

环丙沙星氯化反应的转化产物及机理研究*

周海云, 欧阳群香, 彭敏芝, 李 维
(中山大学测试中心, 广东 广州 510275)

摘 要: 环丙沙星在 pH = 6 的条件下与次氯酸钠反应, 利用 HPLC 检测反应产物的生成情况。氯化产物用固相萃取柱进行分离富集, 结合质谱和核磁共振分析技术确定了 5 种产物的化学结构, 同时对产物的质谱裂解规律进行研究, 解析了主要特征碎片离子的裂解途径。结果表明, 环丙沙星的氯化反应过程主要集中在喹诺酮环的 3 位 C 上脱羧氯代和 8 位 C 上氯代, 产生以含一氯、二氯为主的化合物, 除此以外, 对二氮己环在反应过程中发生了开环反应。

关键词: 环丙沙星; 氯化产物; 质谱; 结构表征

中图分类号: O621.25 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2011) 01-0079-06

Investigation on the Reaction of Ciprofloxacin and Chlorine

ZHOU Haiyun, OUYANG Qunxiang, PENG Minzhi, LI Wei

(Instrumental Analysis and Research Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: In the present study, the reaction of ciprofloxacin with free available chlorine was investigated. The reaction products were concentrated and isolated by solid phase column and analyzed by Mass Spectrometry and NMR. Five products were identified, in which monochloro- and dichloro-quinolones were the major compounds. Mass fragment pathways of identified products were also elucidated. Chlorination reaction center concentrated on the position C3 and C8 of the quinolone ring. Besides of chlorination, the piperazine ring on the position C7 of the quinolone ring was broken to form amine. The side chain alkylamine was further de-alkylation and hydroxylation.

Key words: ciprofloxacin; chlorination product; mass spectrometry; structure analysis

氯化消毒是一种常见的杀菌消毒方式, 不少研究发现有机化合物与有效氯反应后能生成一些对人类健康构成潜在隐患的化合物。喹诺酮类药物是一类广谱、使用量大的抗生素类药物, 喹诺酮环是这类药物的主要活性基团。为加强抗生素的药效, 通常在喹诺酮环上附加 F、对二氮己环, 衍变成环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星等药品。近年来, 地表水或饮用水源中检出喹诺酮类药物的报道引起广泛的关注^[1-7]。

抗生素在氯化消毒过程中能够衍生出一系列的化合物^[8-12]。朱舟等^[8]利用 SOS/umu 遗传毒性测试方法对诺氟沙星在不同氯化反应时间得到的反应

溶液进行毒性测试, 实验结果表明反应过程中生成了遗传毒性高于母体的中间产物。Dodd 等^[9]研究了环丙沙星和恩诺沙星的氯化反应动力学, 通过 LC/MS 得到的质谱信息推测化合物的结构、反应途径及反应产物的抑菌活性。产物的结构直接影响其遗传毒性, 因此很有必要对喹诺酮类药物在氯化消毒过程中可能产生的产物进行结构分析。本文选取喹诺酮类药物中使用量较大的广谱抗生素环丙沙星作为研究对象, 对该物质在氯化反应过程中产生的物质进行分离和结构鉴定, 根据所生成的产物推断反应途径。本文的试验结果能够更好地评价该类物质在氯化消毒过程中造成的潜在问题提供数据

* 收稿日期: 2010-07-20

基金项目: 教育部 CERS 资助项目; 广州地区分析测试基金专题资助项目

作者简介: 周海云 (1968 年生), 女, 高级工程师; E-mail: zhouhy@mail.sysu.edu.cn

参考。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

MAT 95 XP 高分辨质谱仪 (电子轰击 EI 电离源) (Thermo, USA); Varian Unity 400 MHz 核磁共振波谱仪 (Varian, USA); LC-20A 高效液相色谱仪 (岛津); 固相萃取装置及 Supelclean C₁₈ 固相萃取小柱 (500 mg/3ml) (Supelco, USA)。

环丙沙星 ($w \geq 98.0\%$) 购自 Fluka (Buchs, 瑞士); 甲醇、乙腈均为色谱纯 (Merck); 其它试剂为分析纯。试验用纯水为桶装水。

