

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.04.029

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20201124.1752.015.html>(2020-11-25)

基于流动注射化学发光法建立高灵敏检测血浆 头孢哌酮的方法研究^{*}

刘翠颖¹, 段天昱¹, 刘俊红¹, 韩俊茹¹, 李胜强^{2△}

(1. 天津市西青医院健康体检科, 天津 300000; 2. 天津中医药大学第一附属医院检验科, 天津 300000)

[摘要] **目的** 建立流动注射化学发光法测定血浆头孢哌酮的新方法。**方法** 在碱性介质中, 头孢哌酮对铁氰化钾与鲁米诺化学发光体系有明显的增敏作用, 据此建立了一种测定头孢哌酮的流动注射化学发光新方法, 并对分析条件进行优化。通过方法学评价及对血浆头孢哌酮的测定, 评估建立方法的性能。**结果** 在确定的最佳实验条件下, 该分析体系的相对化学发光强度的变化与头孢哌酮的浓度在 $0.2 \times 10^{-5} \sim 5.2 \times 10^{-5}$ g/mL 呈良好的线性关系, 检测限为 7.1×10^{-7} g/mL。对含 3.0×10^{-5} g/mL 和 4.0×10^{-5} g/mL 头孢哌酮的溶液分别平行测定 11 次, 测定结果的相对标准偏差分别为 2.49% 和 0.51%。**结论** 本方法分析成本低, 灵敏度高、分析速度快, 可用于血浆中头孢哌酮浓度的测定。

[关键词] 头孢哌酮; 流动注射; 发光; 铁氰化钾; 鲁米诺

[中图分类号] R978.1+2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2021)04-0670-05

Study on a method for the determination of Cefoperazone in human plasma based on flow injection chemiluminescence^{*}

LIU Cuiying¹, DUAN Tianyu¹, LIU Junhong¹, HAN Junru¹, LI Shengqiang^{2△}

(1. Department of Physical Examination, Tianjin Xiqing Hospital, Tianjin 300000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a new flow injection chemiluminescence method for the determination of Cefoperazone in plasma. **Methods** Based on that Cefoperazone could enhance the chemiluminescence intensity of potassium ferricyanide-luminol reaction system in alkaline condition, a new flow injection chemiluminescence method for the determination of Cefoperazone was developed, and the conditions of the analysis system were optimized. The performances of established method were determined by methodological evaluation and plasma Cefoperazone concentration assay. **Results** Under the optimal conditions, the change of the relative chemiluminescence intensity of the analysis system had a good correlation with the concentration of Cefoperazone in the range of $0.2 \times 10^{-5} - 5.2 \times 10^{-5}$ g/mL, and the lower limit of detection was 7.1×10^{-7} g/mL. The relative standard deviation were 2.49% and 0.5% for the determination of 3.0×10^{-5} g/mL and 4.0×10^{-5} g/mL Cefoperazone (n=11). **Conclusion** The established method has the the low cost, high sensitivity, the quick speed of analysis. It could be applied to determine the concentration of Cefoperazone in plasma samples.

[Key words] cefoperazone; flow injection; luminescence; potassium ferricyanide; luminol

在治疗细菌性感染的临床实践中, 具有 β -内酰胺环结构的头孢菌素是最常用的 1 种抗生素^[1-2]。而头孢哌酮是第 3 代广谱半合成头孢菌素, 对大多数革兰阳性厌氧菌、某些类型的革兰阴性厌氧菌和肺炎球菌

都具有良好的治疗作用。因此, 临床常常用于治疗敏感菌群所导致的呼吸道感染、胆道感染和败血症等^[3]。

近年来, 随着细菌耐药性的逐年增加, β -内酰胺类

* 基金项目: 天津中医药大学第一附属医院“拓新工程”基金(201905)。 作者简介: 刘翠颖(1991-), 主管技师, 硕士, 主要从事临床检验诊断研究。 △ 通信作者, E-mail: yixuelishengqiang@163.com。

