

巴罗沙星化学结构分析*

马超¹, 李钢^{1**}, 葛青², 陈小青¹, 朱侃¹

(1 南京师范大学分析测试中心, 南京 210097; 2 江苏永达药业有限公司, 江阴 214445)

摘要 目的: 建立药物巴罗沙星的化学结构确证方法。方法: 通过使用元素分析(EA)、热分析(TA)、X射线粉末衍射(XRD)、紫外吸收光谱(UV)、红外吸收光谱(IR)、核磁共振(NMR)以及质谱(MS)等分析手段对巴罗沙星进行了结构测定。结果: 证实巴罗沙星的结构为 1-环丙基-6-氟-1,4-二氢-8-甲氧基-7-(3-甲氨基-1-哌啶基)-3-喹啉羧酸二水合物。结论: 方法测定结果准确全面, 可为巴罗沙星的生产 and 鉴定提供较为全面的参考数据。

关键词: 巴罗沙星; 结构分析; 抗生素

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0163-06

Chemical structure analysis of balofloxacin*

MA Chao¹, LI Gang^{1**}, GE Qing², CHEN Xiao-qing¹, ZHU Kan¹

(1 Testing & Analysis Center, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

2 Jiangsu Yongda Pharmaceutical Co. Ltd., Jiangyin 214445, China)

Abstract Objective To establish a method for the determination of the chemical structure of balofloxacin. **Methods** Elemental analysis(EA), thermal analysis(TA), X-ray powder diffraction(XRD), ultraviolet absorption spectrum(UV), infrared Fourier transform spectroscopy(FT-IR), nuclear magnetic resonance(NMR), and mass spectrometry(MS) were adopted to analyze the chemical structure of balofloxacin. **Result** The chemical structure of balofloxacin is 1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methylaminopiperidin-1-yl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid dihydrate. **Conclusion** The result of the method is accurate, general and can provide a comprehensive reference for production and identification of balofloxacin.

Key words balofloxacin; chemical structure analysis; antibiotic drug

巴罗沙星(balofloxacin)是由日本中外制药(株)与韩国的 Choongvae 公司联合研究开发的新一代广谱氟喹诺酮类抗生素^[1]。具有口服吸收迅速、组织分布广泛、半衰期适中和耐受性好等优点。巴罗沙星对革兰氏阳性和阴性菌具有广谱抗菌活性,尤其对金色葡萄球菌、肺炎球菌、肠球菌等革兰氏阳性菌的活性优于诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星。对细菌具有选择性抑制作用,体外抗菌活性是环丙沙星、氧氟沙星和洛美沙星的 4~16 倍^[2]。巴罗沙星几乎无潜在的光敏反应,对中枢神经系统的不良作用小^[3]。

利用现代分析仪器对药物进行测定是确定其结构的重要手段,相关文献^[4-7]已有很多报道。使用

元素分析(EA)、热分析(TA)、X射线粉末衍射(XRD)、紫外吸收光谱(UV)、红外吸收光谱(IR)、核磁共振(NMR)、以及质谱(MS)等现代分析仪器对巴罗沙星的结构进行了测定,得出了巴罗沙星的各项测试的谱图及结构特征参数,为巴罗沙星的生产 and 鉴定提供了较为全面的科学参考数据。

巴罗沙星的分子结构为 1-环丙基-6-氟-1,4-二氢-8-甲氧基-4-氧代-7-(3-甲氨基-1-哌啶基)-3-喹啉羧酸二水合物(1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-7-(3-methylaminopiperidin-1-yl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid dihydrate), 分子式为 $C_{20}H_{24}FN_3O_4 \cdot 2H_2O$, 相对分子质量: 425.46。结构式如图 1。

* 江苏省自然科学基金(N0.BK2001111); 江苏省生物医药材料测试服务平台(BM2007132)

