

# 四环素类抗菌素碱性降解 荧光增敏作用研究\*

赵一兵

(厦门大学化学系, 国家教育委员会材料和生命过程分析科学开放研究实验室, 厦门 361005)

慈云祥 常文保

(北京大学化学系, 北京 100871)

**摘要** 四环素类抗菌素的碱性溶液(KOH)在沸水浴中加热一定时间而发生降解, 其降解物的荧光激发光谱和发射光谱均发生改变, 且荧光强度较四环素类抗菌素本身的天然荧光增强5~190倍, 认为发生了分子内亲核断环反应, 生成具有内酯结构的降解物, 此降解物内酯结构中氧原子上孤对电子与共轭 $\pi$ 电子相互作用, 使分子中共轭电子体系的离域性增大, 荧光增强。

**关键词** 四环素类抗菌素 碱性降解 荧光法

近年来, 荧光分析法在药物分析和生物活性分子分析方面取得了进展<sup>[1,2]</sup>, 在与其他仪器分析方法联用方面, 如高效毛细管电泳-荧光检测和高效液相色谱-荧光检测等<sup>[3~5]</sup>, 也取得了成果。目前, 就荧光法本身来讲, 以提高方法灵敏度和选择性为目的的研究较多, 相应的荧光光谱理论研究则较少。

分子的荧光, 是由于其吸光结构在吸收光线之后所产生的, 它的强度和该分子的吸光能力和量子产率有关。分子的荧光激发光谱形状与其吸收光谱相应部分的形状相对应, 而且后者与分子的结构密切相关。分子吸光后的激发态电子释放能量的方式有多种, 因此, 能产生吸收的物质不一定产生荧光, 而产生荧光的物质必然先产生吸收。分子荧光光谱的一种情况发生在具有 $\pi$ 电子共轭结构的体系中, 而且随着 $\pi$ 电子共轭体系的增长, 离域 $\pi$ 电子越容易激发, 荧光强度增大。常用的增加灵敏度的方法为引入其他物质的金属离子络合增敏和荧光标记增敏等<sup>[6~9]</sup>, 而对于物质自身发生衍生化反应的荧光增敏现象的研究不多, 而且主要集中在光化学荧光衍生化方面<sup>[10]</sup>。我们的研究表明, 通过有机药物自身的降解作用可以建立一些药物的灵敏度高、选择性好的荧光分析方法, 据此进行了相应反应的荧光增敏作用研究。

本文报道了四环素类抗菌素(TCs)碱性降解物的荧光增强与降解物结构的关系, 首次阐明了分子中内酯结构对荧光的增敏作用。通过对降解物结构和分子内共轭体系的研究, 确证

1996-04-12 收稿, 1996-09-29 收修改稿

\* 国家自然科学基金和福建省自然科学基金资助项目

了四环素(TC)、金霉素(CTC)和土霉素(OTC)的亲核断环机理,并提出了甲烯土霉素(MC)和强力霉素(DC)的碱性降解机理。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

日立 850-10s 荧光分光光度计,激发和发射单色器狭缝均为 5 nm, 1 cm 石英液池,各自空白为参比溶液。岛津 UV-300 型紫外-可见分光光度计;Orion 811 型 pH 计。

### 1.2 试剂

四环素类抗菌素:卫生部药品生物制品检定所,层析标准品。其他试剂均为分析纯试剂,水为去离子水。

### 1.3 降解方法

四环素类抗菌素的 KOH 溶液在沸水浴中加热形成其碱性降解物,所需碱浓度分别为:TC, 0.30 mol/L; CTC, 0.05 mol/L; OTC, 0.10 mol/L; DC, 0.05 mol/L 和 MC, 0.05 mol/L。完全降解所需时间分别为:TC, 20 min, CTC 5 min; OTC, 10 min; MC, 30 min; DC 30 min。降解产物在相应的仪器条件下测定荧光光谱。

## 2 结果与讨论

四环素类的化学结构上,都具有氢化并四苯环,而且都具有广谱抗菌能力,故统称为四环素类抗菌素(TCs)。常见的有 TC, CTC, OTC, MC 和 DC, 它们都有下面的基本结构(如图 1)。

