

银杏内酯注射液血管刺激性作用研究

张德波, 罗洁, 邓莎, 郑娇娇, 贺抒(成都市药品检验所, 成都 610045)

摘要 目的: 对银杏内酯注射液血管刺激性进行研究。方法: 考查不同固定剂、不同浓度供试液、不同稀释剂对银杏内酯注射液血管刺激性作用的影响; 考察停止给予银杏内酯注射液 14 d 后血管刺激恢复情况。结果: FAA 固定液对血管刺激性的判断有一定影响; 使用 10% 福尔马林溶液或 10% 福尔马林生理盐水溶液作为固定剂较好; 银杏内酯注射液稀释成 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度对兔血管有刺激作用 0.5 、 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度对血管未见刺激作用; 0.9% 氯化钠注射液、 5% 葡萄糖注射液两种稀释剂配制药物对血管刺激性无影响; 停药 14 d 后血管刺激作用能部分恢复。结论: 银杏内酯注射液现行标准中的“刺激性试验”检查应当修改。

关键词: 银杏内酯注射液; 血管刺激; 标本固定剂; 供试浓度; 稀释剂; 恢复期

中图分类号: R 921.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-3656(2017)-2-103-4

Study on the vascular irritation of Ginkgolide Injection

Zhang Debo, Luo Jie, Deng Sha, Zheng Jiaojiao, He Shu(Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610045)

Abstract Objective: Study on the vascular irritation of Ginkgolide Injection. **Methods:** It was investigated that the different specimen fixing solutions, concentrations of the test solution and diluents had the impacts on the vascular irritation of Ginkgolide Injection and whether the vascular function could be recovered after the use of Ginkgolide Injection was stopped for 14 days. **Results:** The fixing solution of FAA interfered with the judgment of vascular irritation. The 10% Formaldehyde Solution or 10% Formaldehyde Sodium Chloride Solution were the better fixing solutions. The diluted solution of Ginkgolide Injection $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ had the irritation on the rabbits' vessels but the diluted solution of Ginkgolide Injection $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ and $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ had no irritation on the rabbits' vessels. The diluents of 0.9% Sodium Chloride solution and 5% Glucose solution had no impact on the vascular irritation. The vascular function could be recovered after the use of Ginkgolide Injection was stopped for 14 days. **Conclusion:** The test of vascular irritation in the Ginkgolide Injection specification should be modified.

Key words: Ginkgolide Injection; vascular irritation; specimen fixing solutions; concentrations of test solution; diluents; recovery

银杏内酯注射液主要成分为白果内酯、银杏内酯 A、银杏内酯 B 和银杏内酯 C 等, 辅料为甘油、乙醇; 具有活血化瘀, 通经活络作用; 临床用药方式为静脉滴注。银杏内酯注射液现行标准(YBZ00702011)^[1] 检查项下“刺激性试验”目的在于检查药物的血管刺激性作用。该项检查中供试液浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高于临床用药浓度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在检查时可能形成刺激性作用, 同时标准中未设恢复期观察, 会造成对药品的过分严格要求, 因此为了进一步完善标准中的刺激性检查项, 考察银杏内酯注射液对血管的刺激性作用情况, 正确评价药物安全性, 开展了本研究。

1 材料与仪器

1.1 药品

银杏内酯注射液(规格 2 mL, 批号 08150802、

08150810、08151001、08151002、08151003、08150706) 由成都百裕制药股份有限公司提供, 本品临床用药浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 用 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液稀释配制。

1.2 动物

日本大耳白实验兔, 普通级, 体重 $1.9 \sim 2.5 \text{ kg}$, ♀♂ 兼用, ♀ 无孕, 由四川省实验动物专委会养殖场提供, 生产许可证号: SCXK(川) 2013-14。全价营养饲料, 四川省医学科学院实验动物中心供应部, 合格证: 川医动字第 24105101。实验在成都市药品检验所实验动物室观察及饲养, 实验动物使用许可证号: SYXK(川) 2012-103。

1.3 试剂

甲醛(批号 20121015)、冰醋酸(批号 20150906)、乙醇(批号 20150730) 购自广东光华科技股份有限公司; 0.9% 氯化钠注射液(批号

第一作者简介: 张德波, 主任药师; 研究方向: 药品注射剂安全性控制。Tel: 028-83566371; E-mail: zhangdebo69@126.com