抗生素对 β -内酰胺酶变得越来越敏感。为了应对这种情况,临床医生常常将 β -内酰胺类抗生素与 β -内酰胺酶抑制剂联合使用治疗敏感菌群所导致的感染^[4],但合理的使用抗生素需要实时监测患者体内抗生素的血药浓度。相关报道显示,头孢哌酮在人体内的药代动力学个体差异非常大,特别是对于那些颅内感染的患者,由于人类血脑屏障的天然存在,很大程度阻止了抗菌药物在脑脊液中的渗透,因此,药物在患者颅内就很难达到有效的抑菌浓度^[5]。而对于肝肾功能不全的患者,由于其自身原因使药物的半衰期延长,造成药物在体内积累,极易引起严重的不良反应。因此,临床上常常需要监测这些患者体内抗菌药物的浓度,最大限度地减小药物毒性并提高药物疗效,从而降低药物不良反应的发生率^[6]。基于以上原因,急需发展一种监测人体内头孢哌酮浓度新的方法,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

MPI-B 型多参数化学发光分析仪购自西安瑞迈公司; Millipore-Q 纯水仪购自密理博中国公司; KQ3200DB 型数控超声清洗器购自昆山市超声仪器有限公司; Thermo 高速离心机购自赛默飞世尔公司。

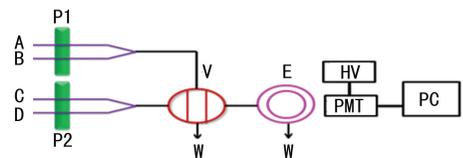
1.2 方法

1.2.1 储备液制备

头孢哌酮标准储备液(1.0×10^{-4} g/mL)的制备:称取 0.010 0 g 的头孢哌酮标准品(华工标准物质),用适量的去离子水溶解后,定容至 100 mL 并置于 4 °C 冰箱备用。铁氰化钾储备液(2.0×10^{-3} mol/L)的制备:称取 0.065 9 g 铁氰化钾(上海生工生物工程有限公司)用适量的去离子水溶解后,定容至 100 mL 并贮于容量瓶备用。鲁米诺储备液(2.0×10^{-3} mol/L)的制备:称取 0.035 4 g 鲁米诺(上海生工生物工程有限公司),用适量的 0.12 mol/L 氢氧化钠(上海生工生物工程有限公司)溶解后,定容至 100 mL,贮于棕色容量瓶中备用,使用时用 0.12 mol/L 氢氧化钠溶液逐级稀释。所有试剂均为分析纯级别且未经进一步纯化,实验中所使用的水均是 18 M Ω 的去离子水。

1.2.2 实验方法

试剂和样品溶液(A~D)通过蠕动泵输送,通过旋转注射阀(V)将样品溶液和试剂引入流通检测池(E)中,充分混合后发生化学反应并产生发光信号,由于产生信号微弱,需经光电倍增管(PMT)放大后并输入计算机中进行检测分析,见图 1。其中,当 A 流路为纯水时产生的信号为空白信号记为 I_0 ,当 A 流路为头孢哌酮时产生的信号为增强信号记为 I_a ,那么该体系的相对发光强度则为 $I_a - I_0$,记为 ΔI 。



A: 样品溶液或空白溶液; B: 鲁米诺溶液; C: 氢氧化钠溶液; D: 铁氰化钾溶液; P1 和 P2: 蠕动泵; V: 旋转注射阀; E: 流通池; W: 废液池; PMT: 光电倍增管; HV: 负高压; PC: 计算机。

图 1 流动注射化学发光法测定头孢哌酮示意图

1.2.3 仪器参数

1.2.3.1 采样时间的选择

由于该体系的反应动力学快,因此,选择合适的采样时间就显得非常重要。本研究评估了 5~20 s 仪器采样时间对该体系的相对发光强度的影响,参考相关文献及经验发现,当采样时间为 5 s 时,该反应体系的相对发光强度就能够达到最大且信号稳定。因此,采样时间确定为 5 s。

1.2.3.2 泵速的选择

泵速过大或过小都可能影响整个方法的分析性能,为了获得较低的检测限和较宽的线性范围,本研究观察了蠕动泵的速度对该体系的相对发光强度的影响,参考相关文献及经验发现,当泵速达到 30 r/min 时,该体系的能够获得较高相对发光强度且信号稳定。因此,泵速确定为 30 r/min。

