

环丙沙星的光谱性质、质子化作用与荧光量子产率

刘翠格^{1,2}, 徐怡庄^{1*}, 魏永巨², 赵晶², 齐剑¹, 王新红², 许振华¹, 吴瑾光¹

1. 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871
2. 河北师范大学化学学院, 河北 石家庄 050016

摘要 研究了环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)在不同 pH 条件下的荧光光谱、紫外吸收光谱和质子化作用, 测量了 CIP 在中性条件下的荧光量子产率。在 H⁺ 浓度大于 1 mol·L⁻¹ 的 HCl 介质中, CIP 分子(简称为 HL)可以结合 3 个质子而以 H₄L³⁺ 形式存在, 有微弱的荧光, 最大荧光发射波长(λ_{max})为 456 nm。在 pH 0~2 的酸性条件下, CIP 主要以 H₃L²⁺ 形式存在, λ_{max} 为 450 nm, 荧光较弱, 荧光强度随 pH 的升高而上升。在 pH 2~4 时, CIP 主要以 H₂L⁺ 形式存在, 具有强荧光, λ_{max} 仍为 450 nm。当 pH>4 时, λ_{max} 逐步蓝移到 414 nm, 荧光强度随 pH 的升高而稍有降低, 同时紫外吸收光谱也有明显变化, 表明 H₂L⁺ 随 pH 升高而失去质子, 以双极离子 HL 形式存在。当 pH>8 时, 荧光强度随 pH 升高而减弱至消失, 表明 HL 逐步失去质子, 转化为无荧光的阴离子 L⁻。在分子形态变化过程中, 最大荧光激发波长始终在 275 nm 附近, 但最大荧光发射波长有较大变化。在 pH 7.0 的缓冲溶液中, 以硫酸奎宁为参比, 测得 CIP 在最大荧光激发波长 275 nm 处的荧光量子产率为 0.12。

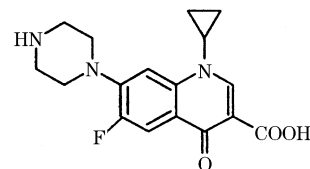
主题词 环丙沙星; 荧光光谱; 紫外吸收光谱; 质子化作用; 荧光量子产率

中图分类号: O657.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2005)09-1446-05

引言

环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)是广泛应用的第三代喹诺酮类广谱抗菌药, 其作用机制是抑制细菌 DNA 拓扑异构酶, 干扰细菌细胞 DNA 的复制而杀菌。分子的共轭体系和刚性结构赋予其优异的荧光性能。近年来, 人们利用 CIP 分子的荧光特性进行体液和药物检测^[1-4], 研究药物分子与生物大分子(DNA、蛋白质等)之间的相互作用^[5,6]。另一方面, 利用喹诺酮类分子在 C-4 有一羰基氧, C-3 有一羧基(见 Scheme 1)的结构特征, 研究与金属离子的配位作用和光谱性质^[7,8]。我们曾制备出 CIP 与铜、铈等离子所形成的络合物, 并利用 CIP 稀土络合物作为染色剂, 在荧光显微镜下研究生物组织切片的微细结构, 取得了有意义的结果^[9]。喹诺酮类分子在不同的酸碱环境中的光谱行为与其质子化作用和共轭程度有关, 这方面的研究虽有报道^[10-12], 但工作不细。本文用精密的光谱仪器详细地研究了在不同酸碱环境下 CIP 的荧光光谱和紫外吸收光谱, 首次报道了 CIP 的荧光量子产率, 根据光谱变化判断 CIP 在不同酸碱环境下有五种型体, 其光谱性质各有不同。了解这些型体的光谱性质对于喹诺酮类抗生素

的基础研究和应用研究都有重要意义。



Scheme 1 Molecular structure of Ciprofloxacin

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

F-4500 荧光分光光度计(Hitachi); UV-2501PC 分光光度计(Shimadzu); 828 型 pH/ISE 测试仪(Orion)。

盐酸环丙沙星(CIP): 1.0×10^{-3} mol·L⁻¹ 水溶液, 使用时稀释 10 倍; 三酸(磷酸、醋酸和硼酸)混合溶液: 浓度均为 0.04 mol·L⁻¹; NaOH(分析纯)溶液: 0.2 mol·L⁻¹; HCl(分析纯)溶液; 实验用水为二次蒸馏水。