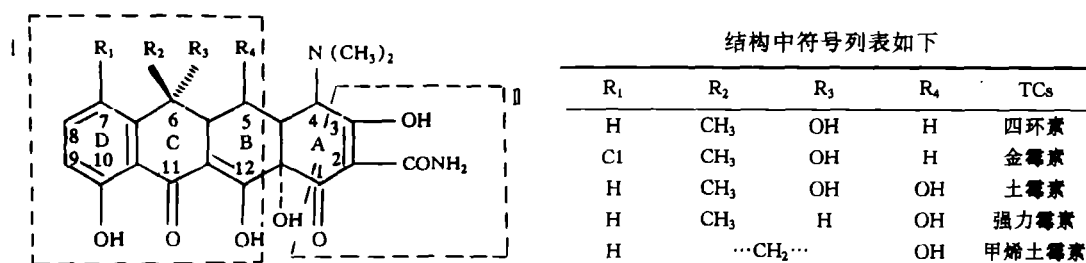


图 1 四环素类抗菌素结构

TCs 的紫外-可见吸收光谱在 275 nm 和 380 nm 左右显示两个强吸收峰,从分子结构上看,它们都有两个独立的共轭体系,这两个共轭体系都是含有酮基的不饱和体系,根据陈国珍介绍的经验规则<sup>[11]</sup>,可以大致计算出这两个共轭体系的最大吸收波长。

将共轭体系 I 看做不饱和烯酮体系,将苯环作延伸双键处理,同时考虑成环的  $\alpha$  取代,则最大吸收波长为:

$$\lambda_{\max} = 215\text{nm} + 2 \times 30\text{nm}(\text{延伸双键}) + 2 \times 5\text{nm}(\text{环外双键}) + 2 \times 10\text{nm}(\alpha \text{ 取代烷基}) + 2 \times 12\text{nm}(\beta \text{ 取代烷基}) + 2 \times 30\text{nm}(\beta \text{ 取代 OH}) - 8\text{nm}(\text{溶剂校正}) = 381\text{nm}$$

共轭体系 II 为  $\beta$  二酮体系,将其中的酰胺基作延伸双键处理,则:

$$\lambda_{\max} = 215\text{nm} + 30\text{nm}(\text{延伸双键}) + 12\text{nm}(\beta \text{ 取代烷基}) + 30\text{nm}(\beta \text{ 取代 OH}) - 8\text{nm}(\text{溶剂校正}) = 279\text{nm}$$

比较 TCs 吸收光谱中 275 和 380 nm 左右的两处强吸收, 可认为 275 nm 处的吸收为共轭体系 II 吸光所致, 而 380 nm 处的吸收为共轭体系 I 吸光所致.

表 1 列出了四环素类抗菌素天然荧光及其碱性降解物荧光的激发和发射波长的实验值,

表 1 TCs 及其降解物的荧光激发和发射波长

TCs	天然荧光/nm		降解物荧光/nm	
	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$	$\lambda_{ex}$	$\lambda_{em}$
TC	379.4	519.0	333.1	416.0
CTC	385.6	524.2	345.1	419.2
OTC	373.6	516.4	334.1	416.2
MC	382.9	527.6	380.3	496.9
DC	378.2	522.6	374.6	490.1

由于有机物荧光激发波长与其吸收波长相对应, 而四环素类抗菌素天然荧光的激发波长与按经验规则计算的共轭体系 I 的吸收波长值和实验值几乎一样, 与共轭体系 II 的吸收波长值相差很远, 因此可以认为四环素类抗菌素的天然荧光是由于共轭体系 I 吸光后发光所致, 而与共轭体系 II 无关. 金霉素分子苯环上 C1 原子的未成键电子的  $p-\pi$  共轭作用, 以及甲烯土霉素分子中增加的共轭键数目, 使它们的荧

光激发波长明显地比其他几个稍长一些.