** 通讯作者 Tel: (025) 83598259; E-mail: ligang1@njnu.edu.cn

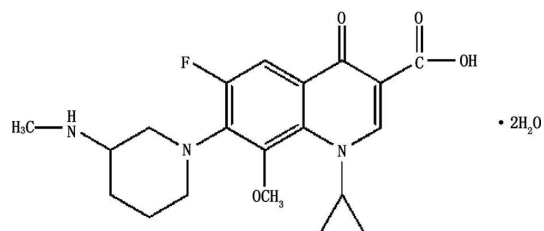


图 1 巴罗沙星的结构

Fig 1 Structure of ciprofloxacin

1 仪器与试剂

德国 Elementar Vario MICRO 元素分析仪; 美国 Perkin Elmer Analysis Diamond DSC 差热扫描分析仪; 美国 Perkin Elmer Analysis Pyris 1 TGA 热重分析仪; 日本理学公司 D/max 2500VL/PC 型转靶 X 射线衍射仪; VARIAN Cary 5000 型紫外光谱仪; 美国尼高力公司的 NEXUS-670 型红外光谱仪; Bruker AVANCE-400 核磁共振仪; Varian 2200 MS 质谱仪。

巴罗沙星精制样品由江苏永达药业有限公司提供。采用高效液相色谱法测定样品纯度为 99.54%。

2 方法

2.1 元素分析 对样品进行碳、氢、氮、氟的元素分析。结果符合巴罗沙星的结构组成: $C_{20}H_{24}FN_3O_4 \cdot 2H_2O$, 实验值与理论计算值相一致, 误差在允许范围之内。数据见表 1。

表 1 元素分析数据

Tab 1 Data of element analysis

巴罗沙星 (ciprofloxacin)	C %	H %	N %	F %
测试值 1 (measure value 1)	56.43	6.51	9.98	4.51
测试值 2 (measure value 2)	56.47	6.48	10.02	4.43
平均值 (average value)	56.45	6.50	10.00	4.47
理论值 (theoretical value)	56.46	6.63	9.88	4.47

2.2 热分析 以氮气保护, 升温速度 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 为实验条件, 温度范围为 $30 \sim 240^\circ\text{C}$, 进行差示扫描量热分析 (DSC), 见图 2。以氮气保护, 升温速度 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 为实验条件, 温度范围为 $25 \sim 450^\circ\text{C}$, 进行热重分析 (TGA), 见图 3。根据 DSC 图显示, 试样在 114.24°C 开始失去结晶水, 对应 TGA 图的失重量, 可以计算出失去了 2 个结晶水。在 150.84°C 和 181.88°C 有 2 个相变点, 由 TGA 图失重线结合 DSC 图可知 249.81°C 之后快速失重分解。