1.2 实验方法

在一系列 25 mL 容量瓶中分别加入 10 mL 三酸混合溶

收稿日期: 2004-06-18, 修订日期: 2004-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(50103001, 20171004, 30371604 和 39730160)和国家重点基础研究发展规划项目(2002CCA01900)资助

作者简介: 刘翠格, 女, 1954 年生, 北京大学访问学者, 河北师范大学化学学院副教授 * 通讯联系人

液,不同体积的 $0.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH 溶液,配制不同 pH 值的缓冲溶液,然后分别加入 $2.5 \text{ mL } 1.0\times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CIP 溶液,以水稀释至刻度,摇匀,扫描紫外吸收光谱、荧光光谱,再测量 pH 值。

强酸性条件下的实验,用 HCl 控制溶液酸度,根据 HCl 用量计算 pH 值。

2 结果与讨论

2.1 CIP 在近中性和弱酸性条件下的荧光光谱及紫外吸收光谱

图 1 为 CIP 在近中性、弱酸性条件下(三酸缓冲介质)的荧光光谱。图中发射光谱随 pH 的改变有明显变化。当 pH 6.62 时,最大发射波长在 421 nm; pH 降至 4.12 时,最大发射波长红移至 450 nm,在 430 nm 处形成一等荧光点。这种光谱特征表明 CIP 的存在形式随 pH 的改变发生了变化,两种形式有不同的荧光特性。图 1 中激发光谱也有变化,最大激发波长略有红移。

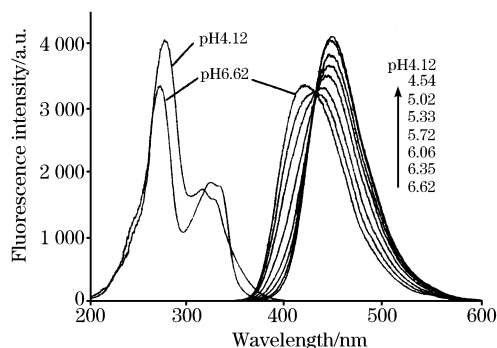


Fig. 1 Fluorescence spectra of CIP in buffer solutions

$c_{\text{CIP}}: 1.0\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, bandpasses of slits: 5 nm/5 nm,

$\lambda_{\text{ex}}: 277 \text{ nm}$

图 2 是 CIP 在近中性、弱酸性条件下的紫外吸收光谱。在 pH 6.62 时,最大吸收峰位于 271.6 nm; 当 pH 降至 4.12 时,最大吸收峰红移至 277.2 nm,在 270, 316 和 344 nm 等处形成等色点。这一光谱变化与图 1 中 CIP 激发光谱的变化是一致的,也表明 CIP 的存在形式随 pH 值的改变而发生了变化。

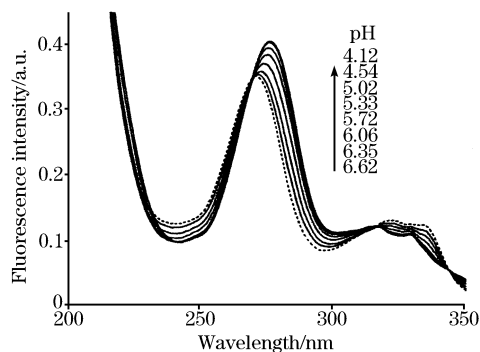
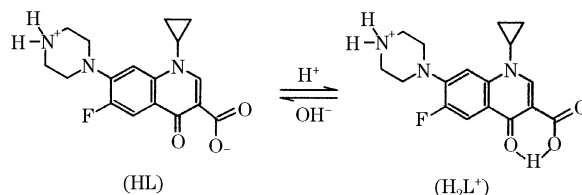


Fig. 2 Absorption spectra of CIP in buffer solutions

$c_{\text{CIP}}: 1.0\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 1 cm cell