TCs 在碱性条件下, 降解产生强荧光化合物, 其中 CTC 在室温放置即可降解, 而其他几种抗菌素需沸水浴加热才能降解. 根据 TCs 降解物荧光激发和发射波长(表 1)可以把这些抗菌素分为两类: TC, CTC 和 OTC 为一类, DC 和 MC 为一类, 前者的激发和发射波长均较后者要短一些, 可以预期这两类抗菌素的降解机理和降解产物结构是有差别的.

TC, CTC 和 OTC 这类抗菌素碱性降解的作用机理普遍认为是由于  $\text{OH}^-$  的作用,  $\text{C}_6$  上的羟基形成氧负离子, 向  $\text{C}_{11}$  发动分子内亲核进攻, 经电子转移, C 环断裂, 生成具有内酯结构的异构体(见图 2).

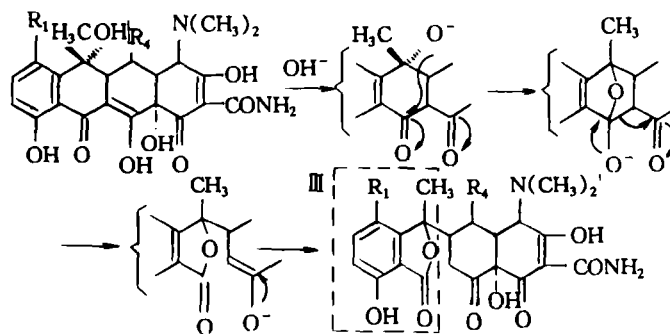


图 2 TC, CTC 和 OTC 碱性降解机理

如果 TC, CTC 和 OTC 的上述亲核断环机理成立, 那么, 反应产物与反应物相比, 只发生了分子内化学键的变化, 各原子组成仍然不变. 以 CTC 为例, 其分子式为  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{N}_2\text{Cl}$ , 降解后生成的含内酯产物的分子式仍为  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{N}_2\text{Cl}$ , 分子量 478.86, 计算各元素的百分组成为: C 55.18%, H 4.84%, N 5.85%, Cl 7.40%, O 26.73%.

对经过分离、提纯得到的 CTC 降解物的固体作元素分析的结果为: C 54.84%, H 4.90%, N 5.76%, Cl 7.43%. 质谱分析得到的降解物分子量为 476, 由此计算降解物分子中各元素原子数为: C 22, H 23, N 2, Cl 1, O 8, 分子式为  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_8\text{N}_2\text{Cl}$ , 与按前面机理降解所得产物的分子式相同.

CTC 碱性降解物的红外分析结果, 证明了含内酯结构降解物的形成. 比较 CTC 及其降解物的红外光谱, 其显著差异是降解物在  $1758\text{ cm}^{-1}$  处有一个很强的羰基吸收峰. 这是由于形成内酯后, 酯内氧的吸电子作用, 使羰基中碳原子上的电子云密度减小, 碳氧双键的力常数增加, 同时也由于成环后张力变大, 使羰基的红外吸收峰明显地向高波数方向移动, 而且强度

增大。

综合上述的分析结果,可以确认,CTC碱性降解物结构如机理中所示,即上述机理是正确的,对TC和OTC的研究得到同样的结论。

从降解物的结构上看,原有的共轭体系I由于C环断裂,双键数目减少,形成新的共轭体系III,因此可以预期其光吸收波长必然变小。同样,把共轭体系III看作 $\alpha, \beta$ 不饱和体系,将苯环作延伸双键处理,同时考虑成环的 $\alpha$ 取代,用经验规则对降解物共轭体系III的最大吸收波长进行计算,得:

$$\lambda_{\max} = 217\text{nm} + 2 \times 30\text{nm}(\text{延伸双键}) + 10\text{nm}(\alpha \text{ 取代烷基}) + 12\text{nm}(\beta \text{ 取代烷基}) + 30\text{nm}(\beta \text{ 取代 OH}) - 8\text{nm}(\text{溶剂校正}) = 321\text{nm}$$

