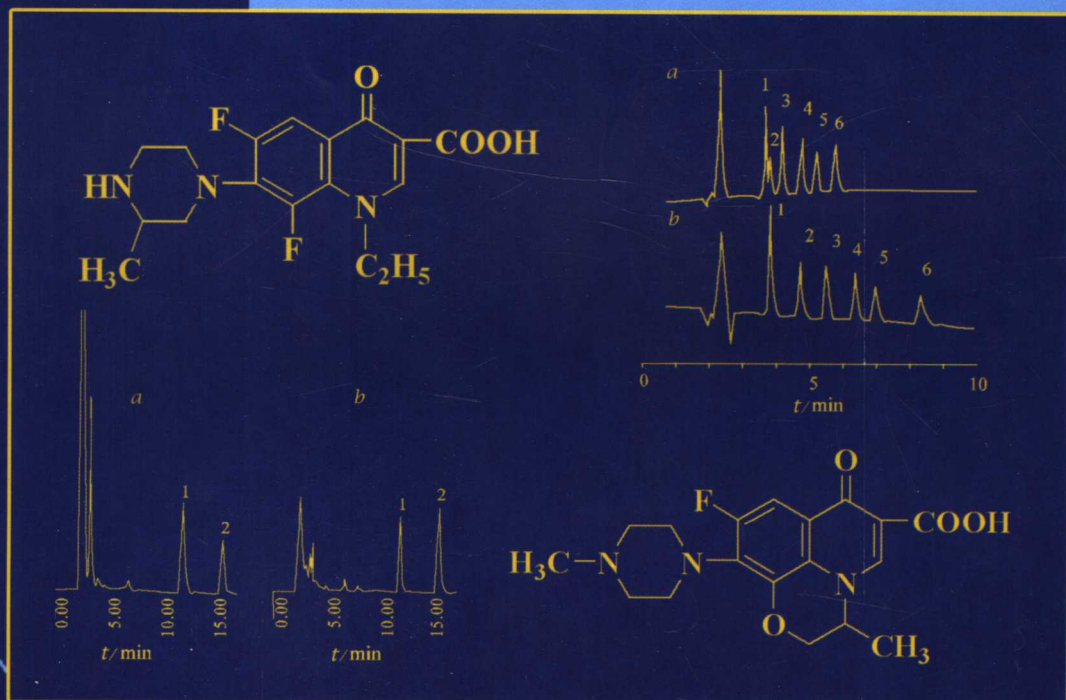


喹诺酮类药物的分析 方法与应用

杜黎明 吴 昊 陈彩萍 编著



科学出版社
www.sciencepress.com

山西师范大学学术著作出版基金资助

喹诺酮类药物的分析 方法与应用

杜黎明 吴 昊 陈彩萍 编著

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书全面介绍了当前喹诺酮类药物各种分析方法的基本原理和技术,评述了这些方法的应用及国内外的最新研究成果和发展趋势。全书共8章,除对喹诺酮类药物的有关知识进行了必要介绍外,重点对紫外-可见分光光度法、荧光分光光度法、化学发光法、高效液相色谱法、高效毛细管电泳法及电化学分析等较新方法的原理和应用做了详细的阐述。此外,还介绍了测定喹诺酮类药物的不同仪器的最新联用技术。

本书可作为药学相关专业研究生、高年级本科生的教学参考书,也可供医学、药学、化学化工、环境科学及生命科学领域专业人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

喹诺酮类药物的分析方法与应用 / 杜黎明, 吴昊, 陈彩萍编著. —北京: 科学出版社, 2006

ISBN 7-03-018084-4

I. 喹… II. ①杜… ②吴… ③陈… III. 抗生素, 喹诺酮—药物分析
IV. R978.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 113430 号

责任编辑: 陈 欣 黄 敏 / 责任校对: 鲁 素

责任印制: 刘士平 / 封面设计: 黄 超

版权所有, 违者必究。未经本社许可, 数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京市文林印务有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2006 年 10 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2006 年 10 月第一次印刷 印张: 11

印数: 1—1 500 字数: 252 000

定价: 34.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换〈文林〉)

前 言

喹诺酮类药物是目前临床上广泛应用的广谱、高效、低毒的化学合成抗生素,已成为当今世界各国竞相开发、生产和应用的重点药物。与此同时,其分析方法和分析技术也得到了快速的发展,已由二十多年前的容量分析法、微生物和分光光度法向色谱-光谱-电子计算机等多元联用技术的方向发展,而且组成各种联用技术的各个分析技术本身也得到了前所未有的巨大发展和变化。纵观喹诺酮类药物的分析方法报道,在分析方法上仍然以高效液相色谱及液质联用占多数;高效毛细管电泳因具有分离效率高、样品用量少等特点得以快速发展;紫外-可见分光光度法已成为测定这类药物的常规分析方法;喹诺酮类药物的共轭体系和刚性结构使荧光光谱的测定也有了长足的进展;电化学分析为揭示药物的作用机制提供了更多的重要信息;另外,气相色谱、近红外光谱、核磁共振、质谱、原子吸收等在测定喹诺酮类药物方面都表现出一定的特点和优势。

本书的显著特点是在参考各家论著和国内外最新文献资料的基础上,将作者的研究成果有机地融入到整本书中,形成了一个内容丰富、层次分明、逻辑性强并具有自己特色的完整体系。

全书共8章,第1章为喹诺酮类药物概述,第2章至第4章介绍了喹诺酮类药物的光谱分析方法。第5章和第6章介绍了喹诺酮类药物的色谱分析方法。第7章为电化学分析方法。由于气相色谱法、薄层色谱法、红外光谱法、核磁共振以及质谱法文献量较少,故作为其他方法列在第8章中。

杜黎明对本书进行了统稿并与吴昊共同撰写了第1章至第6章。第7章和第8章由陈彩萍撰写。董胜利、庞涛涛、张敏、姚如心在本书编写过程中做了大量的文献查阅和文字处理工作,在此一并感谢。同时感谢山西师范大学学术著作出版基金对本书出版的资助。由于作者水平所限,书中难免会有缺点和不当之处,诚恳欢迎读者批评指正。