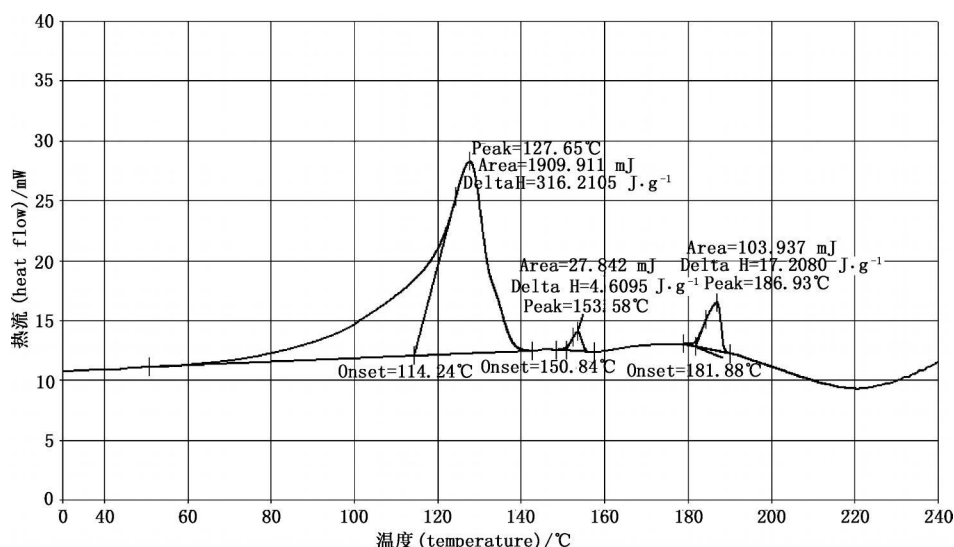


图 2 巴罗沙星的差示扫描量热分析图

Fig 2 DSC of ciprofloxacin

2.3 X 射线粉末衍射分析 测定条件为管压: 40 kV, 管流: 100 mA, Cu K α 辐射, 石墨弯晶单色器, $DS = SS = 1^\circ$, $RS = 0.3 \text{ mm}$ 。扫描速度: $5^\circ \cdot \text{min}^{-1}$ 。步进间隔: 0.02° 。经由计算机分析软件将实验得到的 X 射线衍射数据进行平滑处理, K α_2 峰剥离, 自

动寻峰定位, 得到了巴罗沙星的衍射角度 2θ 、晶面间距 d (nm)、相对丰度 I/I_0 等晶体参数 (表 2) 及其衍射图谱 (图 4)。根据 XRD 图显示, 该试样呈结晶态。

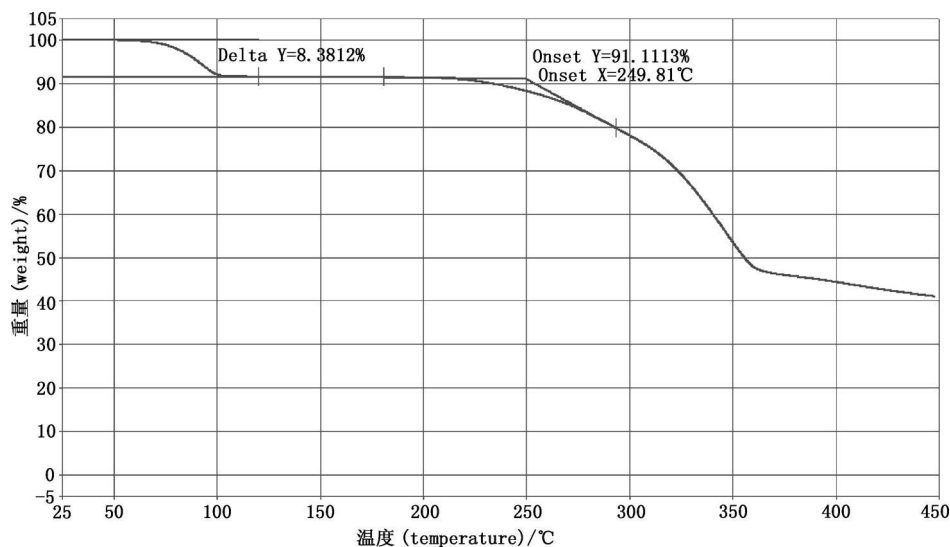


图 3 巴罗沙星的热重分析图

Fig 3 TGA of balofloxacin

表 2 粉末 X-射线衍射图数据

Tab 2 Data of XRD

衍射角 (angle of diffraction) $2\theta / (^{\circ})$	晶面间距 (interplanar spacing) d / nm	相对丰度 (relative abundance) I/I_0
7.62	11.59	90
10.20	8.67	100
14.10	6.28	95
14.78	5.99	44
16.28	5.44	42
20.90	4.25	79
21.86	4.06	70
23.54	3.78	57
23.94	3.71	87

2.4 紫外吸收光谱分析 将样品分别溶解于水、甲醇、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中, 使用 VARIAN Cary 5000 型紫外光谱仪, 钬玻璃校正, 测定其最大吸收波长 (λ_{max}), 摩尔吸收度 (ϵ), 归属跃迁形式。数据见表 3。

2.5 红外吸收光谱分析 用美国尼高力公司的 FT-R NEXUS-670 型红外光谱仪测定, 使用聚苯乙烯膜校正, KBr 压片法, 扫描范围为 $400 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$, 谱图见图 5。 3451 cm^{-1} 为羧基中羟基的伸缩振动 ($\nu_{\text{O-H}}$), 1625 cm^{-1} 为羧基中羰基的伸缩振动 ($\nu_{\text{C=O}}$); 3386 cm^{-1} 为仲胺 N-H 的伸缩振动 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1549 cm^{-1} 为仲胺 N-H 的弯曲振动 ($\delta_{\text{N-H}}$); 3012