此计算值与实验中TC, CTC和OTC的碱性降解物荧光的激发波长接近,同时考虑共轭体系II在降解前后不发生变化,可以认为这3种抗菌素的碱性降解物的荧光是由共轭体系III吸光后发出的,其荧光增强效应显然是由于内酯的形成。这种内酯结构的荧光增强现象尚属首例。一个不容忽视的因素是内酯环上氧的未成键电子对共轭体系III的影响,其作用机理需进一步研究。

由于CTC分子中 $C_7$ 上的氯原子的空间排斥作用,使 $C_6$ 上的羟基更易发生分子内的亲核反应。因此,CTC较TC和OTC容易发生降解反应。同时由于CTC分子在苯环上的取代基C1上的未成键电子的 $p-\pi$ 共轭作用,降解物的荧光激发波长明显比TC和OCT降解物荧光激发波长红移。TC和OTC虽然在 $C_5$ 上相差一个羟基,但此羟基对共轭体系III影响甚微,因此TC和OTC的降解物荧光激发波长差别很小。

MC和DC这类抗菌素由于在 $C_6$ 上没有羟基,因此C环不发生断裂,即其降解机理与TC等不同。但是,MC和DC可以通过分子内的互变异构作用在B环的 $C_{12}$ 上形成酮羰基,而 $C_5$ 上的羟基同样可以在 $\text{OH}^-$ 的作用下,形成氧负离子,并向 $C_{12}$ 发动分子内亲核进攻,经电子转移,B环断裂,亦生成具有内酯结构的异构体如图3。

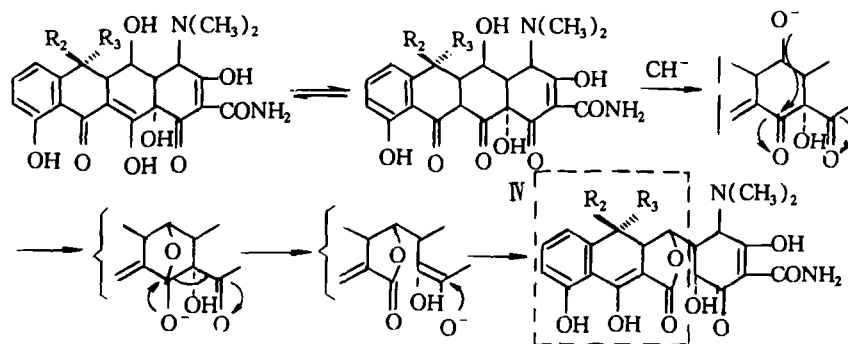


图3 MC和DC的碱性降解机理

产物中新形成的共轭体系IV与反应物的共轭体系I几乎一样,其最大吸收波长不会发生明显变化。根据经验规则估算的最大吸光波长仍为381nm,这与实验中MC和DC及其碱性降解物的荧光激发波长是一致的,这说明所推测的机理是可能的,而且降解物结构分析数据也说明生成了内酯结构化合物。相应的荧光增强效应显然也是由于内酯形成所造成的。

比较MC和DC在B环上的亲核断环机理与TC, CTC和OTC在C环上的断环机理,由

于前者包含有分子内的互变异构过程,因此 MC 和 DC 较 TC, CTC 和 OTC 难降解,反映为降解所需时间较长. 同时如图 4 所示,由于 MC 和 DC 降解物分子内的内酯结构不象 TC, CTC 和 OTC 的降解物内酯结构那样紧靠苯环的大  $\pi$  键体系,内酯环上氧原子的孤对电子不能更有效地作用于苯环大  $\pi$  键体系,因此增敏作用相对较弱.

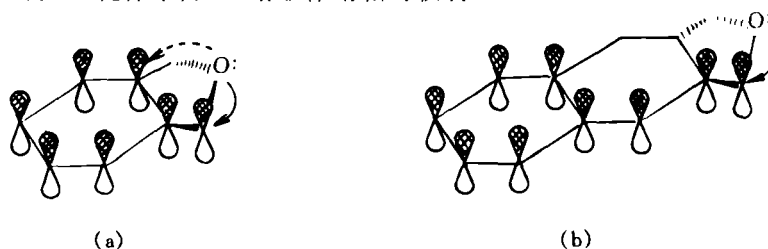


图 4 TC, CTC 和 OTC 降解物(a)和 MC, DC 降解物(b)共轭体系的电子云图

MC 和 DC 降解物结构上的差别在于它们在  $C_6$  上的取代基不同,前者为亚甲基  $CH_2$ ,以双键与  $C_6$  相连;后者为甲基  $CH_3$ ,以单键与  $C_6$  相连. 因此,前者的共轭体系双键数目较后者多一个,反映在荧光光谱上,前者的荧光激发和发射波长均较后者红移.