编 者

2006年6月

目 录

前言

1 喹诺酮类药物概述	1
1.1 喹诺酮类药物的发展及现状	1
1.2 喹诺酮类药物的分类及作用特点	4
1.3 氟喹诺酮类药物的化学结构及构效关系	5
1.4 喹诺酮类药物作用机制	7
1.5 喹诺酮类药物的分析方法	7
2 紫外-可见分光光度法	10
2.1 直接紫外分光光度法	11
2.2 导数分光光度法	13
2.3 固相分光光度法	15
2.4 动力学分光光度法	16
2.5 差示分光光度法	16
2.6 流动注射分光光度法	18
2.7 金属络合分光光度法	19
2.8 离子缔合分光光度法	21
2.9 荷移分光光度法	23
3 荧光分光光度分析	31
3.1 胶束增敏荧光分析	32
3.2 同步荧光分析	33
3.3 导数荧光分析	34
3.4 衍生化荧光分析	36
3.5 荧光探针分析	37
3.6 金属络合荧光分析	40
3.7 荷移荧光光谱分析	43
3.8 固相萃取荧光光分光光度法	49
3.9 化学计量学方法	50
3.10 固体表面荧光分析	52
3.11 喹诺酮类药物发光机制探讨	53
4 化学发光分析法	59
4.1 氧化剂- SO_3^{2-} 的化学发光分析	61
4.2 电化学发光分析	66

4.3	鲁米诺-过氧化氢发光分析	68
4.4	其他化学发光分析	69
5	高效液相色谱法	73
5.1	反相键合相色谱法	74
5.2	反相离子对色谱法	88
5.3	离子抑制色谱法	94
5.4	胶束色谱法	100
5.5	手性药物色谱拆分法	101
5.6	凝胶色谱法	106
6	高效毛细管电泳法	112
6.1	毛细管区带电泳分析	113
6.2	胶束电动毛细管色谱分析	119
6.3	等速聚焦毛细管电泳分析	123
7	电化学分析方法	125
7.1	电位分析法	125
7.2	单扫描示波极谱分析法	130
7.3	伏安法	134
7.4	极谱法	142
7.5	极谱催化波法	144
7.6	示波分析法	147
7.7	电导滴定法	149
8	其他分析方法	153
8.1	气相色谱法	153
8.2	薄层色谱法	155
8.3	原子吸收分光光度法	157
8.4	核磁共振波谱法	158
8.5	近红外光谱法	161
8.6	滴定分析法	162
8.7	微生物检测法	164

1 喹诺酮类药物概述

1.1 喹诺酮类药物的现状及发展

喹诺酮类药物(quinolones)是目前广泛用于治疗各种感染性疾病的广谱、高效、低毒性的化学合成药。喹诺酮类药物由于具有抗菌谱广、抗菌活性强、口服吸收好、价格低廉等特点,因此在临床上得到广泛应用^[1],成为当今世界上竞相开发生产和应用的重点药物。它是继磺胺类药之后,在抗感染药物研发方面的又一重大进展,开创了合成抗菌药的新时代^[2]。到目前为止已合成了数以万计的喹诺酮类衍生物,有 60 多个品种经过临床验证或正在临床试验中^[3],其中批准上市的有 20 多个品种(表 1-1、图 1-1 和图 1-2)。这类药物国外有两种名称:喹诺酮类和吡酮酸类(pyridonecarboxylic acid),前者为习惯名称,从化学意义上讲后者更为严谨。因为严格讲,前者应专指喹啉环系,只是因为该环系在此类药物中发展最快,出现的优秀品种最多,故人们将该类药物统称为 quinolones。事实上到目前为止,还有除 quinolone 以外的其他环系^[4]。美国将这类药物的名称词干规定为“xacin”,不同的药物加上不同的前缀加以区别,这种命名法很快被各国所认可。我国药典委员会将这类药物名称中的词干规定为“沙星”,如诺氟沙星、氧氟沙星、环丙沙星等。

表 1-1 已上市喹诺酮类药物一览表

分 类	名 称	英 文	开发单位	上市时间
第一代	萘啶酸	nalidixic acid	Dicision of Srerling Drug	1964
	吡咯酸	piromidic acid	大日本制药	1969
第二代	西诺沙星	cinoxacin	Elilly	1970
	吡哌酸	pipemidic acid	Laboratoire Roger Bellon	1974
第三代	依诺沙星	enoxacin	大日本制药	1982
	诺氟沙星	norfloxacin	日本杏林制药	1983
	培氟沙星	perfloxacin	Laboratoire Roger Bellon	1984
	氧氟沙星	ofloxacin	日本第一制药	1986
	环丙沙星	ciprofloxacin	Bayer	1987
	洛美沙星	lomefloxacin	日本北陆制药	1990
	托氟沙星	tosufloxacin	日本富山化学	1990
	替马沙星	temafloxacin	Abott(1992 年 6 月撤出市场)	1991
	芦氟沙星	rufloxacin	Mediolanum	1992

续表

分 类	名 称	英 文	开发单位	上市时间
第四代	氟罗沙星	fleroxacin	日本杏林制药	1992
	司帕沙星	sparfloxacin	大日本制药	1993
	那地沙星	nadifloxacin	大塚制药	1993
	左旋氧氟沙星	levofloxacin	日本第一制药	1994
	格帕沙星	grepafloxacin	大塚制药	1997
	曲伐沙星	trovafloxacin	Pfizer	1998
	莫西沙星	moxifloxacin	Bayer	1999
	加替沙星	gatifloxacin	杏林/BMS	1999
	吉米沙星	gemifloxacin	史克必成公司	1999

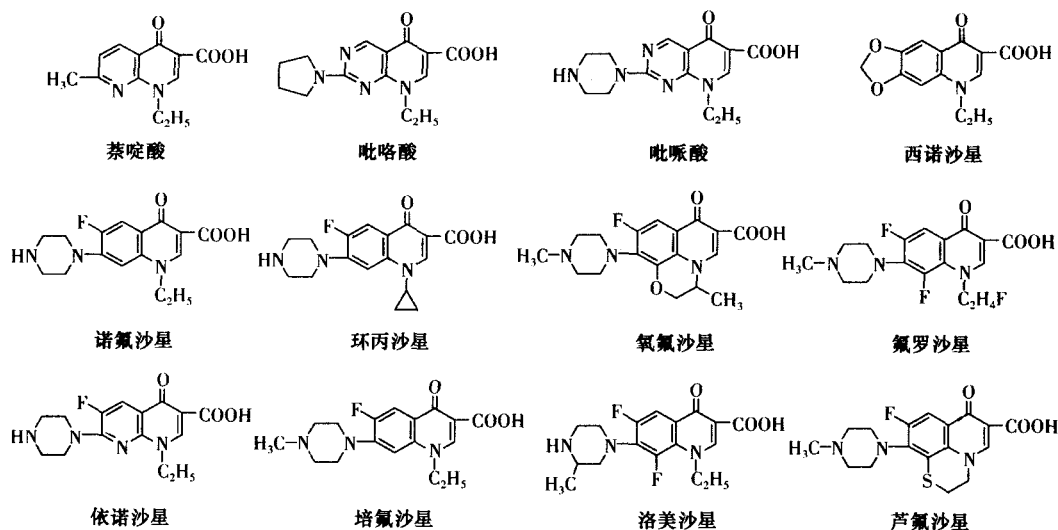


图 1-1 已上市喹诺酮类药物的分子结构(一)