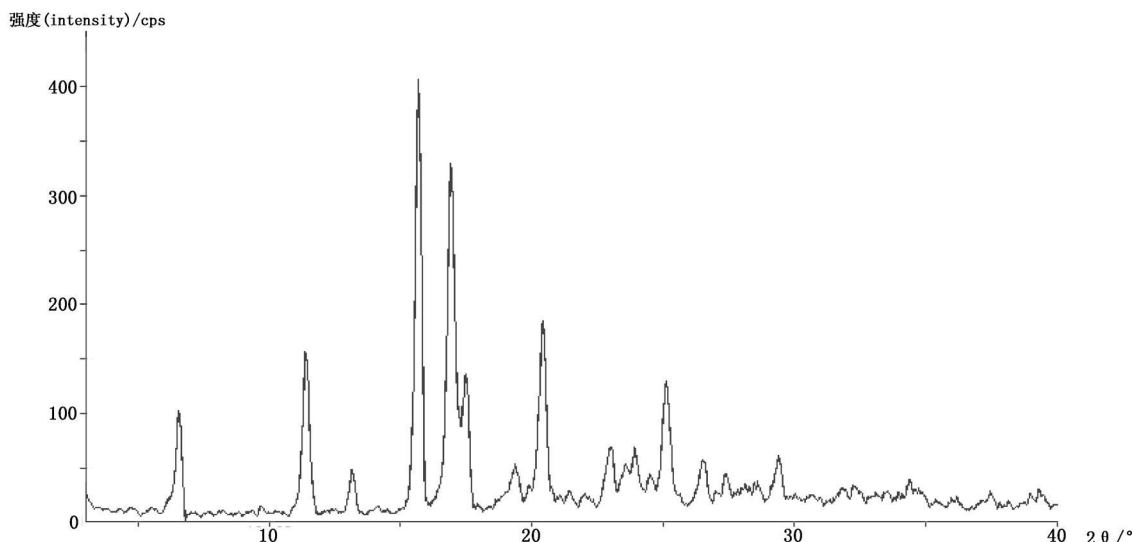


图 4 巴罗沙星的粉末 X-射线衍射谱图

Fig 4 XRD of balofloxacin

表 3 紫外光谱分析数据
Tab 3 Data of UV analysis

溶剂 (solvent)	样品浓度 (concentration of sample / $\times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	$\lambda_{\text{max}} / \text{nm}$	$\epsilon (\times 10^4)$	跃迁形式归属 (identification of transition form)
H_2O	2.52	287	1.61	$\text{p}^0 \rightarrow \text{p}^*$
CH_3OH	2.87	295	3.46	$\text{p}^0 \rightarrow \text{p}^*$
$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ HCl}$	3.13	294	3.03	$\text{p}^0 \rightarrow \text{p}^*$
$0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$	2.54	290	2.61	$\text{p}^0 \rightarrow \text{p}^*$

cm^{-1} 为喹啉环上不饱和 H 的伸缩振动 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1581 cm^{-1} 、 1459 cm^{-1} 为喹啉环的骨架伸缩振动, 1283 cm^{-1} 为喹啉环上不饱和 H 的弯曲振动 ($\delta_{\text{C-H}}$); 3084 cm^{-1} 、 3035 cm^{-1} 为环丙烷上 C-H 的伸缩振动 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1419 cm^{-1} 为环丙烷上 C-H 的弯曲振动 ($\delta_{\text{C-H}}$)。 2991 cm^{-1} 、 2947 cm^{-1} 、 2858 cm^{-1} 、 1397 cm^{-1} 、 1371 cm^{-1} 为甲基、亚甲基的伸缩振动 (ν_{CH_3} ,