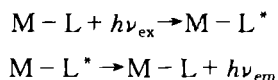
利用 TCs 的碱性降解特性可以建立这些抗菌素的高灵敏度测定方法,结果如表 2 所示.

表 2 TCs 的碱性降解测定

TCs	降解时间/min	线性范围/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	检测限/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	较天然荧光增强(倍)
TC	20	$8.0\times 10^{-9}\sim 1.0\times 10^{-5}$	$6.0\times 10^{-9}$	58
CTC	5	$4.0\times 10^{-9}\sim 5.0\times 10^{-6}$	$3.0\times 10^{-9}$	190
OTC	10	$7.0\times 10^{-9}\sim 5.0\times 10^{-6}$	$5.0\times 10^{-9}$	20
MC	30	$5.0\times 10^{-8}\sim 5.0\times 10^{-5}$	$5.0\times 10^{-8}$	15
DC	30	$8.0\times 10^{-8}\sim 5.0\times 10^{-5}$	$8.0\times 10^{-8}$	5

由于 TCs 的理化性质非常相似,而且其产品往往含有其他抗菌素杂质,因此其混合物的分别测定一直是这类抗菌素生产和临床检测希望完善解决的问题. 我们利用金霉素室温即降解而其它抗菌素室温不发生降解的特性,进行了 CTC 与其他抗菌素两组分混合物的分别测定;同样,利用 TC, CTC, OTC 与 MC, DC 降解机理和产物的差异,研究了这两类抗菌素的两组分混合物的分别测定;还进行了一些三组分混合物的分别测定,表 3 列出了尿液中的测定结果.

实验还发现<sup>[12]</sup>,四环素类抗菌素碱性降解物与一些金属离子,如  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  等,形成强荧光的螯合物,如  $Mg^{2+}$  螯合物荧光强度较相应降解物的荧光强度分别增强:TC:40%, CTC:5%, OTC:30%, MC:400%, DC:350%;较 TCs 的天然荧光分别增强:TC:81 倍, CTC:199 倍, OTC:26 倍, MC:60 倍, DC:17 倍;而且重要的是形成螯合物后荧光激发和发射的峰位置较降解物本身的峰位置不发生改变,这显然是金属离子微扰的配位体发光,其发光方式表示为:



这一结果显示,TCs降解物与金属离子形成螯合物的荧光由降解物配体的共轭体系Ⅲ(TC, CTC和OTC降解物)和Ⅳ(DC和MC降解物)吸光后发射,据此认为金属离子同相应共轭体系Ⅲ和Ⅳ上相关的配位原子螯合,而不是与共轭体系Ⅱ上的配位原子螯合.由此,可对荧光螯合物的螯合方式进行合理的表示(图5和图6, M为金属离子).

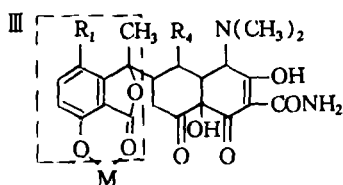


图5 TC, CTC, OTC降解物与金属离子的螯合方式

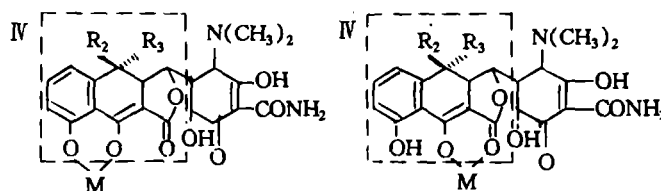


图6 MC, DC降解物与金属离子的螯合方式

类似地,可正确表示TCs与 $\text{Eu}^{3+}$ 反应生成的强荧光螯合物的螯合方式.