光谱的红移或者蓝移与分子的共轭程度有关。从最大吸收波长和最大荧光发射波长随 pH 降低而红移的现象推断,在 pH 值较低时所形成的质子化程度较高的型体应当具有较高的共轭程度。因此, CIP 在这一 pH 区间的质子离解平衡可能如下所示:



在 pH 值由 6.62 改变到 4.12 时, CIP 双极离子 HL 的羧基氧结合质子,并与 4 位羰基氧以氢键相连,形成环状结构,进而与喹啉环产生共轭作用,使整个分子的共轭程度增大, $n-\pi$ 跃迁能级差减小,最大吸收波长和荧光发射波长红移。

2.2 CIP 在酸性条件下的荧光光谱及紫外吸收光谱

在酸性条件下(HCl 介质), CIP 的荧光激发与发射光谱如图 3 所示。随 pH 降低,发射光谱中 450 nm 处的发射峰逐步降低且略有红移,与此同时,激发光谱中的 278 nm 激发峰也逐步降低,表明在酸性条件下 CIP 可能进一步结合一个质子,即 H_2L^+ 转化为 H_3L^{2+} 。根据荧光性质与分子结构的一般规律可以推断 H_3L^{2+} 的平面性和刚性应当低于 H_2L^+ 。关于这个质子的结合部位,可能是在喹啉环的 1 位氮上,或者在羰基氧上。根据图 3 条件下荧光强度明显降低的事实,推测在 pH 2.0~0.2 区间内, CIP 结合的质子可能是在 1 位氮上,因为这种结合会破坏 1 位氮孤对电子参与共轭大 π 键的形成,从而明显影响 CIP 的荧光性质。

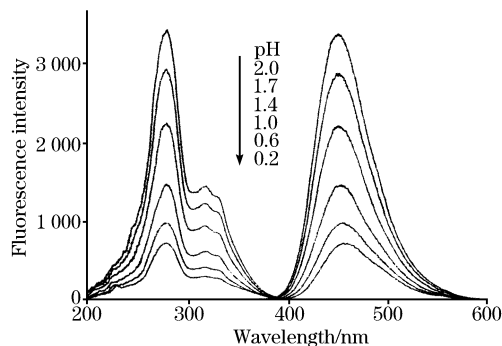


Fig. 3 Fluorescence spectra of CIP in acidic solutions

$c_{\text{CIP}}: 1.0\times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$; HCl medium; bandpasses of slits: 5 nm/5

nm; $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}: 280 \text{ nm}/450 \text{ nm}$

在图 3 条件下,紫外吸收光谱随 pH 的改变不明显,如图 4 所示。这说明在 pH 2.0~0.2 区间, CIP 的质子化对分子的吸光能级跃迁(基态 \rightarrow 激发态)影响不大,而对发光跃迁(激发态 \rightarrow 基态)有较大影响。这种影响主要体现在增大了非辐射跃迁的几率,导致荧光量子产率降低,荧光强度下降。

2.3 CIP 在强酸性条件下的荧光光谱及紫外吸收光谱

在强酸性条件下(HCl 介质中), CIP 的荧光光谱如图 5 所示。图中最大荧光发射波长为 456 nm,最大荧光激发波长为 278 nm。当 HCl 浓度由 $0.6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增大时,荧光强度先

下降而后上升, 365 nm 附近出现一个新的激发峰, 表明 CIP 的存在形式又发生了变化, 可能再结合一个质子, 由 H_3L^{2+} 变为 H_4L^{3+} 。这一质子的结合部位可能是在羰基氧上, 即羰基氧结合质子形成 $C=OH^+$ 。

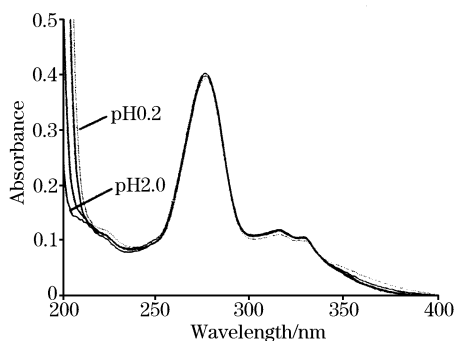


Fig. 4 Absorption spectra of CIP in acidic solutions

$c_{CIP}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; HCl medium; 1 cm cell