14072844、14052813) 由四川美大康佳乐药业有限公司生产; 5% 葡萄糖注射液(批号 C15030112-2) 由四川科伦药业股份有限公司生产。

1.4 仪器

德国徕卡全套病理设备(ASP300S 全自动真空组织脱水机、EG1160 包埋机、RM2245 切片机、HI1210 组织摊片机、CV5030 全自动玻璃封片机、ST5010 全自动染色机、HI1220 组织烘片机、DM2000 显微镜; BA400D 数码三目摄像显微镜 图像分析软件; 十段编程鼓风干燥箱(ZRD-A7140 5~300 °C 上海智城分析仪器制造有限公司); 洁净工作台(SW-CJ-2F 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); 一次性使用袋式输液器(DS1-250 成都市新津事丰医疗器械有限公司); 酸度计(FE20 METTLER TOLEDO)。

2 方法与结果

2.1 固定剂考察

2.1.1 方法 取实验兔 3 只, 体重 2.2~2.5 kg, 麻醉后股动脉放血处死, 每只剪取耳廓(包括耳缘静脉)标本 3 个, 分为 3 份(每份含 3 只兔耳廓标本各 1 个, 共 3 个), 分别用 10% 福尔马林溶液、10% 福尔马林生理盐水溶液、FAA 液三种固定剂进行组织病理学检查, 考察不同固定剂对正常耳缘静脉的影响。

2.1.2 结果 3 种固定剂固定的兔耳廓标本, HE 染色光镜下观察, 耳廓表皮及附属器未见异常, 皮下组织未见充血水肿及炎性细胞浸润, 耳缘静脉及周围组织各结构层次清楚, 血管结构完整, 管壁腔面光滑, 血管内皮细胞为单层上皮细胞, 未见血管内皮增生、肿胀、变性、坏死、脱落, 管壁无炎细胞浸润及纤维组织增生, 管壁及管周无出血。10% 福尔马林溶液、10% 福尔马林生理盐水溶液固定的标本管腔内红细胞形态结构正常, 未见破裂, 染色鲜红明亮; FAA 液固定的标本血管内红细胞形态结构异常, 大部分破裂, 血红蛋白溢出, 呈丝网状存在于血管腔, 染色浅淡。

2.1.3 结论 不宜采用 FAA 液作为血管标本的固定剂; 可采用 10% 福尔马林溶液、10% 福尔马林生理盐水溶液作为固定剂, 其中 10% 福尔马林溶液固定的标本染色后色泽更鲜亮。以下试验血管标本的固定剂均采用 10% 福尔马林溶液。

2.2 供试液浓度考察

2.2.1 方法 取实验兔 26 只, 体重 2.1~2.5 kg, 随机分为 5 组, 即药物高(1.0 mg·mL⁻¹)、中(0.5 mg·mL⁻¹)、低浓度组(0.2 mg·mL⁻¹)、稀释液对照组(阴性对照组)和空白对照组。取银杏内酯注

射液(批号 08150802), 用 5% 葡萄糖注射液分别稀释成 1.0、0.5、0.2 mg·mL⁻¹ 浓度进行血管刺激试验。药物组分别于动物左侧耳缘静脉滴注相应浓度的供试液, 动物右侧耳缘静脉不滴注任何溶液。稀释液对照组(阴性对照组)滴注同体积 5% 葡萄糖注射液; 空白对照组不滴注任何溶液。给药方案见表 1。试验使用高于临床用药浓度的 1.0 mg·mL⁻¹、0.5 mg·mL⁻¹ 两个浓度, 考察在药液浓度较高时, 是否对血管有刺激性作用。

每组动物每日滴注一次, 每 1 min 滴注 40 滴, 连续给药 3 d, 给药结束后 48 h 及给药后的末次给药后第 14 日, 每组取 3 只动物滴注侧耳廓标本, 用 10% 福尔马林溶液固定后进行组织病理学检查。