1962 年,美国 Sterling-Winthrop 研究所的 Lesher 等发现了第一个喹诺酮类药物萘啶酸(nalidixic acid),随后许多学者致力于研究开发这类药物。国际学术界将喹诺酮类药物的发展分为四个阶段:第一阶段为发展初期,时间是 20 世纪 60~70 年代,代表产品为萘啶酸和吡哌酸,仅有中等抗菌活性,药代动力学及安全性也不理想,目前基本退出市场。从 20 世纪 80 年代起进入第二阶段,喹诺酮类药物进入快速发展时期,通过化学修饰在其主环 6 或 8 位上加入氟原子后又被称为氟喹诺酮类药物,代表产品有诺氟沙星(1978 年获专利)、环丙沙星(1981 年)、氧氟沙星(1982 年)、培氟沙星(1979 年)、依诺沙星(1980 年)和氟罗沙星(1981 年)。氟喹诺酮类药物的问世,使学术界对喹诺酮产品有了全新的认识和评价,并得到广泛的临床应用,获得了一致好评,其综合临床疗效对革兰阴性菌来讲,已经超过了青霉素族,达到了第一代、第二代头孢菌素的效果,其中抗菌活性以环丙沙星为最佳,药代动力学性能以氧氟沙星为最好。20 世纪 90 年代初进入第三阶段,这一阶段上市的产品与老的氟喹诺酮类化合物相比,药效学上抗菌谱扩大到衣原体、支原体及细胞内致病菌,抗菌活性

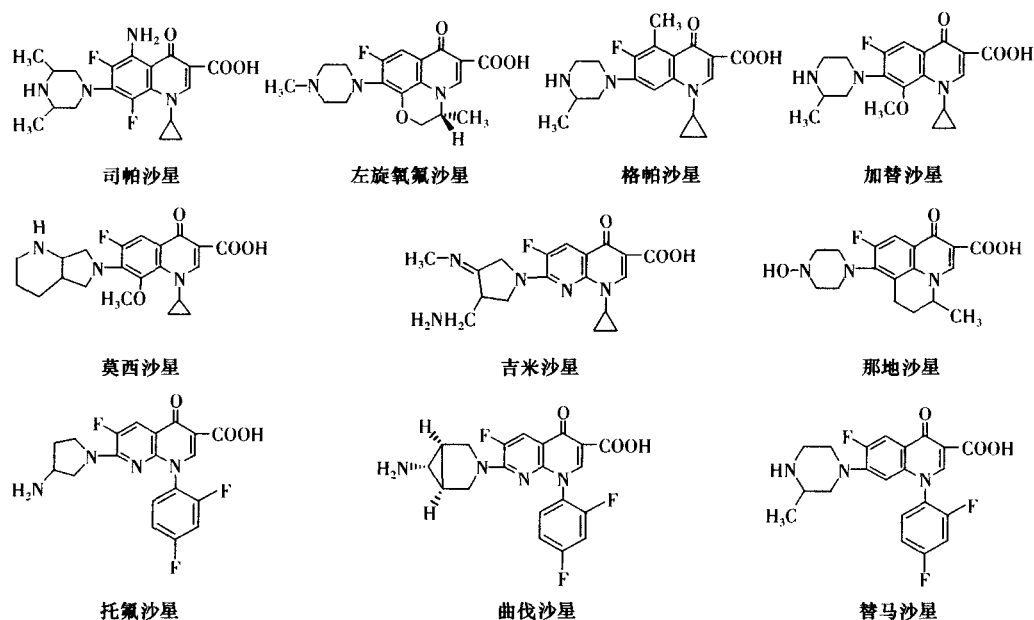


图 1-2 已上市喹诺酮类药物的分子结构(二)

也大大提高,同时药代动力学及安全性也有了很大改善,综合临床疗效达到了新的水平,学术界公认已完全达到或超过了第三代头孢菌素的效果。这一阶段上市的药物有司帕沙星、那地沙星、左旋氧氟沙星、格帕沙星、曲伐沙星和阿拉沙星。20 世纪 90 年代后期开始进入第四阶段,这一阶段的产品,有些结构较前阶段的经典产品有很大改进,而更重要的是其药理特性较以往又有了巨大的改善,有些产品的抗菌谱及抗菌力达到了新的高峰,对大部分致病菌来讲,已经达到或超过了抗菌药物的王牌 β -内酰胺类抗生素,甚至达到了“Tienam”的指标。从第四阶段开始,喹诺酮类药物产品有希望占据抗感染药物的最大份额,有人预言 21 世纪将是氟喹诺酮类药物的时代。

