

放射免疫分析法测定重组人甲状旁腺素(1-84)的血药浓度及其药动学研究

周杏琴*,蔡刚明,钦晓峰,邹美芬,徐希杰,张建康(江苏省原子医学研究所/卫生部核医学重点实验室/江苏省分子核医学重点实验室,江苏无锡 214063)

中图分类号 R969.1;R816.8 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)06-0516-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.06.14

摘要 目的:建立测定注射用重组人甲状旁腺素(rhPTH)(1-84)血药浓度的方法并对其药动学进行研究,为rhPTH(1-84)I期临床试验提供准确的测定方法。方法:采用放射免疫分析(RIA)法,以甲状腺素放射免疫试剂盒(ELISA-rhPTH)测定rhPTH(1-84)血药浓度。结果:rhPTH(1-84)血药浓度在24~520 pg/ml范围内线性关系良好($r=0.998\ 9$),最低定量限为10 pg/ml;血浆提取回收率为86.7%~92.8%;日内RSD<7%,日间RSD<9%;血浆样本-80℃贮存80 d稳定性良好。患者皮下注射2.0 μg/kg rhPTH(1-84)后的主要药动学参数分别为: t_{\max} (0.63±0.28)h、 c_{\max} (146.55±46.35)pg/ml、 $AUC_{0-10\ h}$ (532.36±132.54)pg/ml。结论:本法特异性好、灵敏度高、操作简便。

关键词 放射免疫分析法;注射用重组人甲状旁腺素(1-84);血浆;稳定性;药动学

Determination of Plasma Concentration Recombinant Human Parathyroid Hormone (1-84) for Injection by RIA and Its Pharmacokinetics Study

ZHOU Xing-qin*, CAI Gang-ming, QIN Xiao-feng, ZOU Mei-fen, XU Xi-jie, ZHANG Jian-kang (Jiangsu Institute of Atomic Medicine/Key Laboratory of Nuclear Medicine, Ministry of Health/Jiangsu Key Laboratory of Molecular Nuclear Medicine, Jiangsu Wuxi 214063, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of plasma concentration of recombinant human parathyroid hormone (rhPTH) (1-84) for injection and study its pharmacokinetics, to provide method for clinical trial of rhPTH (1-84). METHODS: By radioimmunoassay (RIA), plasma concentrations of rhPTH (1-84) were determined with ELISA-PTH kit. RESULTS: The linear ranges of rhPTH(1-84) were 24-520 pg/ml ($r=0.998\ 9$). The lowest detection limit was 10 pg/ml. The extraction recoveries in plasma were 86.7%-92.8%; intra-day RSD was less than 7% and inter-day RSD was less than 9%. The plasma samples were stored for 80 days at -80℃ with good stability. Main pharmacokinetic parameters of rhPTH(1-84) after subcutaneous injection of 2.0 μg/kg were t_{\max} (0.63±0.28)h, c_{\max} (146.55±46.35)pg/ml, $AUC_{0-10\ h}$ (532.36±132.54)pg/ml. CONCLUSION: The method is specific, sensitive and simple.

KEY WORDS Radioimmunoassay; Recombinant human parathyroid hormones (1-84) for injection; Plasma; Stability; Pharmacokinetics

多,肺炎克雷伯菌检出率高符合我院实际情况。表3显示,主要G⁻菌对氨苄西林、头孢吡辛、头孢唑林的耐药率均>70%,而对哌拉西林/他唑巴坦、亚胺培南、阿米卡星的耐药率低,这可能与我院临床广泛应用头孢菌素类有关,与高英杰等^[6]报道相似,应引起临床医师的足够重视。

G⁺菌以溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌为主。表4显示,此3种病原菌对青霉素、苯唑西林有较高的耐药性,其中溶血葡萄球菌、金黄色葡萄球菌对青霉素耐药率分别达100%和94.12%;溶血葡萄球菌及表皮葡萄球菌对苯唑西林耐药率均为100%。提示我院治疗葡萄球菌感染,青霉素与苯唑西林已不能使用。结果还显示对葡萄球菌,第1、2代头孢菌素类、喹诺酮类耐药率较低,可用于敏感的葡萄球菌感染;万古霉素、替考拉宁、利福平的耐药率为0,可用于葡萄球菌严重感染或严重耐药的患者。

本次调查发现,妇幼保健专科医院病原菌的分布及耐药情况有其自身的特点,病原菌主要以支原体为主,其对大环内酯类耐药率高,提示临床医师在治疗解脲脲原体+人型支原体混合感染时已不能选用大环内酯类药,应选用耐药率低的四环素类药。肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、鲍曼不动杆菌对头孢

菌素类耐药率高,而溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌对青霉素、苯唑西林有较高的耐药率。可见,及时了解病原菌的分布及耐药情况,不仅可指导本院临床合理使用抗菌药物、减少耐药菌的产生,而且对本地区其他妇幼专科医院合理地使用抗菌药物也有参考价值。