1.2.3.3 光电倍增管负高压的选择

为了获得该体系相对发光强度的最佳信噪比,本研究评估了光电倍增管的负高压在 600~800 V 的变化对该体系相对发光强度的影响,参考相关文献及经验发现,当负高压为 650 V 时,该体系的信噪比最优。因此,光电倍增管负高压确定为 650 V。

1.2.4 干扰实验

药物中包含的各种无机物化合物、有机化合物及其赋形剂和血浆中的一些物质可能对头孢哌酮测定的存在影响。为了验证该方法的特异性,在选定的最优实验条件下,以相对标准偏差小于 5% 的允许量,检测样品中的常见物质对血浆头孢哌酮测定的可能影响。

1.2.5 样品分析

为了进一步评价该方法的可靠性和实际样品的检测能力。取健康志愿者血浆,用适量去离子水稀释并加入头孢哌酮,待用。检测时,用去离子水稀释至该方法的线性范围内,用建立的流动注射化学发光法测定后,计算出血浆中头孢哌酮的含量,最后对测定样品行加标回收实验。

2 结果

2.1 分析条件的优化

2.1.1 反应物混合顺序的选择

该反应体系中许多试验条件都影响着相对化学

发光强度,其中反应物混合顺序对相对化学发光强度的影响比较明显。研究表明,(头孢哌酮+鲁米诺)+(氢氧化钠+铁氰化钾)相对化学发光强度比另两种(头孢哌酮+氢氧化钠)+(鲁米诺+铁氰化钾)和(头孢哌酮+铁氰化钾)+(氢氧化钠+鲁米诺)相对化学发光强度大且稳定。因此,选择(头孢哌酮+鲁米诺)+(氢氧化钠+铁氰化钾)作为后续试验的混合顺序。

2.1.2 鲁米诺浓度的选择

鲁米诺是该反应体系中的发光基质,其浓度的变化对该体系的相对化学发光强度有明显影响,因此,为了获得较高和稳定的化学发光信号,本研究评估了鲁米诺浓度在 $1 \times 10^{-6} \sim 11 \times 10^{-6}$ mol/L 的变化对该体系相对发光强度的影响。结果表明,当鲁米诺浓度为 9×10^{-6} mol/L 时,该反应体系的相对发光强度较高且稳定,见图 2。

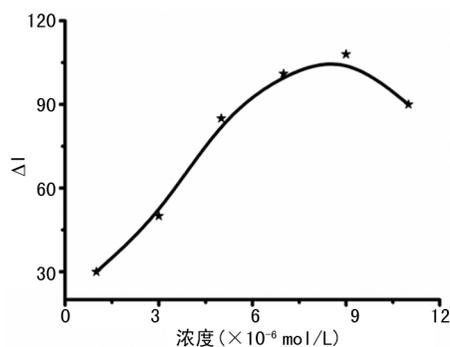


图 2 鲁米诺浓度

2.1.3 铁氰化钾浓度的选择

该体系中的氧化剂是铁氰化钾,很明显其浓度变化对相对化学发光强度有影响。因此,本研究评估了浓度在 $8 \times 10^{-6} \sim 30 \times 10^{-6}$ mol/L 的铁氰化钾溶液对相对发光强度产生的影响。结果如图 3 所示,随着铁氰化钾浓度的增加,该体系的相对发光强度持续增强,但当铁氰化钾浓度超过 25×10^{-6} mol/L 后,该体系的相对发光强度反而逐渐减弱且稳定性变差,见图 3。

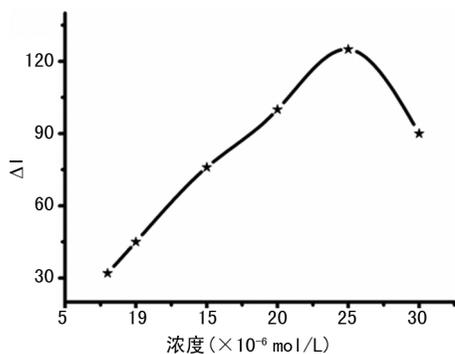


图 3 铁氰化钾浓度

2.1.4 碱性介质的选择

碱性介质对该反应体系的相对发光强度也有明显的影响,氢氧化钠比碳酸钠和碳酸氢钠对铁氰化钾与鲁米诺体系的发光强度增敏作用大且信号稳定,故选用氢氧化钠作为本研究的碱性介质。本研究分析了氢氧化钠在 $30 \times 10^{-3} \sim 140 \times 10^{-3}$ mol/L 变化对该体系相对化学发光强度的影响。研究表明,当氢氧化钠浓度为 120×10^{-3} mol/L 时,该体系的相对发光强度最大且稳定,见图 4。