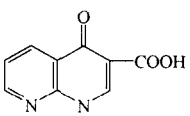
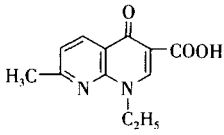
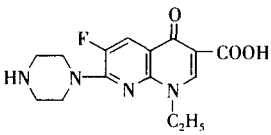
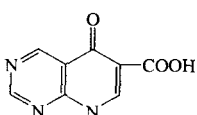
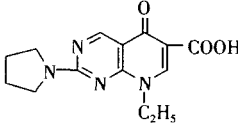
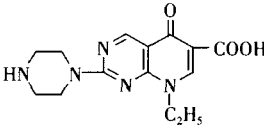
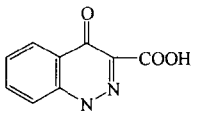
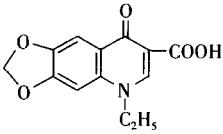
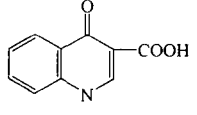
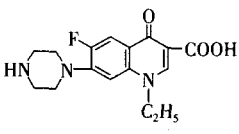
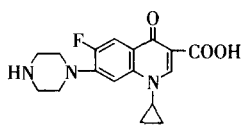
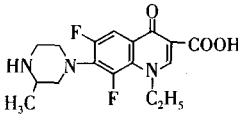
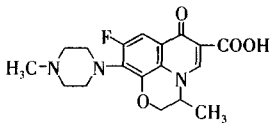
目前国际市场上,氟喹诺酮类药物占抗感染药物市场份额的 20% 左右,并继续以惊人的速度增长。1985 年全球喹诺酮类药物销售额仅为 1 亿美元,1988 年上升至 10 亿美元,1992 年达到 22 亿美元,1996 年升至 60 亿美元,2000 年达到 80 亿美元,2002 年全球氟喹诺酮类药物的市场规模已达到 90 亿美元,预计未来几年氟喹诺酮类药物销售额仍将以 5%~8% 的速度增长,预计 2006 年全球销售额将达到 110 亿~120 亿美元。据 Datamonitor 的研究结果,2004 年头孢类市场占有率为 26.13%,但由于氟喹诺酮类市场的增长,预计 2009 年将降低至 17.11%,而氟喹诺酮类抗生素也将由目前的 20% 上升为 34% 的市场份额^[5]。我国喹诺酮类药物开发与生产起步于 20 世纪 80 年代,进入 90 年代国内加快了发展步伐^[6]。国外成熟的品种,国内均能投入生产,目前我国已经开发成功并投入批量生产的有 10 多种,其中诺氟沙星、环丙沙星、氧氟沙星产量最大,约占国内氟喹诺酮类药物总产量的 98%。2002 年诺氟沙星的产量约为 3600 吨,环丙沙星为 1800 吨,氧氟沙星为 1200 吨。不仅满足了国内市场需求,而且已经大量出口,2002 年这三大主导产品出口量达到 2500 吨,占总

产量 38%，成为全球的主要生产国和供应国之一。因此，世界抗感染药物的研发与市场重心正在向氟喹诺酮类药物转移。据预测，未来 5 年内世界氟喹诺酮类药物市场将迎来最快的增长阶段。

1.2 喹诺酮类药物的分类及作用特点

对于喹诺酮类药物的分类目前尚无统一的标准，按喹诺酮类药物的母环不同可分为萘啶酸类、吡啶并嘧啶酸类、噌啉酸类和喹啉酸类(表 1-2)。据 1997 年 Andriole 提出、经 Schellhore 整理的 Andriole-Schellhore 的分类方法^[7,8]将喹诺酮类药物共分为四代^[9](表 1-1)。

表 1-2 喹诺酮类药物的分类和化学结构

分 类	品 种	
 萘啶酸类	 萘啶酸	 依诺沙星
 吡啶并嘧啶酸类	 吡咯酸	 吡哌酸
 噌啉酸类	 西诺沙星	
 喹啉酸类	 诺氟沙星	 环丙沙星
	 洛美沙星	 氧氟沙星

第一代喹诺酮类药物以萘啶酸为代表，于 20 世纪 60 年代进入临床，它对于大多数革兰阴性菌有活性，对革兰阳性菌和铜绿假单胞菌无活性，体内易被代谢和失活，其特点是与其他抗生素之间无交叉耐药性。主要用于治疗泌尿道感染。但因其不良反应严重，故目前已弃而不用。

第二代喹诺酮类药物以吡哌酸为代表，于 20 世纪 70 年代进入临床，对革兰阴性菌有活性，在抗菌谱方面，与第一代药物相比，对铜绿假单胞菌有抗菌作用，对萘啶酸和吡咯酸有

高度耐药的菌株也有活性,体内代谢稳定,有更好的组织渗透性,与萘啶酸有不完全交叉耐药性。吡哌酸比萘啶酸有更好的临床疗效,除治疗泌尿道、胆道和肠道感染外,还用于耳、鼻等部位的感染。

第三代喹诺酮类药物以诺氟沙星、环丙沙星和氧氟沙星为代表,于 20 世纪 80 年代和 90 年代进入临床,比第一代和第二代喹诺酮类药物有更广的抗菌谱和更强的抗菌作用,具有口服吸收迅速、体内分布广、停留时间长、不易产生耐药性、毒副作用小和无致畸性等特点,故在临床上得到广泛的应用,目前主要用于治疗呼吸道、泌尿道、胆道、皮肤软组织以及外科、妇科、耳鼻喉科、眼科和口腔科等感染。

第四代喹诺酮类药物均在 20 世纪 90 年代后期上市,它们除保持了第三代喹诺酮类药物抗菌谱广、活性强、组织渗透性好等优点外,抗菌谱进一步扩大到衣原体、支原体等病原体,且对革兰阳性菌和厌氧菌的活性显著强于环丙沙星等。其中司帕沙星对结核分枝杆菌的活性强度是第三代喹诺酮类药物的 330 倍,左旋氧氟沙星为氧氟沙星的 S 型异构体,抗菌活性是氧氟沙星的 2 倍,而且毒副作用更小^[10]。此类药物具有吸收迅速、分布良好、血药浓度大、半衰期长以及生物利用度高等特点,在临床上可用于泌尿道感染、呼吸道感染、消化道感染、皮肤和软组织感染、眼耳鼻喉科及口腔科等疾病的治疗。

近年来,由于现代科学技术的飞速发展,尤其是分离鉴别技术、分子药理学和电子计算机的广泛应用以及新合成方法的不断出现,每天都会涌现出大量的新化合物,在这种形势下,加上药物化学家、微生物学家、药理毒理学家和临床专家的共同努力,使得历史较短的喹诺酮类药物获得再一次的发展机会。

1.3 氟喹诺酮类药物的化学结构及构效关系^[11]

喹诺酮类药物是以 1,4-二氢-4-氧吡啶-3-羧酸为基本母核结构的化合物,是从萘啶酸或吡酮酸演化而来的合成抗菌药物,其结构如图 1-3 所示:A 环是抗菌作用必需的基本结构,变化小,而 B 环可作较大改变,可以是苯环、吡啶环、嘧啶环等。对氟喹诺酮类药物分子结构的某些部位,如 2 位的氢、3 位的羧酸和 4 位的环外氧是很少去进行修饰的。因为 3 位的羧酸和 4 位的环外氧是氟喹诺酮类药物分子结合到细菌 DNA 旋转酶的部分。因此,不能改变这部分周围的立体化学结构。2 位因非常靠近结合位点,在此的任何修饰都是很有限的。现将喹诺酮类药物分子中各位点的修饰情况及构效关系介绍如下。