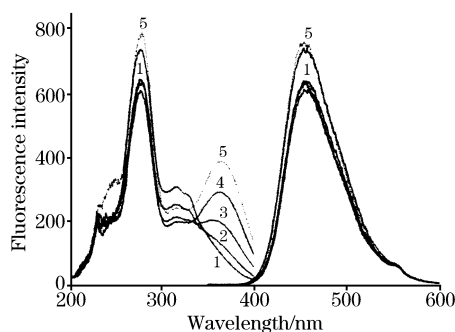


Fig. 5 Fluorescence spectra of CIP in strong acidic solutions

$c_{CIP}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; bandpasses of slits:

5 nm/5 nm; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}: 278 \text{ nm}/450 \text{ nm}$;

$c_{HCl} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1: 0.6; 2: 1.2; 3: 2.4; 4: 4.8; 5: 7.2

图 6 是 CIP 在浓 HCl 介质中的紫外吸收光谱。随 HCl 浓度增大, 280 和 315 nm 处吸光度有所降低, 同时 230 和 365 nm 处吸光度升高, 在 254 和 336 nm 形成等色点。这一光谱特征与荧光激发光谱的变化情况相对应, 进一步证明在浓 HCl 介质中 CIP 由 H_3L^{2+} 变为 H_4L^{3+} 。

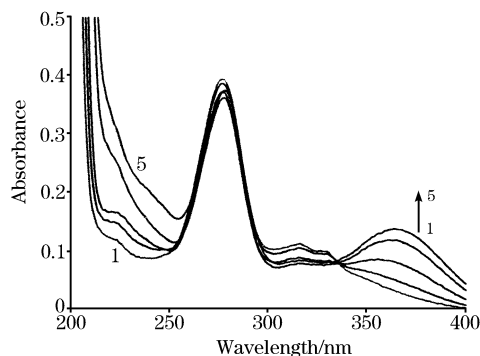


Fig. 6 Absorption spectra of CIP in strong acidic solutions

$c_{CIP}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; HCl medium; 1 cm cell;

$c_{HCl} (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$: 1: 0.6; 2: 1.2; 3: 2.4; 4: 4.8; 5: 7.2

2.4 碱性条件下的荧光光谱和吸收光谱

图 7 是 CIP 在碱性条件下的荧光光谱。图中最大激发波长为 270 nm, 最大发射波长为 414 nm。随 pH 升高, 荧光强度明显降低至荧光基本消失, 但光谱形状基本不变。这种光谱特征表明 CIP 双极离子 HL 逐渐失去质子, 转化为无荧光的负离子 L^- 。

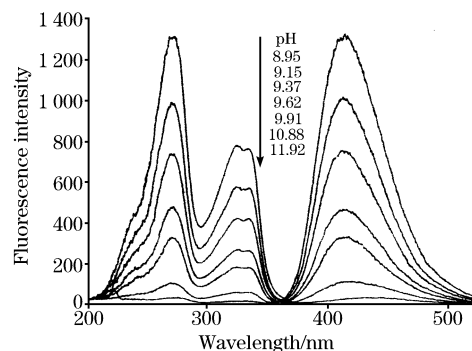


Fig. 7 Fluorescence spectra of ofloxacin in alkali conditions

$c_{CIP}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; $\lambda_{ex}/\lambda_{em}: 270 \text{ nm}/414 \text{ nm}$,

bandpasses of slits: 5 nm/5 nm

图 8 是 CIP 在碱性条件下的紫外吸收光谱。在 pH 8.9~11.9 范围内, CIP 的吸收光谱基本不变。联系图 7 中在相同条件下荧光光谱的变化, 可以看出, CIP 双极离子 HL 转化为负离子 L^- 时荧光逐渐消失, 但吸收光谱却基本上不改变。