ν_{CH_2}) 和弯曲振动 (δ_{H_3} , δ_{CH_2}); 1756 cm^{-1} 为酮羰基的伸缩振动 ($\nu_{\text{C=O}}$); 1171 cm^{-1} 、 1046 cm^{-1} 分别为甲氧基中 C-O-C 的对称和反对称伸缩振动; 1088 cm^{-1} 为喹啉环上 C-F 的伸缩振动 ($\nu_{\text{C-F}}$)。 上述结果表明: 样品分子结构中有羧基、酮羰基、仲胺基、喹啉环、环丙烷、甲氧基、甲基、亚甲基和 C-F 键, 与巴罗沙星的结构相符合。

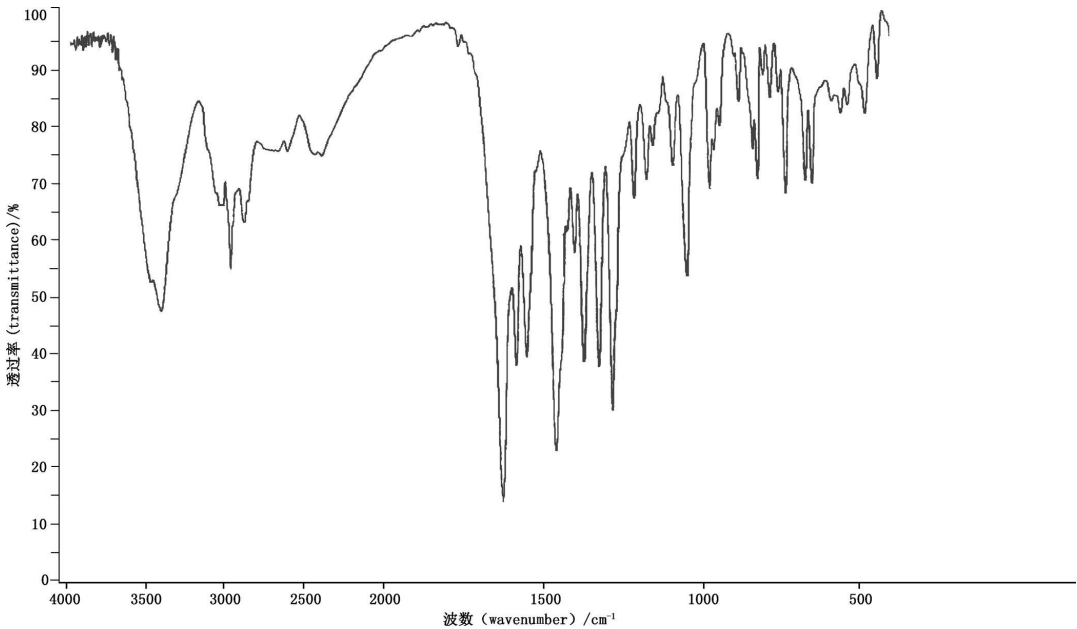


图 5 巴罗沙星的红外谱图
Fig 5 IR spectrum of babfloxacine

2.6 核磁共振光谱分析

碳氢位置标记见图 6
2.6.1 ^1H NMR 谱 氢谱中共给出 17 组氢, 其中 δ 2.50 为溶剂 DMSO 的峰, 各组峰的积分比例由低场到高场为 1:1:1:3:1:1:1:1:1:3:1:1:1:1:2:2。
① 第 1 组、第 2 组、第 2 组和第 5 组峰的积分比例为 1:1:1:1, DEPT 和 HSQC 图谱表明该四组质子均为 CH 类型的质子, 其中第 3 组和第 5 组峰在 COSY 谱中各与 1 个 CH_2 类型的质子存在相关, 而在 HMBC 图谱中, 第 1 组峰与 1 个 CH 和 3 个季碳