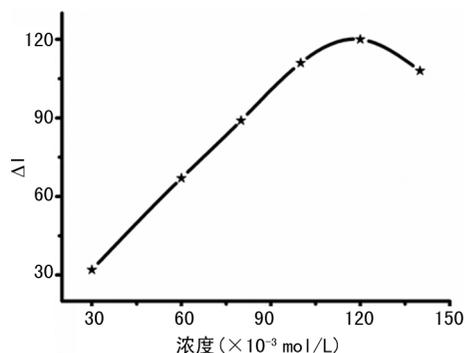


图 4 氢氧化钠浓度

2.2 标准曲线、检出限及精密度

通过对影响实验的主要条件(包括鲁米诺的浓度、铁氰化钾的浓度及碱性介质的选择及其浓度的确定等)优化,确定了最优的实验条件。在此条件下,采用流动注射化学发光法检测血浆中头孢哌酮的浓度,见图 5。该体系相对发光强度与头孢哌酮在 $0.2 \times 10^{-5} \sim 5.2 \times 10^{-5}$ g/mL 呈良好线性关系,该反应的线性方程是 $\Delta I = 2672.60 + 2.76 \times 108 C$,相关系数为 0.986 0,根据 IUPAC 建议,以 3 倍空白标准偏差计算该方法的检出限为 7.1×10^{-7} g/mL,该方法精密度的确认是采用多次平行测定不同浓度的头孢哌酮方法(浓度为 3.0×10^{-5} g/mL, 4.0×10^{-5} g/mL, $n=11$),测定结果的相对标准偏差(RSD)分别为 2.49% 和 0.51%。因此,该体系所建立的分析方法有良好的重复性。

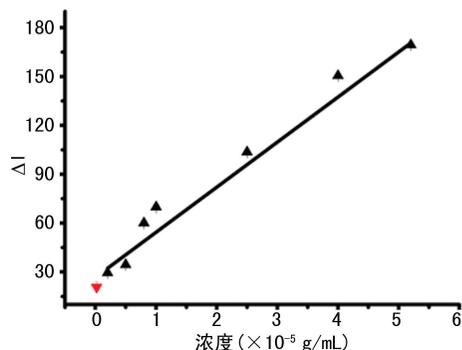


图 5 头孢哌酮的校正曲线

2.3 干扰实验结果

300 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 NH_4^+ 、 SO_4^{2-} 、 NO_3^- 、 PO_4^{3-} , 60 倍的复合维生素、复合氨基酸、淀粉、葡萄

糖和糊精均不影响血浆中头孢哌酮测定。因此,该方法具有良好的特异性。

2.4 样品分析结果

该方法对血浆中头孢哌酮回收率在 100.5%~101.0%,RSD 为 1.10%~6.11%,见表 1。

表 1 建立的方法对血浆头孢哌酮的回收实验

序号	标示值 ρ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测量值 ρ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量 ρ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量 ρ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	RSD (%)
1			2.0	5.00	100.5	5.13
2	3	2.99	4.0	7.03	101.0	6.11
3			6.0	9.03	100.6	1.10

3 讨论

本课题组成功构建了一种检测血浆中头孢哌酮的流动注射化学发光的新方法。本研究中优选了反应物的混合顺序,通过对各反应物浓度的逐项研究,确定了在本研究中当鲁米诺为 9×10^{-6} mol/L、铁氰化钾为 25×10^{-6} mol/L、氢氧化钠为 120×10^{-3} mol/L 时,该体系的相对化学发光强度最大且稳定。同时还优化了实验仪器的关键参数,优选出了 5 s 的采样时间,30 r/min 的泵速及 650 V 的负高压。在此实验条件下,该反应体系的相对化学发光强度与 $0.2 \times 10^{-5} \sim 5.2 \times 10^{-5}$ g/mL 的头孢哌酮呈良好的线性关系。检出限为 7.1×10^{-7} g/mL,该方法的灵敏度高、选择性强、精密度优,并成功地运用于人血浆中头孢哌酮含量测定。