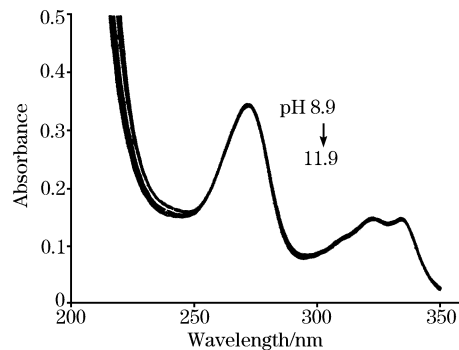


Fig. 8 Absorption spectra of CIP in alkali conditions

$c_{CIP}: 1.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 1 cm cell

2.5 在不同酸碱条件下 CIP 荧光强度和最大荧光激发、发射波长的比较

图 9 为 CIP 荧光强度与 pH 的关系曲线。由图可见, 在 pH 2~4 之间的阳离子型体 H_2L^+ 是荧光量子产率最高的型体, 其次是 pH 7 左右的双极离子 HL, 酸性条件下的 H_3L^{2+} 和强酸性条件下的 H_4L^{3+} 均是弱荧光型体, 碱性条件下的 L^- 无荧光。

图 10 为 CIP 的最大荧光激发和发射波长与 pH 的关系曲线。由图可见, 在中性和弱碱性时, CIP 的最大荧光发射波长约为 414 nm, 随着溶液酸性增强红移至约 450 nm。与此对照, 最大激发波长随 pH 的改变幅度很小, 基本上稳定在 275 nm。由于荧光发射波长取决于第一激发态与基态的能级差, 而荧光激发波长与分子的吸光性质有关, 因此, pH 改变

对 CIP 分子的不同跃迁能级的影响程度有较大的差异。

2.6 CIP 的荧光量子产率的测量

荧光量子产率(Y)定义为荧光物质吸光后发射的光子数与所吸收的激发光的光子数之比。通过测量待测物质和参比物质的稀溶液在同一激发波长下的积分荧光强度和对该波长激发光的吸光度,然后按下式计算待测物质的荧光量子产率^[13]:

$$Y_u = Y_s \cdot \frac{F_u}{F_s} \cdot \frac{A_s}{A_u} \quad (1)$$

式中, Y_u 和 Y_s 分别表示待测物质和参比物质的荧光量子产率, F_u 和 F_s 分别表示待测物质和参比物质的积分荧光强度, A_u 和 A_s 分别表示待测物质和参比物质对该波长激发光的吸光度。

本文用硫酸奎宁在激发波长 313 nm 的荧光量子产率 0.55 为标准^[14,15], 测量 CIP 的荧光量子产率。配制适当浓度的 CIP 水溶液(用三酸缓冲溶液控制 pH 7.0)和硫酸奎宁溶液,使两者的吸光度相近且不大于 0.05, 扫描吸收光谱并读取一定波长的 A_u 和 A_s 值。再扫描 CIP 水溶液和硫酸奎宁溶液在不同激发波长下的荧光光谱,计算给定波长范围内的积分荧光强度,最后按式(1)计算荧光量子产率,结果见表 1。