参考文献

- [1] 张小庄,赵长安,周才,等.广东省妇幼保健院病原菌谱及其变迁分析[J].中国基层医药,2009,16(10):1763.
- [2] 丁艺.500例宫颈分泌物支原体检测及支原体药敏分析[J].中国现代医生,2011,49(16):125.
- [3] 薛文成,孟冬娅,万楠,等.2006年泌尿生殖系统支原体感染状况及耐药性分析[J].中国实验诊断学,2007,11(3):335.
- [4] Pereyre S, Renaudin H, Charron A, et al. Emergence of a 23S rRNA mutation in Mycoplasma hominis associated with a loss of the intrinsic resistance to erythromycin and azithromycin[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 57(4): 753.
- [5] 李岸英,刘忠,何芳.2008年玉林市妇幼保健院病原菌分布及耐药性分析[J].实用预防医学,2010,17(3):533.
- [6] 高英杰,马瑛.我院2011年病原菌分布情况及耐药性分析[J].中国药房,2012,23(26):2441.

(收稿日期:2012-08-04 修回日期:2012-08-26)

* 研究员。研究方向:药物研制及其应用。电话:0510-85514482-3523。E-mail:houxingqin@jsinn.org

由美国NPS-Allielix公司研发的注射用重组人甲状旁腺素(rhPTH)(1-84)具有增加骨密度、增强骨质的显著功能,已被FDA批准用于治疗妇女绝经后骨质疏松症^[1-3]。其临床应用前景良好,国内已有多家生物制药公司在研发中。有文献报道^[4]用酶联免疫分析(ELISA)法对rhPTH(1-84)的药动学 and 安全性进行了评估。本试验采用放射免疫分析(RIA)法测定rhPTH(1-84)在人血浆中的浓度,并对方法学进行了系统验证,全面考察了rhPTH(1-84)在血浆中的稳定性和贮存条件。在ELISA及RIA分析法中,由于血浆成分的复杂性,造成的测定结果重复性和稳定性差等缺陷,笔者采用添加抑肽酶、固相萃取等多种途径降低了影响因素,提高了测定结果的重复性和稳定性,为rhPTH(1-84) I期临床试验提供了准确的测定方法。

1 材料

1.1 仪器

1470 Wizard型放免 γ 测量仪(美国Perkin Elmer公司);-80℃超低温冰箱(美国Revco公司);GKC214控温水浴锅(上海苏达实验仪器有限公司);TDL-5000C低速台式冷冻多管离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

甲状腺素放射免疫(简称“放免”)试剂盒(ELSA-PTH,法国Cisbio International公司);rhPTH1-84标准品(美国Sigma-Aldrich公司,批号:055K13631,纯度:97%,0.97 mg/mg);注射用rhPTH(1-84)(重庆科润生物医药研发有限公司,批号:20080801,纯度:95%,47.5 μ g/50 μ g)。

2 方法与结果

2.1 标准溶液的制备

取rhPTH(1-84)标准品,用去离子水溶解振荡,配制成质量浓度分别为0、24、55、177、520、1 850 pg/ml的标准溶液;内质控(PC):配制含rhPTH(1-84)标准品质量浓度为46 pg/ml的溶液;外质控(QC):配制含rhPTH(1-84)标准品质量浓度为25、250、500 pg/ml的3种标准溶液,分装于离心管中,-80℃保存待用。

2.2 操作流程

取rhPTH(1-84)标准品200 μ l或血浆样品加入ELISA试管中,分别加入¹²⁵I标记的抗rhPTH抗体100 μ l振荡3 min,复管测试,25℃孵育(18 \pm 2)h,弃上清,加吐温20,5 min后弃上清,重复洗涤4次。以 γ -计数计(γ -count)测每分钟计数值(CPM)。

2.3 计算方法

用CPM(y)对rhPTH(1-84)浓度(x)作图,得回归方程 $y=ax$ 。从方程中求得血浆样品浓度,用DAS 2.0软件计算药动学参数。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围考察:取质量浓度为0、24、55、177、520、1 850 pg/ml的rhPTH(1-84)标准溶液,按“2.2”项下操作流程操作,得标准曲线。采用二次拟合可知在24~1 850 pg/ml范围内线性关系较好,二项式方程为: $y=-0.004 2x^2+21.786x(r=1.000 0)$;采用直线回归在24~520 pg/ml范围内线性关系良好,线性回归方程为: $y=19.791x(r=0.998 9)$ 。由于血浆中rhPTH(1-84)质量浓度<500 pg/ml,故本试验采用直线回归法。分别考察了不同批次的多条线性关系,PC、QC随标准曲线用于考察测定精确度,各项质控标准测量值相对误差均<10%。