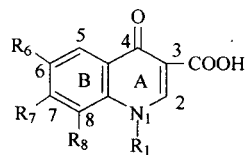


图 1-3 氟喹诺酮类药物的一般结构式

1. N-1 位 N-1 位取代基在寻找高效、广谱喹诺酮类化合物方面有着重要的作用。总的来讲,在 1 位上加入侧链可明显影响抗菌活性,1 位 N 原子上的取代基可以是烃基或环烃基,以乙基或与乙基体积相近的取代基最好。早期的化合物如萘啶酸、吡哌酸、诺氟沙星和培氟沙星等在此位都有乙基,氟罗沙星在此位上引入了氟代乙基,氧氟沙星引入了噁嗪基,其抗菌作用进一步提高。特别是环丙基的引入,进一步扩大了抗菌谱,增强了抗菌活性。事实上,在已用于临床的喹诺酮类药物中,环丙沙星是抗肠杆菌和铜绿假单胞菌最有效的药物。左旋氧氟沙星和芦氟沙星在 1 和 8 位形成桥环,曲伐沙星在 1 位接上 2,4-二氟苯环

后,都增强了抗革兰阳性菌活性。有关 N-1 位取代基对活性的影响,国内外都有较多的文献报道。Domagala 等认为 N-1 位取代基对活性的影响是立体与电子效应共同起作用的结果^[12];也有人认为这种影响主要是立体效应起作用^[13]。国内学者分别用循环子空间(CSR)方法^[14]和取代基的表面积和分子体积为参数^[15]为氟喹诺酮类药物 N-1 位抗菌构效关系建立了定量构效关系模型,均取得良好的结果。

2. C-5 位 C-5 位的取代作用主要是影响对革兰阳性菌的活性,显然这种活性还要受其他部位取代基的影响。几乎所有现今的氟喹诺酮类药物及早期的喹诺酮类药物在此位都是氢,大多数取代基引入 5 位均使抗菌活性降低甚至消失,这可能是干扰了 3 位的结合活性,因此,5 位取代基对活性的影响立体效应起主要作用^[16]。目前只有在 5 位上引入 NH_2 (司帕沙星)和 CH_3 (格帕沙星)能显著增强药物的抗菌活性。以 5 位氨基对抑制革兰阳性和阴性菌的活性为最高。Yun 等人利用神经网络,同时研究了 23 种 5,8 位二取代氟喹诺酮药物的定量构效关系(QSAR)和结构与毒性关系(QSTR),建立了良好的高活性、低毒性的药物分子筛选模型^[17]。

3. C-6 位 与其他取代基比较,6 位引入氟后增强了这些化合物抗革兰阴性致病菌的效力和扩大了抗革兰阳性菌谱,与无取代的相应化合物比较,与 DNA 旋转酶结合能力提高了 2~17 倍,对细胞渗透力提高了 1~70 倍,因此,6 位上的氟成为氟喹诺酮类药物结构的显著特点。

4. C-7 位 7 位的结构主要影响药物的抗菌谱、作用强度及药代动力学。大量的构效关系研究表明,碱性并具有适当水溶性的取代基引入 7 位,均有利于提高抗菌活性和改善药代动力学性质。最常见的取代基是哌嗪或甲基哌嗪。哌嗪环的引入(如诺氟沙星)增强了抗铜绿假单胞菌的活性,甲基哌嗪环的引入(如培氟沙星)则增加了药物的脂溶性,使之肠道吸收增强,对细菌的穿透力提高。由此可见,母体环 7 位上以 C—N 键连接哌嗪基或吡咯基,与以 C—C 键连接吡嗪基有截然不同的抗菌活性^[18]。影响药物活性的因素主要有:疏水参数、4 位氧原子、末端碳原子的电荷密度、最高占有轨道 HOMO、键级及末端碳原子与母体相连原子间的距离。其中 HOMO 对药物影响较大,此种影响的最大可能是药物分子与受体作用时存在电荷转移过程。

5. C-8 位 光毒性是氟喹诺酮类药物的重要副反应之一。喹诺酮类药物 8 位的结构改造主要影响药物的药代动力学性质和光毒性^[19~21]。多项研究表明,喹诺酮类药物的光毒性可能是由于药物对光不稳定,经紫外灯照射药物的结构变化,引起药物分解所致,或由于该产物引发了氧游离基而导致光毒性。文献报道喹诺酮类药物 8 位的结构改造主要影响药物的药代动力学性质和光毒性^[22]。8 位引入卤素可改造药物的吸收,但 8 位卤素引入,也有可能增加药物的光毒性,8-氯喹诺酮对紫外线不稳定,有光毒性。克林沙星和西地沙星均有 8-氯基,故其临床上的应用尚有疑问。8-氟基也有光毒性。8 位上的甲氧基能提供较好的抗厌氧菌活性,且似乎无光毒性。莫西沙星和加替沙星均有这一取代基,临床前研究未见光毒性。

有关喹诺酮类药物的构效关系已有全面的评述^[11,12]。对主核的裁剪,同电异素与生物等排体系的更换及对周围 1~8 位取代基的修饰已总结出若干规律,较好地改善了药物的安全性能,提高了抗菌活性,改善了药物的药代动力学性能。氟喹诺酮类抗菌剂的基础与临床研究在不断地深入与发展,近年来发展了一大批有着优良抗菌活性的临床前或临床试验药物,而且也给氟喹诺酮类药物的构效关系研究注入了新的活力,无疑将有更多的新氟喹