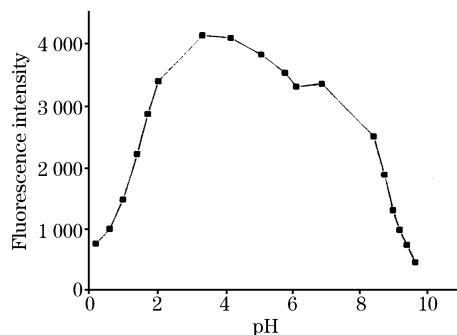


Fig.9 Relationship between fluorescence intensity and pH

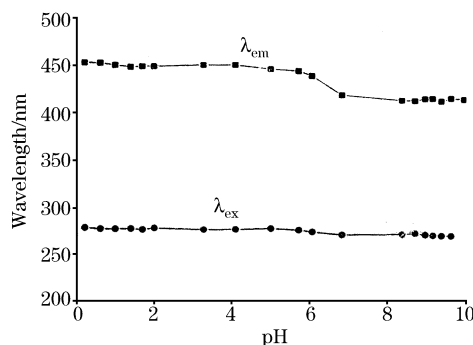


Fig.10 Plots of $\lambda_{ex} \sim \text{pH}$ and $\lambda_{em} \sim \text{pH}$

Table 1 Fluorescence quantum yield of quinine bisulfate and CIP

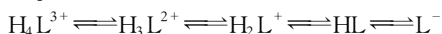
quinine					CIP			
λ_{ex}/nm	F^*	A	Y	Y/Y_{313}	λ_{ex}/nm	F^{**}	A	Y
270	44 106	0.009 9	0.49	0.89	250	21 173	0.018 9	0.12
275	45 958	0.010 7	0.47	0.86	260	31 506	0.029 5	0.12
280	56 634	0.013 1	0.48	0.86	270	45 800	0.041 9	0.12
290	94 145	0.019 6	0.58	0.96	272	45 506	0.041 8	0.12
300	151 312	0.030 3	0.55	1.00	275	43 131	0.038 8	0.12
313	218 641	0.043 7	0.55	1	280	32 190	0.027 9	0.13
320	222 782	0.044 3	0.55	1.01	290	12 484	0.011 5	0.12
330	225 356	0.044 0	0.56	1.02	300	11 581	0.010 2	0.13
340	264 300	0.052 4	0.55	1.01	310	15 222	0.013 0	0.13
345	274 985	0.054 4	0.56	1.01	315	17 026	0.013 7	0.14
350	275 140	0.054 1	0.56	1.02	320	18 968	0.015 5	0.14
360	272 157	0.043 1	0.69	1.26	330	18 856	0.014 5	0.14

* 积分范围: 375~590 nm; ** 积分范围: 360~568 nm。

由表 1 可见,在激发波长 290~350 nm 范围内,硫酸奎宁的荧光量子产率基本一致。CIP 在激发波长 250~310 nm 范围内,荧光量子产率大致相同。在最大激发波长 275 nm, CIP 的荧光量子产率为 0.12,表明 CIP 是一种较强的荧光化合物。

3 结论

盐酸环丙沙星的结构形态和荧光性质与溶液 pH 密切相关。当溶液 pH 改变时,环丙沙星存在质子离解平衡



在 H^+ 浓度大于 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 HCl 介质中, CIP 以 H_4L^{3+} 形式

存在,荧光很弱;在 pH 0~2 的酸性条件下, CIP 主要以 H_3L^{2+} 形式存在,荧光强度随 pH 的升高而增强;在 pH 2~4 时, CIP 主要以 H_2L^+ 形式存在,此时荧光最强;当 pH > 4 时,随 pH 升高, H_2L^+ 逐步失去羧基质子而以双极离子 HL 形式存在,荧光强度随 pH 的升高而降低;当 pH 进一步升高时, HL 失去咪唑环 N 上结合的质子,转化为无荧光的阴离子 L^- 。在分子形态变化过程中,最大荧光激发波长始终在 275 nm 附近,但最大荧光发射波长有较大的变化,4 种荧光型体的最大荧光发射波长分别为 456 nm(H_4L^{3+}), 450 nm(H_3L^{2+}), 450 nm(H_2L^+)和 414 nm(HL)。在 pH 7.0 的三酸缓冲溶液中, CIP 的荧光量子产率为 0.12。