2.4.2 精密性及准确度:取高、中、低3个质量浓度的QC样本,按“2.2”项下操作流程操作,每个质控浓度重复测定5次,连续

测定3 d,根据当日的标准曲线,计算QC样品的测得量,进行方差分析,考察本法的精密度和准确度。精密性用相对标准偏差(RSD)表示,准确度用相对误差(RE)表示,结果见表1。

表1 精密性、准确度及回收率试验结果(n=5)

加入量,pg/ml	测得量,pg/ml	日内RSD,%	日间RSD,%	RE,%	平均提取回收率,%
25	27.47 \pm 2.05	6.65	7.5	9.87	86.7
250	254.7 \pm 16.35	2.76	6.3	1.88	98.9
500	515.95 \pm 22.50	2.06	8.8	3.19	92.8

2.4.3 回收率试验:精密配制含rhPTH(1-84)低、中、高质量浓度的血浆样品,按放免分析操作流程进行操作,测得的浓度除以标准浓度,计算提取回收率。结果见表1。

2.4.4 最低定量限:精密配制含rhPTH(1-84)的血浆样品并稀释至质量浓度为10 pg/ml,按放免分析操作流程进行操作,重复测定5次,考察精密性和精确度。结果RSD为6.54%,RE为13.0%。表明最低定量限可为10 pg/ml。

2.4.5 抑肽酶用量的考察:收集健康人空白血浆于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝试管中,然后转移至含不同浓度抑肽酶的离心管中,摇匀,4℃下3 000 r/min离心10 min,分取血浆。精密配制高、中、低质量浓度rhPTH(1-84)于含不同量抑肽酶的血浆样本,按放免操作流程测定,抑肽酶用量对测定结果的影响见表2,因此本试验血浆中采用0.5 TIU/ml的抑肽酶。

表2 抑肽酶用量对测得结果的影响(pg/ml)

加入浓度,pg/ml	抑肽酶用量,TIU/ml				
	0	0.2	0.5	0.8	1.0
25	21.3 \pm 2.8	22.8 \pm 3.5	26.8 \pm 2.7	24.1 \pm 2.3	25.3 \pm 2.9
250	220.1 \pm 13.4	225.4 \pm 14.5	243.6 \pm 10.6	233.7 \pm 17.3	240.6 \pm 13.2
500	438 \pm 26.3	439 \pm 25.6	509 \pm 35.2	489 \pm 27.6	491 \pm 33.4

2.5 稳定性考察

配制含rhPTH(1-84)低、中、高质量浓度的血浆样品分装于数支离心管中,于4℃、室温分别放置6 h,-80℃反复冻融3次,-80℃贮存80 d,按放免分析操作流程进行操作,测定血浆中rhPTH(1-84)的质量浓度。结果,室温放置超过6 h,rhPTH(1-84)在血浆中浓度下降到原浓度的75.2%~77.6%;4℃放置6 h以上、反复冻融3次,-80℃贮存80 d,rhPTH(1-84)在血浆中浓度维持在90%~110%之间,显示良好稳定性。不同批次rhPTH(1-84)稳定性试验结果(n=60)见图1;rhPTH(1-84)长期贮存稳定性试验结果见图2。

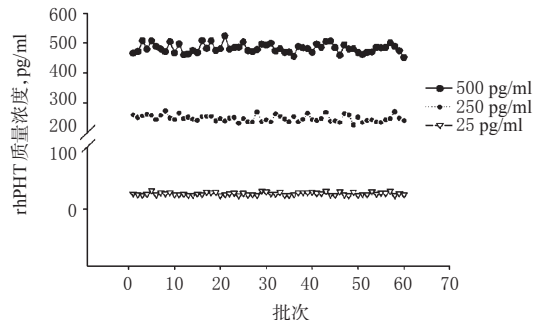


图1 不同批次rhPTH(1-84)稳定性试验结果

Fig 1 Results of stability tests of different batches of rhPTH (1-84)

2.6 药动学研究

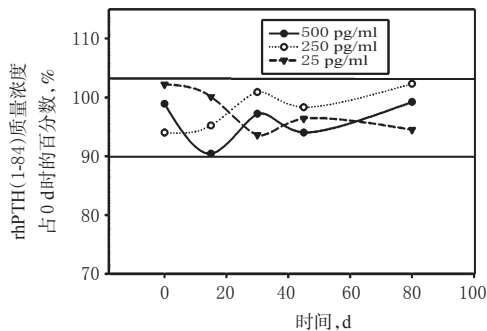


图2 rhPTH(1-84)长期贮存稳定性试验结果

Fig 2 Results of long-term storage stability of rhPTH (1-84)