喹诺酮类药物问世,为临床提供更好的药品。

近年来,某些氟喹诺酮类药物具有抗肿瘤活性,已引起人们的广泛关注,氟喹诺酮类抗肿瘤药物的构效关系研究也取得了长足的进展^[23]。

细菌拓扑异构酶Ⅱ(DNA 旋转酶)是氟喹诺酮类抗菌药物细胞内的主要靶酶^[24],哺乳动物拓扑异构酶Ⅱ是临床上许多重要的抗肿瘤药物细胞内主要靶酶。研究发现,细胞和哺乳动物拓扑异构酶Ⅱ(TOPOⅡ)在活性部位酪氨酸周围的序列具有同源性。而且,抗肿瘤药物杀死癌细胞的机制似乎和氟喹诺酮类药物杀死细菌的机制相似,两种药物都抑制拓扑异构酶Ⅱ和DNA形成的中间态可裂解复合物。这充分说明氟喹诺酮类药物具有抗癌潜力。杨玉社等人研究了6,8-二氟喹诺酮、7位是吡啶衍生物的喹诺酮、3位是非羧基喹诺酮、1,2-位并环喹诺酮、异噻唑喹诺酮等一系列潜在的抗肿瘤喹诺酮分子的生物活性、构效关系^[25],也取得了相应的研究成果。

1.4 喹诺酮类药物作用机制

喹诺酮类药物都具有吡啶酮酸的共同结构,通过抑制DNA旋转酶,阻断DNA的复制而产生抗菌作用^[26]。DNA旋转酶的催化作用可以改变DNA结构。此酶有两个旋转酶A基因编码单位,能使DNA链在细菌染色体上断开,并在超螺旋后将染色体重新封接。氟喹诺酮类药物可以抵制DNA旋转酶A亚单位,从而抵制细菌DNA的复制转录,使细菌不能分裂,结果使脱氧核糖核酸、核糖核酸及蛋白质的合成受到干扰,使细胞不能再进行分裂而起到杀菌作用。这种作用一般对细菌的选择性高,对人的安全性大,因而喹诺酮类药物的发现和发展开创了合成抗菌药的新时代。

随着喹诺酮类药物的广泛应用,出现了一个值得关注的问题,那就是这类药物的细菌耐药性^[27]。耐药机制研究证实主要是染色体突变。耐药机制为细菌DNA旋转酶的改变,耐药菌株DNA旋转酶的活性改变主要由于A亚单位基因(*gyrA*)突变所致。DNA旋转酶为喹诺酮类药物抗革兰阴性菌的第一靶位,通过DNA旋转酶、DNA和喹诺酮类药物三者形成复合物,阻止DNA超螺旋的转化,产生杀菌作用。DNA旋转酶A亚单位变异是细菌产生耐药性的主要原因^[28],据A亚单位基因序列分析,耐药菌变异位于旋转酶A亚单位67~106位氨基酸即所谓耐喹诺酮类药物决定区,其中尤以83、87位氨基酸变异最为频繁。大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌83位均为丝氨酸,耐药大肠杆菌、金黄色葡萄球菌83位丝氨酸多被亮氨酸所替代,而产生耐药性^[28,29]。

1.5 喹诺酮类药物的分析方法

喹诺酮类药物的分析在方法和技术上已由二十多年前的容量分析法、微生物法和分光光度法向色谱-光谱-电子计算机等多元联用技术的方向发展,而且组成各种联用技术的各个分析技术本身也得到了前所未有的巨大发展和变化。这样不仅使喹诺酮类药物的静态常规检验和动态监控有关问题解决的更加完善,而且为药物的质量分析、质量控制、药品稳定性测试、降解物检测以及药代动力学研究诸多方面提供了切实可信的有效手段。同样,

现代分析技术和方法又适时而有效地推动了喹诺酮类药物的发展。由于这类药物在临床上的应用越来越广泛,其分析方法的进展近年来也受到了较大的关注。有关分析方法报道日益增多,专题综述也不断出现^[30~40],纵观喹诺酮类药物的分析方法的报道,在分析方法上,仍然以高效液相色谱(HPLC)^[31,32]及液质联用^[35]占多数。这是由于 HPLC 具有分离效率高、快速、准确等特点。高效毛细管电泳法(HPCE)具有分离模式多、分离效率高、样品用量少、分析时间短和适用范围广等优点。近年来,高效毛细管电泳法用于喹诺酮类药物分离和分析的报道日渐增加。毛细管电泳是 20 世纪 80 年代开始发展起来的一种新型分离技术,由于其独特的技术优势和分离特点很快成为一种具有较大影响的分离分析手段,因此,毛细管电泳测定喹诺酮类药物的研究工作得到了快速发展^[36]。紫外-可见分光光度法已成为测定喹诺酮类药物的常规分析方法^[37]。喹诺酮类药物具有芳香共轭体系结构和刚性结构,大多数喹诺酮类药物在适宜的条件下都有较强的荧光发射,因此,荧光光谱新方法不断涌现^[38,39]。电化学分析法可为揭示药物的作用机制提供许多重要信息,常用的方法有极谱法、吸附溶出伏安法、离子选择电极法和电位滴定法。此外,还有利用红外光谱法、质谱法、核磁共振法、拉曼光谱和原子吸收法进行喹诺酮类药物分析的方法报道。

对喹诺酮类药物实际分析的样品有原料、片剂、胶囊、注射剂、眼膏、眼耳鼻滴液等制剂。用于体内药物分析的样品最常用的是血浆和尿液,血浆中的浓度可以反映药物在体内的状况。尿样的测定主要用于药物剂量回收、药物肾清除率、生物利用度以及确定代谢物类型的研究。唾液用作药物浓度检测及药代动力学研究逐渐增多,这是由于唾液作为分析样品具有取样无损、易得以及唾液药物浓度与血浆药物浓度密切相关的优点。

喹诺酮类药物已成为广泛应用于临床的一类常用抗感染治疗药物,因此,了解和掌握喹诺酮类药物分析方法是至关重要的。本书就国内外近年来喹诺酮类药物的分析方法进展情况进行介绍和评述。