参 考 文 献

- [1] Du Liming, Xu Qingqin, Yuan Jianmei. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003, 33(4): 693.
- [2] WANG Shao-ning, DENG Yi-hui, CHEN Yong, et al(王绍宁, 邓意辉, 陈咏, 等). Chin. J. Pharm. Anal. (药物分析杂志), 2003, 23(3): 192.
- [3] WU Shu-qing, CAO Qiu-e, ZHAO Yun-kun, et al(吴淑清, 曹秋娥, 赵云昆, 等). Chinese Journal of Analytical Chemistry (分析化学), 2000, 28(12): 1462.
- [4] ZHOU Cai-ju, LU Ning, GUO Yong-en(周采菊, 卢宁, 郭永恩). Chin. J. Pharm. Anal. (药物分析杂志), 1998, 18(3): 200.
- [5] Claudia Sissi, Magda Andreoli, Violetta Cecchetti, et al. Bioorganic and Medicinal Chemistry, 1998, 6(9): 1555.
- [6] ZHANG Xiao-wei, ZHAO Feng-lin, LI Ke-an(张晓威, 赵凤林, 李克安). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 1999, 20(7): 1063.
- [7] Michael E El-Kommos, Gamal A Saleh, Samia M El-Gizawi, et al. Talanta, 2003, 60(5): 1033.
- [8] Wu Shuqing, Zhang Wujuan, Chen Xingguo, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2001, 57(6): 1317.
- [9] YANG Jun, REN Yu, XU Yi-zhuang, et al(杨军, 任宇, 徐怡庄, 等). Chemical J. of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2004, 25(2): 243.
- [10] DU Li-ming, JIN Wei-jun, DONG Chuan, et al(杜黎明, 晋卫军, 董川, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2001, 21(4): 518.
- [11] Yang R, Fu Y, Li L D, et al. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2003, 59(12): 2723.
- [12] Hyoung-Ryun Park, Tae Heung Kim, Ki-Min Bark. Eur. J. Med. Chem., 2002, 37: 443.
- [13] CHEN Guo-zhen, HUANG Xian-zhi, ZHENG Zhu-zi, et al(陈国珍, 黄贤智, 郑朱梓, 等). Fluorometric Analysis, 2nd Ed. (荧光分析法·第2版). Beijing: Science Press(北京: 科学出版社), 1990. 17.
- [14] Parker C A, Rees W T. Analyst, 1960, 85: 587.
- [15] WEI Yong-ju, KANG Zhi-min, QI Xiu-ju, et al(魏永巨, 康志敏, 戚秀菊, 等). Acta Chimica Sinica(化学学报), 2001, 59(10): 1619.

Spectral Properties, Protonation and Fluorescence Quantum Yield of Ciprofloxacin

LIU Cui-ge^{1,2}, XU Yi-zhuang^{1*}, WEI Yong-ju², ZHAO Jing², QI Jian¹, WANG Xin-hong², XU Zhen-hua¹, WU Jin-guang¹

1. College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China

2. College of Chemistry, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

Abstract Fluorescence spectra, ultraviolet absorption spectra, and protonation of Ciprofloxacin (CIP) at different pH values have been studied. Fluorescence quantum yield of CIP under neutral condition has been measured. In HCl medium with $[H^+] > 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, CIP molecules (simplified as HL) may accept three protons to exist as H_4L^{3+} with very weak fluorescence, and its maximum fluorescence emission wavelength (λ_{max}) is 456 nm. In acidic solution of pH 0 to pH 2, CIP mainly exists as H_3L^{2+} form with λ_{max} at 450 nm, and fluorescence intensity is relatively weak and increases with increasing of pH. In the range of pH 2 to pH 4, CIP mainly exists as H_2L^+ form with a strong fluorescence, and λ_{max} is still at 450 nm. When $\text{pH} > 4$, λ_{max} gradually blue-shifts to 414 nm, fluorescence intensity slightly decreases as pH increases, and at the same time an evident change in ultraviolet absorption spectrum is observed, indicating that H_2L^+ has lost proton to exist as dipole ion form HL. When $\text{pH} > 8$, the fluorescence intensity decreases until disappearance as pH increases, indicating that HL has lost proton to exist as non-fluorescence anion ion form L^- . In the molecular form changing process, the maximum excitation wavelength of CIP is essentially constant at 275 nm, but the maximum emission wavelength changes obviously. In a buffer solution with pH 7.0, and using quinine bisulphate as a reference, the fluorescence quantum yield of CIP at maximum excitation wavelength 275 nm was measured to be 0.12.

Keywords Ciprofloxacin; Fluorescence spectrum; Ultraviolet absorption spectrum; Protonation; Fluorescence quantum yield

* Corresponding author

(Received Jun. 18, 2004; accepted Aug. 18, 2004)