表 1 供试液浓度研究给药方案

组别	动物数 /只	供试液浓度 /mg·mL ⁻¹	每日滴注体积 /mL·kg ⁻¹	3 日给药总剂量 /mg·kg ⁻¹
药物高浓度组	6	1.0	5	15
药物中浓度组	6	0.5	10	15
药物低浓度组	6	0.2	25	15
稀释液对照组	6	葡萄糖注射液	25	-
空白对照组	2	-	-	-

2.2.2 结果 肉眼观察: 动物在滴注期间未有异常不适表现, 部分动物在滴注进针处轻微红肿, 24 h 恢复, 取材时取材部位血管纹路清晰, 未见异常。

光学显微镜下观察: 1.0 mg·mL⁻¹ 浓度供试液给药后 48 h 有 3 例标本血管内皮均受损, 血栓形成, 1 例标本出血明显, 血管周围组织水肿, 14 d 恢复期结束后, 有 1 例标本由于血管壁的损伤形成的机化血栓堵塞大部分血管, 血管腔狭窄, 阳性反应标本血管及其周围组织的炎性细胞浸润不明显, 显示供试药液对血管的损伤主要集中在血管内皮导致血栓的形成; 0.5、0.2 mg·mL⁻¹ 浓度供试液、稀释液(葡萄糖注射液)均未出现异常, 与空白对照组比较无明显差异。

2.2.3 结论 试验显示: 1.0 mg·mL⁻¹ 浓度对血管有刺激反应, 刺激损伤主要集中在血管内皮, 14 d 恢复期结束后, 可部分恢复; 0.5、0.2 mg·mL⁻¹ 浓度和 5% 葡萄糖注射液对兔耳缘静脉及其周围组织无刺激性反应。表明本品血管刺激试验供试液浓度大小对结果有较大影响。

2.3 稀释剂考察

2.3.1 方法 取实验兔 14 只, 体重 1.9~2.0 kg。分为实验一组、实验二组和空白对照组。取银杏内

酯注射液(批号 08151001),分别用 0.9% 氯化钠注射液和 5% 葡萄糖注射液稀释成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度,采用同体左右侧自身对照法,各组兔耳缘静脉一侧滴注供试液,另一侧滴注相应的稀释液。每只兔药物侧与对照侧滴注时间间隔 4 h。空白对照组不滴注任何溶液,方案见表 2。

各组每 1 min 滴注 40 滴,均连续给药 3 d,给药结束后 72 h 及末次给药后的第 14 日,分别取 3 只动物,每只动物分别取左右侧进针处前 2 cm 包含耳缘静脉的耳廓约 1 cm 标本,用 10% 福尔马林溶液固定后进行组织病理学检查。

表 2 稀释剂考察给药方案

组别	动物数/只	供试液	每日滴注体积 $/\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$	3 日给药总剂量 $/\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$
实验一组	药物侧	$0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	20	12
	稀释剂侧	0.9% 氯化钠注射液	20	-
实验二组	药物侧	$0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	20	12
	稀释剂侧	5% 葡萄糖注射液	20	-
空白对照组	2	-	-	-

2.3.2 结果 光学显微镜观察:用葡萄糖注射液稀释的供试液给药 72 h 后,给药侧 1 例标本血管破裂,出血明显,重切片间隔 5 张切片镜下检查给药侧血管完整,正常;对照侧未见异常;用氯化钠注射液稀释的供试液给药 72 h 和末次给药 14 d 标本均未见异常。

2.4 供试液 pH 值考察

2.4.1 方法 取银杏内酯注射液(批号 08150706),分别用 0.9% 氯化钠注射液及 5% 葡萄糖注射液稀释成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度的供试液,测定 pH 值。结果见表 3。

表 3 稀释剂及稀释后的供试液 pH 值测定

测定液	pH 值	测定液	pH 值
0.9% 氯化钠注射液	5.04	5% 葡萄糖注射液(直接测)	7.07
用氯化钠注射液稀释的供试液($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	5.06	用 5% 葡萄糖注射液稀释的供试液($0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	6.63

2.4.2 结果 银杏内酯注射液的 pH 值在 3.0 ~ 4.5 之间,偏酸性。用氯化钠注射液稀释的供试液 pH 值与氯化钠注射液 pH 值接近;用 5% 葡萄糖注射液稀释的供试液 pH 值较 5% 葡萄糖注射液 pH 值偏小,但差别不大,接近中性。 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 供试液的酸碱度不会引起血管刺激作用。