1.2 氯化反应试验

环丙沙星储备液配制: 准确称取 2.5 mg 于 25 mL 棕色容量瓶中, 加入 0.2 mol/L NaOH 溶液溶解, 用水定容至刻度, 储备液置于 4 °C 冰箱中保存。以磷酸缓冲液稀释储备液使环丙沙星的质量浓度为 1.0 mg/L, 以此为反应溶液。反应在接近自然水体 pH=6 的条件下进行。

移取 1 mL 环丙沙星反应液于一系列的 10 mL 具塞试管中, 分别加入 8 mL pH=6 的磷酸缓冲液, 然后加入一定量的 NaClO 溶液, 使药物的摩尔浓度与有效氯摩尔浓度的比值分别为 1:2、1:4、1:6、1:8、1:10, 加缓冲液至刻度。开始反应, 每隔一段时间取样 500 μ L, 以抗坏血酸作为反应终止剂终止反应, 样品进 HPLC 分析。

1.3 氯化产物 HPLC 分析条件

色谱柱: Shim-Pack VP-ODS (150 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 分析柱和 shim-pack GVP-ODS (50 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 保护柱; 流动相为甲醇和 0.5 g/L 磷酸溶液 (三乙胺调节 pH 值至 3.2), 体积比为 25:75, 流速 0.8 mL/min。采用二极管阵列检测器进行检测, 检测波长为 278 nm。

1.4 产物富集

将反应液环丙沙星的浓度放大到 100 mg/L 进行反应, 终止反应后的反应溶液经 C₁₈ 固相萃取小柱富集。上样前, 先依次以 2 mL 甲醇, 2 mL 水活化固相萃取小柱。样品流过 C₁₈ 固相萃取小柱后, 先用蒸馏水 2 mL 冲洗出柱中残留的无机盐, 再用 4 mL 乙酸酸化甲醇 (pH 3~5) 洗脱氯化产物。洗脱液先加入无水硫酸钠干燥去水, 过滤。滤液在室温下让溶剂自然挥发, 收集析出的固体物质, 采用质谱、NMR 等仪器对这些物质进行分析。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法测定环丙沙星的氯消毒副产物

图 1 表示氯化反应进行到 35 min 时用抗坏血酸作反应终止剂终止反应后, 反应液的 HPLC 谱图。谱图上出现在 7.70 min 处的色谱峰所对应的物质为环丙沙星, 保留时间分别在 6.45、9.11、10.57、11.30 min 处所对应的物质为氯化反应后生成的产物。

本文同时考察了有效氯浓度对生成产物的影响。当环丙沙星浓度为 0.1 mg/L, 调节有效氯浓度使反应体系中环丙沙星与有效氯的摩尔浓度比值分别为 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 和 1:10。每隔一段时间取样 500 μ L, 以抗坏血酸作为反应终止剂终止反应, 样品进 HPLC 分析, 从色谱峰的出峰数目和保留时间进行定性比较。结果显示, 在所测试的 NaClO 溶液浓度范围内 (0.6~3.0 mmol/L), 有效氯浓度越高, 反应速度越快, 但没有新的产物峰出现; 生成的产物在有效氯过量情况下会继续反应, 致使产物浓度降低。

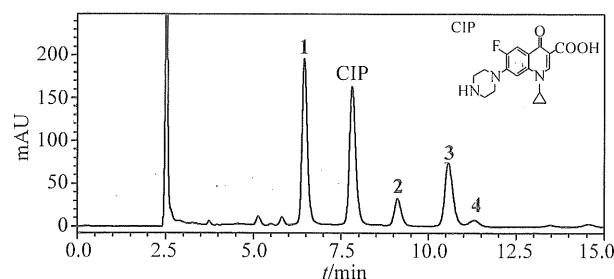


图 1 pH=6 的条件下, 环丙沙星 (CIP) 与 NaClO 反应 35 min 后反应液的 HPLC 色谱图
环丙沙星与有效氯的摩尔浓度比值为 1:6,
数字所示为主要氯化反应产物

Fig. 1 HPLC chromatogram of chlorination products for ciprofloxacin after reacted with NaClO at pH=6

2.2 环丙沙星氯化产物的鉴定

电喷雾 (\pm ESI) 质谱基本上不出现碎片离子, 样品在 +ESI 模式通常会出现 $[M+H]^+$ 准分子离子峰的信号, 在 -ESI 模式通常会出现 $[M-H]^-$ 准分子离子峰的信号, 从同位素峰的丰度比可以推断出含卤素的数量。因此, 直接进样的方式可以实现对样品的快速定性。实验中采用 SPE 法将反应产物提取至有机相后, 分别在 +/ - ESI 模式下进行反应产物混合物的质谱分析。+ESI 电离模式下, 样品出现 m/z 356、366、306、322 等信号;

