的毒性反应。另外,急性毒性试验的结果有时可用作 I 期临床试验起始剂量选择的参考,并能提供一些与人类急性药物中毒相关的信息^[6]。

本次实验结果表明,注射用银杏达莫体外试验中对家兔红血球无溶血和凝集作用、家兔静脉注射给药后无血管刺激性及热原反应、豚鼠静脉注射后无过敏反应,小鼠急性毒性试验的结果约为人临床给药剂量的 30 倍,基本符合药物安全性评价标准^[7],可供静脉注射试用给药。

[参考文献]

- [1] 谢培山. 银杏叶标准提取物 Egb761 及银杏叶制剂的质量评价[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 3.
- [2] 刘国庆, 王玉梅, 乔盛广, 等. 银杏叶治疗急性脑梗塞的临床观察[J]. 中国实用医药杂志, 2002, 2(1): 24-25.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修等. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 1861, 223, 237.
- [4] 王北婴. 中药新药研制与申报[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1995. 382.
- [5] 中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则课题组. 中药、天然药物局部刺激性和溶血性研究技术指导原则[S]. 北京: 中国食品药品监督管理局, 2004. 4.
- [6] 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则课题组. 化学药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则[S]. 第二稿. 北京: 中国食品药品监督管理局, 2004. 4.
- [7] 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则课题组. 中药、天然药物急性毒性研究技术指导原则[S]. 北京: 中国食品药品监督管理局, 2004. 4.