10名健康自愿者皮下注射2.0 μg/kg rhPTH(1-84),分别于给药前5 min与给药后5、15、30、60、90、120、180、240、360、480、600 min时采集静脉血3 ml置于含EDTA抗凝试管中,4℃下于3 000 r/min离心10 min,分取血浆,按放免操作流程测定。将所测得的血浆rhPTH(1-84)浓度用动力学软件DAS 2.0处理,主要药动学参数见表3;药-时曲线见图3。

表3 患者皮下注射2.0 μg/kg rhPTH(1-84)后的主要药动学参数

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of rhPTH (1-84) after subcutaneous injection of 2.0 μg/kg

药动学参数	单剂量(2.0 μg/kg)
t_{max} , h	0.63 ± 0.28
C_{max} , pg/ml	146.55 ± 46.35
$t_{1/2}$, h	2.56 ± 1.34
V_z , L	12.03 ± 3.78
CL _z , L/h	3.32 ± 1.02
AUC _{0-10h} , pg·h/ml	532.36 ± 132.54
AUC _{0-∞} , pg·h/ml	625.48 ± 174.63

3 讨论

在放免分析法中,非特异性结合对测定结果影响较大,而且影响测定的重复性。本试验对洗涤试剂、洗涤方式和过程进行了探索,最后确定采用吐温20,每次用3 ml,5 min后弃上清,重复洗涤4次使非特异性结合较低,而且结果稳定、重复性好,回收率和精确度较高。

血药浓度检测的影响因素较多,其中药物的降解对结果的影响较大。本试验采用添加抑肽酶来抑制样本中蛋白酶的活性,防止被测物的降解。内源性rhPTH及其他蛋白多肽,也

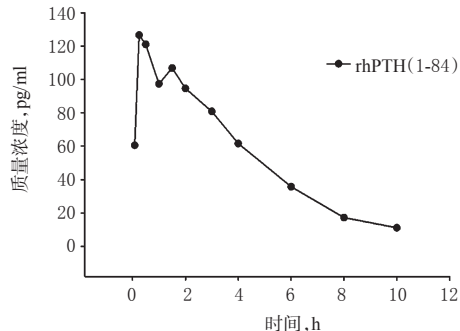


图3 患者皮下注射2.0 μg/kg rhPTH(1-84)后的药-时曲线

Fig 3 Mean concentration-time curves of rhPTH (1-84) after subcutaneous injection of 2.0 μg/kg

会影响血药浓度的测定结果。本试验采用固相萃取将药物富集于柱子上,通过合适的洗脱条件将药物浓缩,除去了干扰因素,提高了特异性。本试验为注射用rhPTH(1-84) I期临床试验建立了准确的测定方法,该法可应用于rhPTH的临床样品检测。

参考文献

- [1] Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, et al. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells[J]. *Gene*, 2002, 282(1): 1.
- [2] Stewart AF, Cain RL, Burr DB, et al. Six-month daily administration of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein peptides to adult ovariectomized rats markedly enhances bone mass and biomechanical properties: a comparison of human parathyroid hormone 1-34, parathyroid hormone-related protein 1-36, and SDZ-parathyroid hormone 893[J]. *J Bone Miner Res*, 2000, 15(8): 1 517.
- [3] 吴浩. 重组人甲状旁腺素治疗骨质疏松症的研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2006, 25(4): 302.
- [4] Li Q, Qiao J, Deng JG, et al. Safety, tolerability and pharmacokinetic study of recombinant human parathyroid hormone [rhPTH (1-84)] in Chinese healthy volunteers[J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2009, 29(4): 431.

(收稿日期:2011-10-15 修回日期:2011-11-18)

卫生部党组书记张茅要求:贯彻落实党的“十八大”精神,坚持走中国特色卫生改革发展道路

本刊讯 2013年1月8日,卫生部党组书记张茅在全国卫生工作会议上指出,党的“十八大”把提高人民健康水平作为深入贯彻落实科学发展观、全面建成小康社会、建设社会主义现代化强国的一项重要任务,指明了卫生工作的目标方向。全国卫生系统必须结合工作实际,全面理解、准确把握“十八大”对卫生工作的新要求,把“十八大”精神作为新的历史阶段做好卫生工作的根本指导思想。

一是要坚持卫生工作为人民健康服务的根本方向。二是要坚持把基本医疗卫生制度作为公共产品向全民提供。三是

要坚持预防为主、以农村为重点、中西医并重。四是要坚持保基本、强基层、建机制。五是要坚持统筹推进医疗保障、医疗服务、公共卫生、药品供应和监管体制综合改革。

张茅号召,全国卫生系统要把学习宣传贯彻“十八”大精神作为当前和今后一个时期的首要政治任务,不断加深对中国特色卫生改革发展道路的丰富内涵、理论基础、制度安排的理解和把握,在党的领导下,实践好、发展好、完善好这条符合国情、独具特色的卫生改革发展之路。