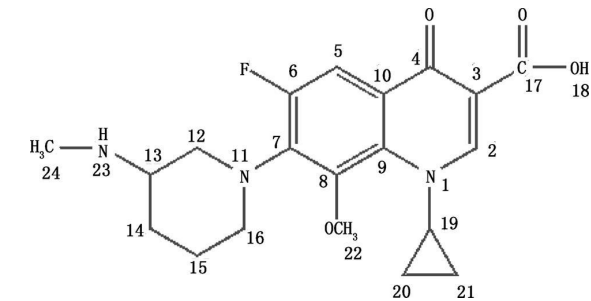


图 6 巴罗沙星的原子标记
Fig 6 Sign of babfloxacine

存在相关,第 2 组峰与 4 个季碳存在相关,第 5 组峰与 3 个 CH_2 存在相关,因此 δ 8.65(s) 是 2 位质子, δ 7.66(d, $J=12.2\text{ Hz}$)、 δ 7.63(d, $J=12.2\text{ Hz}$) 为 5 位质子, δ 4.17~4.14(m) 为 19 位质子, δ 3.59(m) 为 13 位质子。

② 第 6 组、第 7 组、第 8 组、第 9 组、第 11 组、第 12 组、第 13 组和第 14 组峰的峰面积均为 1, DEPT 和 HSQC 图谱显示该八组质子均属于 CH 类型的质子,并且第 6 组和第 7 组、第 8 组和第 9 组、第 11 组和第 14 组、第 12 组和第 13 组分别与同 1 个 CH_2 的碳相连; COSY 谱表明第 7 组峰与第 13 组峰存在相关,第 8 组峰与第 5 组峰存在相关,第 9 组峰与第 14 组峰存在相关,因此 δ 3.11~3.05(t, $J=11.3\text{ Hz}$) 应是 16 位质子, δ 2.82~2.77(t, $J=10.6\text{ Hz}$) 和 δ 2.59~2.54(m) 应是 12 位质子, δ 2.00~1.97(d, $J=12\text{ Hz}$) 和 δ 1.24~1.19(m) 应是 15 位质子, δ 1.78~1.75(m) 和 δ 1.67~1.58(m) 应是 14 位质子。

③ 第 15 组和第 16 组峰的峰面积均为 2 根据 DEPT 和 HSQC 图谱发现,该两组均属于 CH 类型的质子, COSY 谱显示第 15 组峰与第 3 组峰存在相关,因此 δ 1.17~1.07(m) 应是 20 和 21 位与 19 位质子在另一侧的质子,而 δ 1.05~1.01(m) 应是 20 和 21 位与 19 位质子在另一侧的质子。

④ 第 4 组和第 10 组峰的峰面积均为 3 根据 DEPT 90 和 HSQC 图谱可以判断,该两组峰均为 CH_3 类型的质子, HMBC 图谱显示第 4 组峰与 1 个季碳存在相关,第 10 组峰与 1 个 CH 类型碳存在相关,因此 δ 3.73(s) 属于 22 位质子, δ 2.30(s) 是 24 位质子。

由于样品中含有结晶水,导致其分子结构中 18 和 23 位的活泼氢没有被检测到。

2.6.2 ^{13}C NMR 谱 碳谱中给出 21 组峰,其中 δ 40.64~39.39 为溶剂 DMSO 的峰, DEPT 90 和 DEPT 135 谱说明有 4 个 CH , 6 个 CH_2 , 2 个 CH_3 存

在,其余均为季碳。

① 分子的结构中有 4 个 CH 存在,根据氢谱的分析的结果,可以知道 δ 150.81 是 2 位碳, δ 107.17~106.79 是 5 位碳, δ 56.73 是 19 位碳, δ 41.29 是 13 位碳。

② 结构中有 6 个 CH_2 , 在 DEPT 135 谱中示 $\downarrow$, 结合 H-HCOSY、HSQC 和 HMBC 谱可以得知: δ 56.82 是 12 位碳, δ 51.61 和 51.58 是 16 位碳, δ 30.91 是 15 位碳, δ 25.03 是 14 位碳, δ 9.53 和 9.40 是 20 和 21 位碳。

③ DEPT 135 图谱显示结构中有 2 个 CH_3 , 根据氢谱的分析的结果,可以知道 δ 63.23 就是 22 位碳, δ 33.87 就是 24 位碳。