-ESI 电离模式下出现 m/z 354、364、304、320 和 296 的信号。由此可以初步判断产物中可能存在相对分子质量分别为 355、365、305、321 和 297 的产物。

由于生成产物汽化温度较高, 未能在 GC/MS 上进行混合物的分离分析。为进一步确定化合物的分子量, 在电子轰击电离 (EI) 模式下, 将挥发溶剂后的反应产物混合物以直接进样方式 (进样杆程序升温从 45 °C 以 100 °C/min 的加热速率加热到 350 °C, 然后维持 5 min) 进行相对分子质量分析, 在不同的汽化温度和扫描时间出现了 m/z 355, 365, 305, 321 和 297 信息。结合 +/ - ESI 和 EI 质谱的检测结果, 最后确定了上述 5 个化合物的相对分子质量信息。

质谱信息只能提供化合物的相对分子质量、含 Cl 元素的数量, 对结构信息准确判断还需要 NMR 谱数据进行确证。因此, 为能得到进行 NMR 试验必须的样品量, 将试验放大, 中止反应后的样品液经 C_{18} 固相萃取柱富集分离得到 3 个较纯的固体化合物, 然后进行 1H NMR 分析, 进而推断它们的结构。对没能分离得到的化合物, 结合高分辨质谱仪的精确质量数和元素组成测定结果、电喷雾质谱 MSⁿ 特征碎片信息, 推导出化合物最可能的结构。

化合物 A: 白色固体。EI 质谱图显示其相对分子质量为 365, $[M] : [M + 2]$ 同位素峰丰度比接近 3:1, 表示其含 1 个 Cl。高分辨质谱测得其精确质量数为 365.092 3 (-4.0), 元素组成为 $C_{17}H_{17}O_3N_3Cl_1F$ 。从化合物的元素组成初步可以推断, 此化合物是在环丙沙星 ($C_{17}H_{18}O_3N_3F$) 结构上加上一个 Cl。

1H NMR 谱存在 9 组信息 (溶剂 DMSO): δ 1.16 (2H, m) 和 δ 1.33 (2H, m) 为环丙基仲碳上的 H, δ 7.61 (1H, m) 为环丙基叔碳上 H; δ 7.96 (1H, d) 为苯环上 5 位碳相连的 H, 由于 F 存在, 引起裂分生成二重峰; δ 8.69 (1H, s) 为 2 位碳相连的 H, δ 15.10 (1H, s) 为羧基上的 H; δ 3.31 (4H, m) 和 δ 3.49 (4H, m) 是对二氮己环仲碳上的氢, δ 9.46 (1H, br) 是对二氮己环仲胺上的氢。根据质谱和 NMR 信息, 推断此产物的结构是在环丙沙星结构不变的基础上, 啶诺酮环 C8 位上连 Cl, 产物结构如图 2 所示 A。

化合物 A 的 EI 质谱图、主要碎片离子的归属如图 2 所示。所形成的碎片主要是通过脱氯、脱羧、以及开环所产生。

化合物 B: 白色固体。EI 质谱图显示其相对

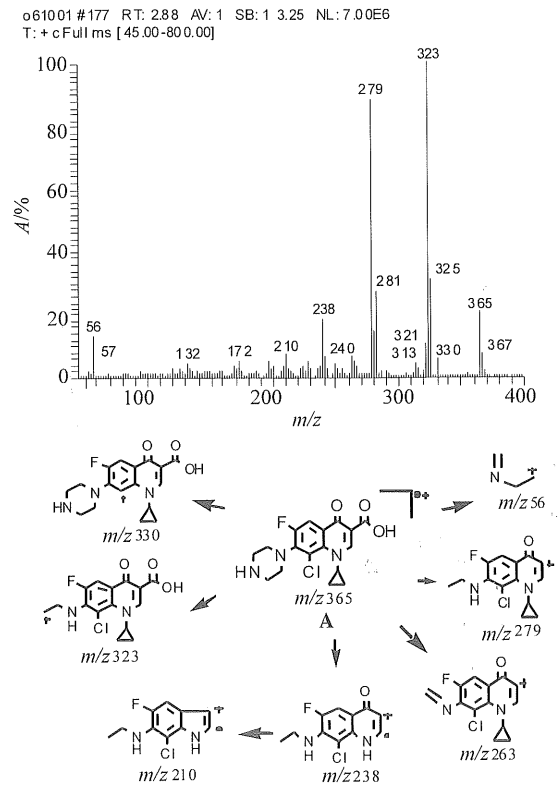


图 2 化合物 A 的 EI 质谱图及主要碎片离子的归属
Fig. 2 EI mass spectrum of compound A and proposed fragmentation pathway