据报道,目前检测头孢哌酮大多采用高效液相色谱法^[7-9]、芯片电泳^[4]、紫外分光光度法^[10]、二维高效液相色谱法^[3]、液相色谱-串联质谱法^[11-13]等。毫无疑问,以上这些方法可以准确地监测患者体内头孢哌酮的浓度,但是仍然存在一些明显缺点,如高效液相色谱法/二维高效液相色谱法不仅需要高纯度的有机溶剂和复杂的前期样品准备,且方法稳定时间较长;液相色谱-串联质谱法除需要昂贵的实验仪器外,还需要专门人才进行操作。因此,建立一种简便、灵敏、低成本的检测头孢哌酮的新方法十分必要。

一般来说,化学发光是在放热化学反应过程中产生的电磁辐射^[14]。近年来,流动注射化学发光法作为一种定量分析方法,因其具有宽泛的线性范围、较高的灵敏度及较快的响应速度等优点,在环境检测、医药卫生、食品分析等领域得到了广泛应用^[15-17]。迄今为止,以鲁米诺体系为基础的头孢哌酮流动注射分析方法还少见报道。因此,本课题组建立了以鲁米诺体系为基础的流动注射化学发光法分析血浆中头孢哌酮的浓度。

综上所述,本文基于头孢哌酮对鲁米诺与铁氰化钾化学发光体系的增敏作用,首次建立了一种流动注

射化学发光法测定血浆中头孢哌酮。相对于彭国荏等^[3]报道的传统的色谱分析法,该方法不仅克服了包括仪器昂贵、预处理工艺复杂、操作专业等明显缺点,且实现了操作简单、5 s 内快速完成采样、低成本的检测人血浆中的头孢哌酮的浓度。为了使该方法达到最优性能,本课题组对可能影响该方法的实验因素进行了优化,最终确定了适合该方法的最佳鲁米诺和铁氰化钾的浓度及最佳碱性介质及其浓度等,在此实验条件下,本研究建立了检测头孢哌酮的标准曲线,该曲线展示出了较宽的线性范围(达 1 个数量级),较高的灵敏度(检出限达 7.1×10^{-7} g/mL)及较快的分析速度。该方法不仅可满足该药的临床治疗浓度监测,且为其他抗生素的血药浓度监测和快速分析检测提供了一种新思路。更进一步讲,这种基于铁氰化钾与鲁米诺化学发光体系所建立流动注射化学发光法为生物医学研究、临床化学、新药研发及环境监测等领域的广泛应用奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] HAMILTON-MILLER J M. Development of the semi-synthetic penicillins and cephalosporins[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 31(3): 189-192.
- [2] DRAWZ S M, BONOMO R A. Three decades of beta-lactamase inhibitors[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2010, 23(1): 160-201.
- [3] 彭国荏, 曹毅, 王峰, 等. 基于二维高效液相色谱的头孢哌酮血药浓度测定[J]. *中南药学*, 2019, 17(1): 105-108.
- [4] TAN Y, SONG Q, LIU W, et al. Dual-channel microchip electrophoresis with amperometric detection system for rapid analysis of cefoperazone and sulbactam[J]. *Anal Sci*, 2019, 35(10): 1103-1109.
- [5] WANG Q, WU Y, CHEN B, et al. Drug concentrations in the serum and cerebrospinal fluid of patients treated with cefoperazone/sulbactam after craniotomy[J]. *BMC Anesthesiol*, 2015, 15(1): 33.
- [6] ROBERTS J A, ULLDEMOLINS M, ROBERTS M S, et al. Therapeutic drug monitoring of β -lactams in critically ill patients: proof of concept[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36(4): 332-339.
- [7] ABDELALEEM E A, NAGUIB I A, ZAAZAA H E, et al. Development and validation of