参考文献

- [1] Hooper DC, Wolfson JS. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *New Engl J Med*, 1991, 324: 384~394
- [2] Hooper DC, Wolfson JS. Mode of action of the quinolone antimicrobial agents: review of recent information. *Rev Infect Dis*, 1989, 11: 5902
- [3] 姚斌,徐炳祥,葛建明. 喹诺酮类抗菌药物研究的新进展. *药实践杂志*, 1999, 17: 332~336
- [4] 郭惠元,顾慧儿. 吡酮酸化学(上). *中国抗生素杂志*, 1995, 20: 85~90
- [5] 吴曙霞. 氟喹诺酮类原料药前景与竞争分析. *精细与专用化学品*. 2005, 13: 1~3
- [6] 李眉,戚建军,郭惠元. 我国喹诺酮类抗感染药物的研究进展. *中国医药工业杂志*, 1999, 30: 280~287
- [7] Schellhorn C. Classification of quinolones by V Andiole. *Infection*, 1998, 26 (1): 64~68
- [8] 吕增春,邢玉斌. 喹诺酮类抗菌药的分类和进展, *国外医药·抗生素分册*, 2001, 22: 73~76
- [9] 姚斌,徐炳祥,葛建明. 喹诺酮类抗菌药物研究的新进展. *药实践杂志*. 1999, 17: 332~336
- [10] 日本化学疗法学会. Levofloxacin (DR23355)特集. *日本化学疗法学会杂志*, 1992, 40: 1
- [11] 屈凌波,刘艳,郭宗儒. 氟喹诺酮类药物构效关系的研究进展. *中国药物化学杂志*, 2001, 11: 241~244
- [12] Domagala JM, heifetz CL, Marland PH et al. 1-Substituted 7-[3-(ethylamino) methyl]-1-pyrrolidinyl]-6, 8-difluoro-1, 4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic Acids, *J Med Chem*, 1988, 31: 991~996
- [13] 朱龙观,俞庆森,陈凯先等. 喹诺酮类 N1 位定量构效关系研究. *物理化学学报*, 1995, 11: 925
- [14] 孙卫国,陈德钊,陈亚秋等. 循环子空间回归为喹诺酮 N1 位构效关系建模. *高等学校化学学报*, 1999, 20: 861~865
- [15] 李江波,戚春颖,林瑞森等. 1-取代-7-[3-(乙氨基)甲基]-1-吡咯基)喹诺酮 N1 位定量构效关系. *高等学校化学学*

- 报, 1999, 20: 1128~1134
- [16] 朱龙观, 俞庆森, 陈凯先等. 1-环丙基-5-取代-7-(4-甲基哌嗪基)-6,8-二氟-1,4-二氢-4-氧-3-喹啉羧酸定量构效关系的比较分子力场分析(CoMFA)研究. 中国药物化学杂志, 1995, 5: 187~192
- [17] Tang Y, Chen KX, Jiang HL et al. QSAR/QSTR of fluoroquinolones: an example of simultaneous analysis of multiple biological activities using neural network method. Eur J Med Chem, 1998, 33: 647~655
- [18] 乔本志, 段东红, 王秀兰. 喹诺酮类化合物及其类似物构效关系的分子力学和量子化学研究. 中国药物化学杂志, 1997, 7: 19~24
- [19] Ferguson J, Dawe R. Phototoxicity in quinolones: comparison of ciprofloxacin and grepafloxacin. J Antimicrob Chemother, 1997, 40: 93~98
- [20] Albin A. Photoinduced drug reactivity and its relation to the photostability of pharmaceutical preparations with photosensitivity effects. ISTISAN, 1998, 13: 23~29
- [21] Man I, Traynor NJ, Ferguson J. Recent developments in fluoroquinolone phototoxicity. Photoder-Photoimmunol Photomed, 1999, 15: 32~37
- [22] 周伟澄, 张秀平. 氟喹诺酮类药物研究的新进展. 中国医药工业杂志, 1997, 28: 75~81
- [23] 王晓天, 张建宾, 雷英杰. 喹诺酮类抗肿瘤药物的研究进展. 中国药学杂志, 2004, 39: 890~894
- [24] 郭宝林, 肖培根. 淫羊藿属的新分类群. 植物分类学报, 1993, 31: 194~196
- [25] 杨玉社, 嵇汝运, 陈凯先. 抗肿瘤喹诺酮的构效关系研究进展. 中国药学杂志, 1997, 32: 452~457
- [26] Chu DTW, Fernandes PB. Structure-activity relationships of the fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother, 1989, 33: 131~136
- [27] Kato J, Nishimura Y, Imamura R et al. New topoisomerase essential for chromosome segregation in *E. coli*. Cell, 1990, 63: 393~404
- [28] Wang T, Tanaka M, Sato K. Detection of *grlA* and *gyrA* mutations in 344 staphylococcus aureus strains. Antimicrob Agent Chemother, 1998, 42: 236~240
- [29] Everett MJ, Jin YF, Riui V et al. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40: 2380~2386
- [30] Belal F, Al-Majed AA, Al-Obaid AM. Methods of analysis of 4-quinolone antibacterials. Talanta, 1999, 50: 765~786
- [31] Carlucci G. Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. J Chromatogr A, 1998, 812: 343~367
- [32] Joshi S. HPLC separation of antibiotics present in formulated and unformulated samples. J Pharm Biomed Anal, 2002, 28: 795~809
- [33] Grellet J, Ba B, Saux MC. High-performance liquid chromatographic separation of fluoroquinolone enantiomers: a review. J Biochem Biophys Methods, 2002, 54: 221~233
- [34] Hernandez Arteseros JA, Barbosa J, Compano R. et al. Analysis of quinolone residues in edible animal products. J Chromatogr A, 2002, 945: 1~24
- [35] Niessen WMA. Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr A, 1998, 812: 53~57
- [36] Hernandez M, Borrull F, Calull M. Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. Trends in Analytical Chemistry, 2003, 22: 416~427
- [37] Neugebauer U, Szeghalmib A, Schmitta M et al. Vibrational spectroscopic characterization of fluoroquinolones. Spectrochimica Acta Part A, 2005, 61: 1505~1517
- [38] Du LM, Yang YQ, Wang QM. Spectrofluorometric determination of certain quinolone through charge transfer complex formation. Anal Chim Acta, 2004, 516: 237~243
- [39] Du LM, Xu QQ, Yuan JM. Fluorescence spectroscopy determination of fluoroquinolones by charge-transfer reaction. J Pharm Biomed Anal, 2003, 33: 693~698
- [40] 李眉. 氟喹诺酮类药物分析方法进展. 药物分析杂志, 1998, 18: 412~441