分子质量为 355, $[M] : [M + 2] : [M + 4]$ 同位素峰丰度比例接近 9:6:1, 显示其含 2 个 Cl。高分辨质谱测得其精确质量数为 355.064 9 (-0.3), 元素组成为 $C_{16}H_{16}ON_3Cl_2F$ 。从化合物的元素组成初步可以推断, 此化合物是脱羧氯代产物。

1H NMR 谱存在 8 组信息 (溶剂 DMSO): δ 0.90 (2H, m) 和 δ 1.11 (2H, m) 为环丙基仲碳上的 H, δ 4.17 (1H, m) 为环丙基叔碳上 H; δ 7.84 (1H, d) 为苯环上 5 位碳相连的 H, 由于 F 存在, 引起裂分生成二重峰; δ 8.49 (1H, s) 为 2 位碳相连的 H, δ 3.26 (4H, m) 和 δ 3.49 (4H, m) 是对二氮己环上仲碳上的氢, δ 8.49 (1H, br) 是对二氮己环仲胺上的氢。根据质谱和 NMR 信息, 推断此产物的结构如图 3 所示 B。

化合物 B 的 EI 质谱图、主要碎片离子的归属如图 3 所示。碎片 m/z 56 和 m/z 57 是由对二氮己环裂解形成的; 从碎片离子 m/z 313 和 m/z 272 的同位素峰丰度比值判断, 这两个离子均含有 2 个 Cl, 因此, 这两个离子分别是通过对二氮己环裂解以及环丙基的丢失形成的, 由此也可以说明 Cl 是连接在啶诺酮环上。化合物 B 的 EI 质谱中的离子主要是通过脱氯、脱羧、以及开环所产生。

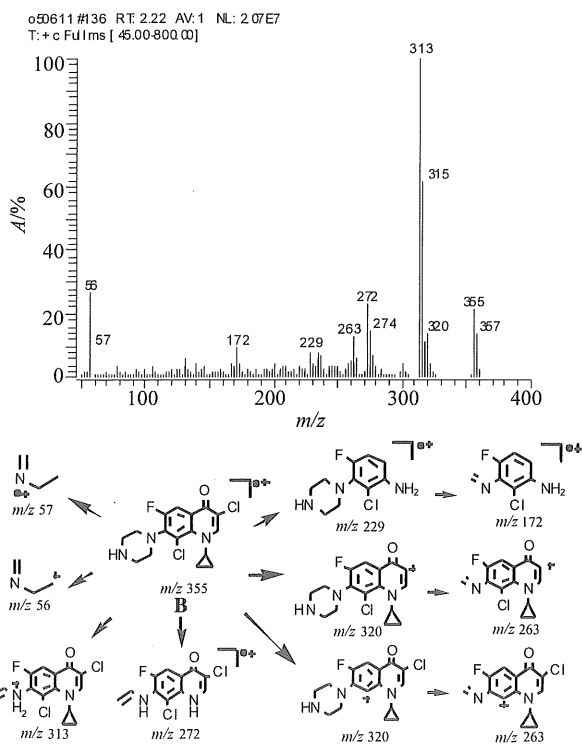


图 3 化合物 B 的 EI 质谱图及主要碎片离子的归属
Fig. 3 EI mass spectrum of compound B and proposed fragmentation pathway