- HPLC and HPTLC methods for determination of cefoperazone and its related impurities[J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 54(2):179-186.
- [8] 易林高,陈晓孩,何国鑫,等. 头孢哌酮舒巴坦在重症监护病房脓毒症患者体内的药代动力学研究[J]. *中国医药导报*, 2018, 15(10):34-37.
- [9] 余晓男. 高效液相色谱法测定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠及有关物质的研究[J]. *黑龙江科技信息*, 2015, 19(16):68.
- [10] HOANG V D, LOAN N T, THO V T, et al. UV spectrophotometric simultaneous determination of cefoperazone and sulbactam in pharmaceutical formulations by derivative, Fourier and wavelet transforms[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2014, 121:704-714.
- [11] 李明,郑志昌,杨继红,等. 液相色谱-串联质谱法同时测定人血浆及脑脊液中头孢哌酮与舒巴坦浓度[J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(14):1493-1496.
- [12] 梁键谋,王知坚,陈贵斌,等. 液相色谱-质谱测定注射用头孢哌酮钠舒巴坦钠有关物质[J]. *医药导报*, 2013, 32(3):378-380.
- [13] WU X J, HUANG X, SHI H Y, et al. Determination of cefoperazone and sulbactam in serum by HPLC-MS/MS; an adapted method for therapeutic drug monitoring in children[J]. *Biomed Chromatogr*, 2018, 32(4):e4143.
- [14] IRANIFAM M, IMANI-NABIYYI A, KHATAEE A, et al. Enhanced luminol-O₂ chemiluminescence reaction by CuO nanoparticles as oxidase mimics and its application for determination of ceftazidime[J]. *Anal Methods*, 2016, 8(18):3816-3823.
- [15] ZHANG S, ZHOU G, ZHANG X, et al. Establishment of highly sensitive analytical method for chondroitin sulfate by flow injection chemiluminescence[J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 206:504-510.
- [16] 刘翠颖,谢昌利,吴碧涛,等. 流动注射化学发光法测定奈替米星[J]. *中国抗生素杂志*, 2015, 40(11):845-848.
- [17] KHAN F, YAQOOB M, ASGHAR M, et al. Surfactant enhanced flow injection chemiluminescence method for vitamin D3 determination in pharmaceutical formulations [J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2019, 208:150-156.

(收稿日期:2020-05-22 修回日期:2020-11-01)

(上接第 669 页)

- [6] 王俊杰,陈清峰,韩孟杰. 大学生艾滋病相关行为潜在风险评估量表开发研究[J]. *中国艾滋病性病*, 2018, 24(10):1036-1039.
- [7] 严海鸥,桑燕,李立人,等. 中文版 EORTC QLQ-HCC18 生命质量评价工具在 PHC 患者中应用的信效度评价[J]. *重庆医学*, 2016, 45(21):3010-3012.
- [8] DWYER T, CHAHAL J, MURNAGHAN L, et al. Development of a certification examination for orthopedic sports medicine fellows[J]. *Can J Surg*, 2020, 63(2):E110-E117.
- [9] 陈绪丰. e-NIHSS 应用于中国后循环脑梗死患者的信度与效度研究[D]. 青岛:青岛大学, 2019.
- [10] 李恩泽. 失眠严重指数量表的效度和信度研究[D]. 广州:南方医科大学, 2018.
- [11] 关红丽,丘卫红,武惠香,等. 中文版脑卒中后失语症生活质量量表的信度和效度研究[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2017, 39(2):97-101.
- [12] POLIT D F, BECK C T. The content validity index: are you sure you know what's being reported? Critique and recommendations[J]. *Res Nurs Health*, 2006, 29(5):489-497.
- [13] 汪和美,楼妍,杨方英,等. 中文简短版慢性病资源调查量表在癌症患者中的应用评价[J]. *浙江预防医学*, 2013, 25(6):1-5.
- [14] 豆静,郭昕,姚燕,等. 改编 OSSIQ 测量不同主观皮肤类型人群生活质量的信度和效度分析[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43(2):435-440.
- [15] 夏聪,杨泉楠,许军,等. 大学生亚健康评定量表的测评及应用分析[J]. *重庆医学*, 2018, 47(8):1012-1015.
- [16] 余自娟,张艳,张倍倍,等. 护理信息能力自评量表的修订及信效度评价[J]. *重庆医学*, 2019, 48(2):266-269.

(收稿日期:2020-04-23 修回日期:2020-10-16)