④ 比较 ^{13}C 和 DEPT 135 谱,可以发现该分子结构中有 8 个季碳, HMBC 谱显示 δ 176.70 和 δ 134.60 均与 2 和 5 位质子存在相关关系,结合所处的化学环境可以判断, δ 176.70 是 4 位季碳, δ 134.60 是 3 位季碳; δ 166.21 仅与 2 位质子存在相关关系,应是 17 位的季碳; δ 157.34 和 δ 121.01、 δ 120.92 均与分子结构中任何质子没有相关关系,结合氟原子对碳分裂的特征,可以判断出, δ 157.34 是 9 位季碳, δ 121.01 和 120.92 是 7 位季碳。 δ 154.87 和 δ 140.31、 δ 140.19 均与 5 位的质子存在相关,同样结合氟原子对碳分裂的特征可以得知, δ 154.87 是 10 位季碳, δ 140.31、 δ 140.19 是 6 位季碳; δ 146.21、 δ 146.15 与 22 位的质子存在相关,应是 8 位季碳。

综上所述, NMR 给出的信息与结构式相符。

2.7 质谱分析 使用 Varian 2200MS 质谱仪测定,测试条件为 ESI 源。质谱图见图 7。巴罗沙星的分子量为 425 由质谱图可见,去除 2 个结晶水后, $[\text{M}+1]^+$ 峰为 390 质量碎片离子峰的质荷比为 372 和 359 产生碎片离子过程如示意图(图 8)。