### 参 考 文 献

- Schoneich C, Huhmer A F R, Rabel S R, et al. Separation and analysis of peptides and proteins. *Analytical Chemistry*, 1995, 67(12): R155~R181
- Hoffman A S. Intelligent polymers in medicine and biotechnology. *Macromolecular Symposia*, 1995, 98: 645~664
- Scoper S A, McGown L B, Warner I M. Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, 1994, 66(12): R428~444
- Vandenesse R J, Velthorst N H, Brinkman U A T, et al. Laser-induced fluorescence detection of native-fluorescent analytes in column liquid chromatography, a critical evaluation. *Journal of Chromatography A*, 1995, 704(1): 1~25
- Yeung E S. Chemical analysis of single human erythrocytes. *Accounts of Chemical Research*, 1994, 27(12): 409~414
- Lis S. Analytical applications of lanthanide luminescence in solution. *Chemia Analytyczna*, 1993, 38(4): 443~454
- Xu Y Y, Hemmila I A, Lovgren T N E. Co-fluorescence effect in time-resolved fluoroimmunoassays—A review. *Analyst*, 1992, 117(7): 1 060~1 069
- Perezhovard G M, Weil P A, Beechem J M. Yeast TATA binding protein interaction with DNA; fluorescence determination of oligomeric state, equilibrium binding, on-rate, and dissociation kinetics. *Biochemistry*, 1995, 34(25): 8 005~8 017
- Losso J N, Kummer A, Lichan E, et al. Development of a particle concentration of IgG in bovine milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(4): 682~686
- 郭祥群, 许金钧, 陈国珍. 光化学荧光分析法. *分析化学*, 1991, 19: 244~252
- 陈国珍, 黄贤智, 刘文远, 等. 紫外-可见分光光度法. 北京: 原子能出版社, 1983
- 赵一兵, 常文保, 慈云祥. 四环素类抗菌素碱性降解物与碱土金属螯合物的荧光研究. *高等学校化学学报*, 1992, 13: 1 378~1 379

表3 尿液中TCs混合物的回收测定

TCs	加入量/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	测得量/ $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率/%
CTC	$1.00\times 10^{-7}$	$1.03\times 10^{-7}$	103
+ TC	$4.00\times 10^{-7}$	$3.88\times 10^{-7}$	97
CTC	$1.00\times 10^{-7}$	$1.03\times 10^{-7}$	103
+ OTC	$4.00\times 10^{-7}$	$3.81\times 10^{-7}$	95
DC	$5.00\times 10^{-6}$	$4.91\times 10^{-6}$	98
+ TC	$1.00\times 10^{-6}$	$1.04\times 10^{-6}$	104
DC	$5.00\times 10^{-6}$	$4.81\times 10^{-6}$	96
+ CTC	$3.00\times 10^{-7}$	$3.10\times 10^{-7}$	103
MC	$5.00\times 10^{-6}$	$4.84\times 10^{-6}$	97
+ TC	$1.00\times 10^{-6}$	$0.95\times 10^{-6}$	95
MC	$5.00\times 10^{-6}$	$4.85\times 10^{-6}$	97
+ CTC	$3.00\times 10^{-7}$	$2.90\times 10^{-7}$	97
MC	$5.00\times 10^{-6}$	$4.89\times 10^{-6}$	98
+ OTC	$1.00\times 10^{-6}$	$1.00\times 10^{-6}$	100
TC	$1.00\times 10^{-6}$	$1.00\times 10^{-6}$	102
+ CTC	$3.00\times 10^{-7}$	$3.20\times 10^{-7}$	106
+ DC	$5.00\times 10^{-6}$	$4.84\times 10^{-6}$	97
TC	$5.00\times 10^{-7}$	$4.90\times 10^{-7}$	98
+ CTC	$1.00\times 10^{-7}$	$1.03\times 10^{-7}$	103
+ DC	$2.00\times 10^{-6}$	$1.97\times 10^{-6}$	99