2.5 小结

以上结果显示:银杏内酯注射液血管刺激性试验供试液浓度宜与临床用药浓度一致,即 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$;稀释剂采用临床使用说明书中规定的 0.9% 氯化钠注射液或 5% 葡萄糖注射液均可;标本固定剂宜采用 10% 福尔马林溶液或 10% 福尔马林生理盐水溶液,最佳为 10% 福尔马林溶液。

3 标准修订建议

拟对银杏内酯注射液现行标准中“刺激性试验”进行如下修改:

血管刺激 取本品适量,加 0.9% 氯化钠注射液稀释至以萜类内酯计 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为供试液。取家兔 6 只,♀♂ 不限,♀ 无孕,称重,每日家兔左侧耳缘静脉滴注供试液 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为药物组,间隔 4 h,右侧耳缘静脉滴注等体积 0.9% 氯化钠注射液为阴性对照组,连续滴注 3 日。于每次给药前和给药后 1、6 h 及末次给药后 24、48、72 h,肉眼观察注射部位血管有无充血、出血、硬结、红肿、溃疡、坏死等局部刺激性反应症状。末次滴注后的第 3 日和第 14 日,分别取 3 只家兔股动脉放血处死,距滴注进针处近心端 1 ~ 2 cm 处,剪取耳缘静脉约 1 cm,用 10% 福尔马林溶液[取甲醛溶液(含甲醛 37.0% ~ 40.0%) 10 mL,加水至 100 mL 混匀]固定,常规脱水,石蜡包埋切片,HE 染色,在光学显微镜下对血管组织进行病理学检查,判断供试品静脉滴注是否对血管有刺激性。药物组血管不得出现刺激性反应,若药物末次滴注后的第 3 日血管出现刺激反应,末次给药后 14 d 应能恢复,不得出现刺激性反应。

4 样品检查

取 3 批样品,按照拟修订方法进行血管刺激性试验。

结果:肉眼观察,动物在给药期间未有异常不适表现,部分动物在给药后进针处轻微红肿,24 h 恢复,取材时取材部位血管纹路清晰,未见异常。光镜下观察见 3 批样品滴注后第 3 日和恢复 14 d 动物双侧耳廓表皮及附属器未见明显异常,皮下组织未见充血水肿及炎性细胞浸润,耳缘静脉及周围组织各结构层次清楚,血管结构完整,管腔内无血栓形成,管壁腔面光滑,血管内皮细胞为单层上皮细胞,未见血管内皮增生、肿胀、变性、坏死、脱落,管壁无炎细胞浸润及纤维组织增生,管壁及管周无出血。空白对照耳廓未见异常。

5 讨论

5.1 银杏内酯注射液现行质量标准“刺激性试验”项下供试液浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高于临床用药浓度。滴注时间为 3 d, 滴注给药的药总量相当于临床一个疗程用药的总量, 在取了耳廓标本后使用的固定液为 FAA 液, 对刺激性的观察未设置恢复期。

5.2 银杏内酯注射液临床用量及用法: 静脉滴注, 一次 5 支(10 mL), 临用前将药物缓缓加入到 0.9% 氯化钠注射液 250 mL 或 5% 葡萄糖注射液 250 mL 中稀释, 缓慢静脉滴注, 一日 1 次, 用药期间需严格控制滴速, 滴注速度不高于每分钟 40~60 滴, 疗程为 14 d。计算成人一个疗程用药总量为 $11.67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 临床用药浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5.3 银杏内酯注射液使用的辅料为甘油和乙醇, 试验时稀释后的供试液 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 中乙醇的浓度小于 3.8%。本研究未考察辅料对血管的刺激性是考虑即使辅料对血管存在刺激性, 也不太可能改变银杏内酯注射液的处方工艺, 但不管是辅料还是主药引起刺激性反应, 均能在检查时显现出来, 如果刺激性较强或不可逆, 则血管刺激都会判不合格, 并不影响标准对药品质量的控制。