物质吸收紫外-可见光区 10~800nm 的电磁辐射,其原子或分子选择吸收某些适宜能量的光子后,其电子由基态跃迁至激发态,在相应波长位置出现吸收线或吸收带形成的光谱,称为紫外-可见吸收光谱。吸收光谱一般采用分光光度计进行测定,因此,称为分光光度法(spectrophotometry)。分光光度法是通过测定被测物质在特定波长处或一定波长范围内的吸光度或发光强度,对物质进行定性和定量分析的方法。分光光度法遵循吸收定律,可以实现对物质的定量测定,吸收定律描述了物质吸收辐射的定量关系,布格(Bouguer)和朗伯(Lambert)先后在 1729 年和 1760 年阐明了辐射强度和吸收层厚度的关系,1852 年比耳(Beer)提出辐射强度和吸收物浓度的关系,一般统称为朗伯-比耳定律(Lambert-Beer law),简称比耳定律。其定义为:单色光辐射穿过被测物质溶液时,在一定的浓度范围内,被测物质的吸收量与该物质的浓度和液层的厚度(光路长度)成正比,其关系式为

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = ECL \quad (2.1)$$

式中, A 为吸光度; T 为透光率; E 为吸收系数,采用的表示方法是 $E_{1\text{cm}}^{1\%}$,其物理意义为当溶液浓度为 1%(0.01g·ml⁻¹),液层厚度为 1cm 时的吸光度数值; C 为 100ml 溶液中所含待测物质的重量(按干燥品或无水物计算),单位 g; L 为液层的厚度,单位 cm。物质对光的选择性吸收波长,以及相应的吸收系数是该物质的物理常数。当已知某纯物质在一定条件下的吸收系数后,可用同样条件将该供试品配成溶液,测定其吸光度,即可由上式计算出供试品中该物质的含量。此定律应用于许多领域,适用于所有电磁辐射和所有吸收物质,广泛地应用于紫外-可见光谱区吸收测量。紫外和可见光区的光谱,涉及绝大多数具有共轭结构的有机化合物分子中电子跃迁的能量范围,因此分光光度法对于这些化合物的定性分析、定量分析和结构鉴定等具有重要意义。

分光光度法具有较高的灵敏度,测定的灵敏度一般可达 10⁻⁴~10⁻¹g·ml⁻¹,近年来,人们对分光光度法灵敏度的提高做了大量的研究,如寻找高灵敏度的显色剂,利用萃取、色谱、离子交换等富集手段及对仪器的改进,使灵敏度大为提高。精密度高是分光光度法的另一个突出特点。由于近代分光光度仪器的改进,其相对标准偏差可控制在 $n\%$ 甚至更小。分光光度法随着有机试剂的迅速发展,应用范围越来越广,多数元素的离子可通过适当显色剂显色而进行比色测定。有报道说,除了惰性气体元素以外,分光光度法几乎可以测定周期表中所有的元素。同时,在许多有机化合物及药物测定领域的分光光度法应用范围也在不断拓宽。虽然分光光度法不如有些分析方法的灵敏度高,但由于它具有精密度高、仪器简单、操作方便、方法快速可靠和应用范围广泛的特点,仍然在分析化学领域中占据了重

要的地位。

喹诺酮类药物分子结构共同的特点是都含有共轭体系的苯并杂环或并杂环骨架以及酮基、羧基、氨基以及杂原子等。喹诺酮类药物一般都有较强的紫外吸收,所以分光光度法是药典中测定喹诺酮类药物最常用的方法。近年来国内外采用导数、固相萃取、动力学、差示、流动注射、金属络合、离子缔合和荷移反应等多项技术对喹诺酮类药物的紫外-可见吸收光谱进行了研究,使灵敏度和选择性得到显著的提高。本章就近年来分光光度法在喹诺酮类药物分析方面的应用作一介绍和评述。

2.1 直接紫外分光光度法

由于喹诺酮类药物分子中具有较大的共轭结构和较多的生色基团,一般都有强的紫外吸收,因此可根据比耳定律实现对喹诺酮类药物的直接测定。对多种喹诺酮类药物的紫外吸收光谱性质研究表明,在水溶液中药物的特征吸收光谱均在300~380nm之间。第二个最大吸收带位于240~300nm,这一吸收带为芳香环的吸收。300~380nm之间吸收是由于 $n \rightarrow \pi^*$ [最高占有轨道(HOMO)-最低空轨道(LUMO)]电子转移产生的,这个吸收峰由两个次级吸收峰组成,这是由于喹诺酮类药物与水分子之间形成了分子间氢键和喹诺酮类药物分子上4位的酮基和3位的羧基之间形成分子内氢键所致^[1](图2-1),有关喹诺酮类药物的紫外分光光度法测定,中国2000年版和2005年版药典均有收录^[2]。直接紫外分光光度法大多采用对照品比较法,测定时,按要求分别配制待测药物和对照品溶液,对照品溶液中所含被测成分的量应为待测药物溶液中被测成分规定量的100%±10%,所用溶剂也应完全一致,在规定的波长处测定待测药物溶液和对照品溶液的吸光度后,按下式计算待测药物中被测溶液的浓度:

$$C_X = (A_X/A_R)C_R \quad (2.2)$$

式中 C_X 为待测药物的浓度; A_X 为待测药物的吸光度; A_R 为对照品溶液的吸光度; C_R 为对照品溶液的浓度。

这里我们以吡哌酸和诺氟沙星为例,首先介绍不同制剂(片剂、胶囊、软膏和乳膏)中喹诺酮类药物的分析方法^[2]。

吡哌酸片的测定:取本品20片,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于吡哌酸0.1g),置500ml容量瓶中,加0.04%氢氧化钠溶液适量,振摇,使吡哌酸溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液2ml,置100ml容量瓶中,加0.04%氢氧化钠溶液稀释至刻度,摇匀,置于1cm的石英池中,以0.4%氢氧化钠溶液为空白,在273nm的波长处测定吸

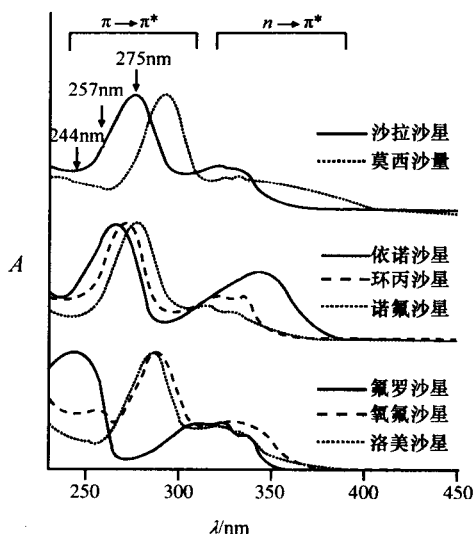


图2-1 喹诺酮类药物在水溶液中的紫外可见色谱图