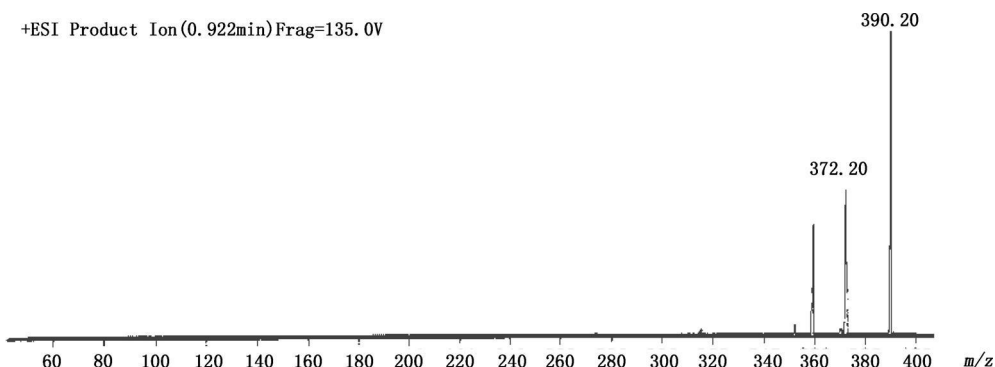


图 7 巴罗沙星的质谱图

Fig 7 MS of barosaxin

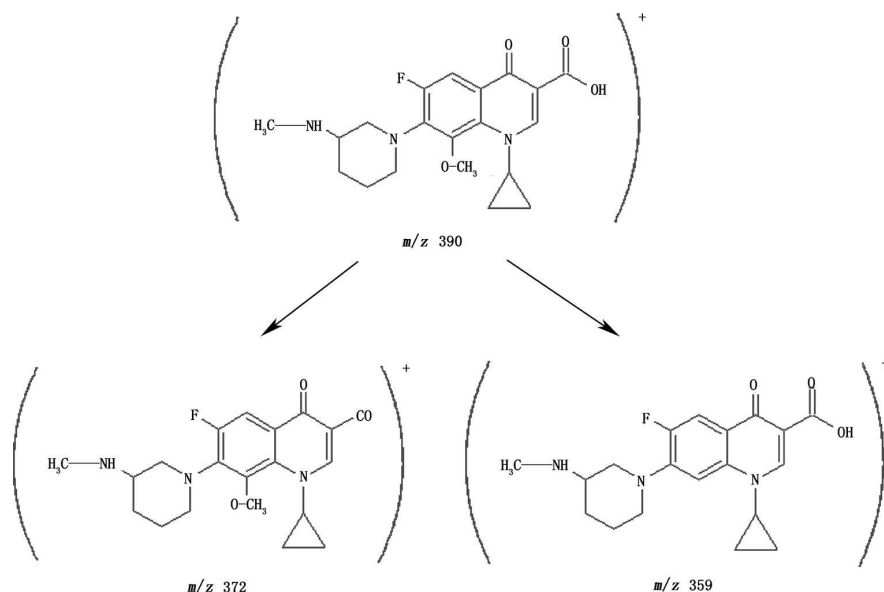


图 8 巴罗沙星碎片离子产生示意图

Fig 8 Fragment ion of bafloxacin

3 结论

高效液相色谱测定样品纯度为 99.54%，元素分析测定样品碳、氢、氮元素含量与巴罗沙星分子式中元素含量一致；热重分析证实该试样含有 2 个结晶水；X 射线粉末衍射分析确定该样品呈结晶状态，给出了相关的衍射角度、晶面间距、相对丰度等晶体结构参数；紫外光谱显示有芳香环存在；红外光谱、核磁共振谱都有与巴罗沙星结构相符的特征峰；质谱的主要碎片峰与该化合物的相关式量相符。通过以上分析最终确认样品结构为 1-环丙基-6-氟-1,4-二氢-8-甲氧基-4-氧代-7-(3-甲氨基-1-哌啶基)-3-喹啉羧酸二水合物即巴罗沙星。

4 讨论

4.1 样品的结构测定要求样品的纯度在 98% 以上^[8]，所以在测定结构之前，需先进行样品纯度检测。采用高效液相色谱测定样品纯度为 99.54%，之后又进行了元素分析，其结果也相互印证了样品纯度符合要求，能够进行下一步的结构分析。

4.2 对于含有结晶水的化合物，使用热重分析与差示扫描量热分析联合解析，可以准确地计算出化合物具有结晶水的数量，以及失去结晶水的温度。

4.3 晶型测定常用方法有粉末 X-射线衍射和单晶 X-射线衍射。但单晶 X-射线衍射所需的单晶难以制得，测试耗时长。而粉末 X-射线衍射也能准确地表征巴罗沙星的晶体结构、晶粒尺寸和结晶

度，而且经济、快捷，所以本实验选择粉末 X-射线衍射来测定。

参考文献

- 1 A ksne L. Bafloxacin choongwae *Curr Opin Inverstig Drugs* 2003 4 (2): 224
- 2 Ito T, Otusuki M, Nishino T. In vitro antibacterial activity of Q-35, a new fluoroquinolone *Antimicrob Agents Chemother*, 1992 36(1): 708
- 3 ZHONG Wen-ying (钟文英), HUANG Qi (黄琦), WANG Dan-dan (王丹丹), et al. Interaction between bafloxacin and DNA and the influence of Mg^{2+} on the interaction (巴罗沙星与 DNA 的相互作用及 Mg^{2+} 的影响). *Acta Pharm Sin* (药学报), 2005 40(7): 663
- 4 MA Chao (马超), HUANG Chang-gao (黄长高), CHEN Xiao-qing (陈小青), et al. Chemical structure analysis of zonisamide (唑尼沙胺化学结构分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2009 29(10): 1607
- 5 HUANG Chang-gao (黄长高), LI Gang (李钢), ZHENG Hai-hui (郑海辉). The quantitative analysis of $\alpha-SO_2$ in montmorillonite (蒙脱石中 $\alpha-SO_2$ 的定量分析). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008 28(12): 2103
- 6 Bian ZW, Tian Y, Zhang ZJ et al. High performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometric determination of bafloxacin in human plasma and its pharmacokinetics *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2007, 850 (1-2): 68
- 7 LI Gang (李钢), XU Qun-wei (徐群为), LI Rui (李瑞), et al. Polymorphism and solubility of nateglinide (那格列奈的多晶型与溶解度). *Acta Chim Sin* (化学学报), 2007 65(24): 2817
- 8 SUN Yu-qing (孙毓庆). Analytical Chemistry (分析化学). Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 2005. 333

(本文于 2010 年 3 月 29 日收到)