5.4 本研究是根据《药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则》^[2] 要求, 对银杏内酯注射液血管刺激标准进行重新研究, 使其符合新的要求, 同时考察标准中涉及到的诸因素, 避免要求过分偏严或存在其他影响因素导致对药品安全的误判, 使结果的评价更加科学合理。

5.5 本研究的给药方法参考了临床用药: 实验兔耳缘静脉滴注给药; 给药速度与临床用药速度一致; 动物给药频次为每日 1 次, 连续给药 3 d, 给药总剂量与临床成人一个疗程给药的总剂量相等。文中“2.2”供试液浓度考察中之所以给药后观察 48 h, 是有意将观察时间缩短, 以考察观察时间对结果判断的影响。

5.6 欧洲制药工业协会联合会和欧洲替代方法验证中心 2001 年《关于对动物不同途径给药或采血时所能允许的给药体积和采血体积指导原则》提出, 家兔静脉注射给药最大体积不超过 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 非连续输注给药 4 h 内给药体积不超过 $24 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$; 连续输注给药 24 h 内不超过 $72 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。原标准中家兔静脉滴注药物侧与对照侧均是 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 未注明给药间隔, 若两侧同时滴注, 相当于家兔一次接受的最大体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。本研究每次单侧给药体积为 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 药物侧与对照侧间隔 4 h 滴注使药液充分代谢, 24 h 内滴注体积小于 $72 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,

方法可行。

5.7 本研究检查指标: 每天给药前以及最后一次给药后 1、6 h 及 24~72 h 对动物和注射部位进行肉眼观察, 包括出血、红肿、水肿及充血程度。给药结束后第 3 日取一半动物的耳缘静脉做病理学检查, 观察药物对血管的刺激性作用; 另一半动物继续饲养, 至给药结束后 14 d 恢复期满, 取动物耳缘静脉做病理学检查, 检查药物对血管刺激性反应的可逆程度。

5.8 在供试液浓度考察试验中, 稀释液对照为单设的一组动物, 未采用药物组对侧耳缘静脉作为对照的实验法, 是防止因供试液刺激作用较大, 导致自体自身对照的对照侧血管也出现刺激性反应, 避免对照侧出现假阳性。在确定 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度不会引起对照侧发生刺激性作用后, 本着节约动物的原则, 采用自体自身对照的方法。试验中多次设置了完全的空白对照, 是便于滴注药物或稀释液出现刺激性后进行对比, 同时也是对动物血管正常的一种确认。

5.9 研究表明, 使用 FAA 液固定血管标本会造成血管内红细胞形态结构异常, 细胞破裂, 血红蛋白外溢呈丝网状粘附于血管腔壁, 容易造成对血管刺激性的误判。同时试验表明, 银杏内酯注射液在稀释浓度较高的情况下会对血管形成刺激, 但临床用药并未使用这一高浓度, 因此使用高于临床浓度的供试液开展血管刺激试验, 也会造成对产品安全性的误判, 故本研究修改了标准中的试验浓度。

5.10 本研究并未采取减少每天滴注体积与药量, 加长滴注时间至 7 d 的做法, 因为滴注次数越多家兔的耳缘静脉取标本越困难。试验共滴注 3 d, 相当于每日滴注量为临床每日用药量的 4.7 倍, 因此修订标准在安全性上更有保障。

5.11 本研究对银杏内酯注射液“刺激性试验”检查项提出了修改意见, 修改内容包括: 将现行标准中的“刺激性试验”名称修改为“血管刺激”; 修改了供试液浓度, 由 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 改为临床用药浓度 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 增加了 14 d 恢复期, 以充分考虑药物静脉给药引起一定的刺激性反应, 只要该刺激能可逆恢复, 也属安全; 修改了血管标本的固定剂, 将 FAA 液修改为 10% 福尔马林溶液。

致谢: 本研究的病理检查均是由四川省食品药品检验检测院药理室完成, 在此表示衷心感谢!

参考文献

- [1] 国家食品药品监督管理局标准 YBZ00702011 [S].
- [2] 国家食品药品监督管理局. 药物刺激性、过敏性和溶血性研究技术指导原则 [S]. 2014 (收稿日期: 2017-08-09)