化合物 C: 白色固体。EI 质谱图显示相对分子质量为 297 (ESI 为 296), $[M]:[M+2]$ 同位素峰丰度比值接近 3:1, 判断此化合物含 1 个 Cl。高分辨测得其精确质量数为 297.0197 (-0.6), 元素组成为 $C_{13}H_9O_4N_1ClF$ 。 1H NMR 谱存在 7 组信息 (溶剂 DMSO): δ 1.07 (2H, m) 和 δ 1.22 (2H, m) 为环丙基仲碳上的 H, δ 4.39 (1H, m) 为环丙基叔碳上 H; δ 7.78 (1H, d) 为苯环上 5 位碳相连的 H, 由于 F 存在, 引起裂分生成二重峰; δ 7.78 (1H, s) 为 2 位碳相连的 H, δ 12.00 (1H, br) 为 7 碳相连 -OH 上的 H, δ 14.70 (1H, br) 为羧基上的 H。根据上述信息可以推断此化合物结构为图 4 所示 C。化合物 C 的 EI 质谱图、主要碎片离子的归属如图 4 所示。此化合物的碎片离子较多, 高质量端的碎片离子主要是通过喹诺酮环上官能团丢失例如脱羧、环丙基丢失等过程形成。

化合物 D: 产物混合物直接进样得到的 +ESI 和 EI 质谱图中显示产物当中有一个相对分子质量为 321 的产物, 但没能分离纯化得到相关化合物进行 NMR 分析, 质谱数据显示此化合物的 $[M]:[M+2]$ 同位素峰丰度比例接近 3:1, 可以确定此化合物是为一氯产物。在 EI 模式下, 针对质量数 321 进行精确质量数测定和元素组成计算, 精确质量数为

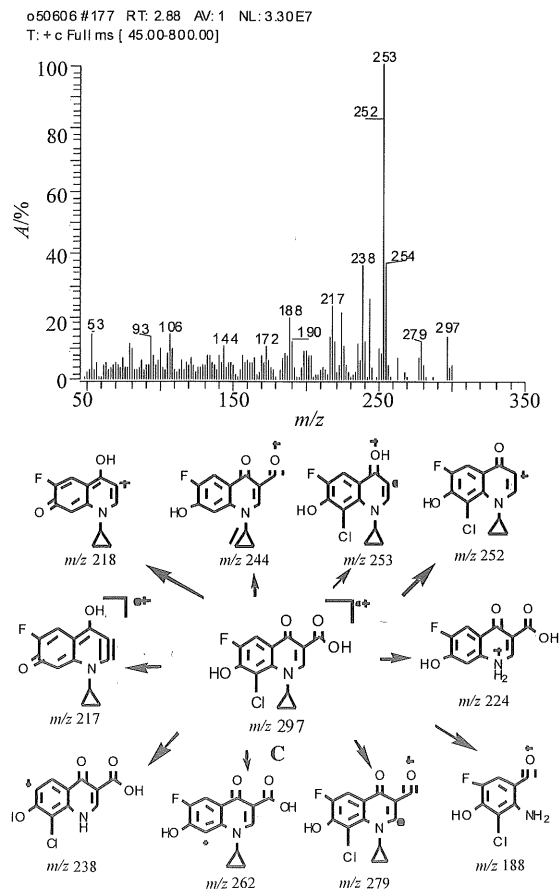


图 4 化合物 C 的 EI 质谱图及主要碎片离子的归属
Fig. 4 EI mass spectrum of compound C and proposed fragmentation pathway

321.1036 (-1.0), 元素组成为 $C_{16}H_{17}ON_3ClF$ 。此化合物产物的相对分子质量与反应物环丙沙星相差 10, 反应物失去 -COOH、加 -Cl, 两者的差值刚好为 10, 根据可能的反应机理, 认为该产物应该是反应物脱羧氯化物, 结构如图 5 所示 D。

因没能分离得到较纯的化合物 D, 其 EI 质谱图碎片离子的归属较难解释。因此, 在 +ESI 模式下, 针对此化合物产生的 $[M+H]^+$ 离子 m/z 322 进行 MS^n 分析, 在 30%~40% 的能量下, m/z 322 裂解产生 m/z 302, 279, 261, 239, 239; 然后再对 m/z 279 进行了 MS^3 轰击, 产生 m/z 237, 238, 261 的碎片。由裂解途径可以看出, 对二氮己环裂解、环丙基丢失、F 丢失是主要的裂解途径 (如图 6 所示)。

化合物 E: 产物混合物直接进样得到的 +ESI 和 EI 质谱图中显示产物当中有一个相对分子质量为 305 的产物。EI 质谱图显示相对分子质量为 305 (+ESI 为 306), 从 $[M]:[M+2]$ 同位素峰丰度比判断, 此化合物不含 Cl。高分辨质谱测得其精确

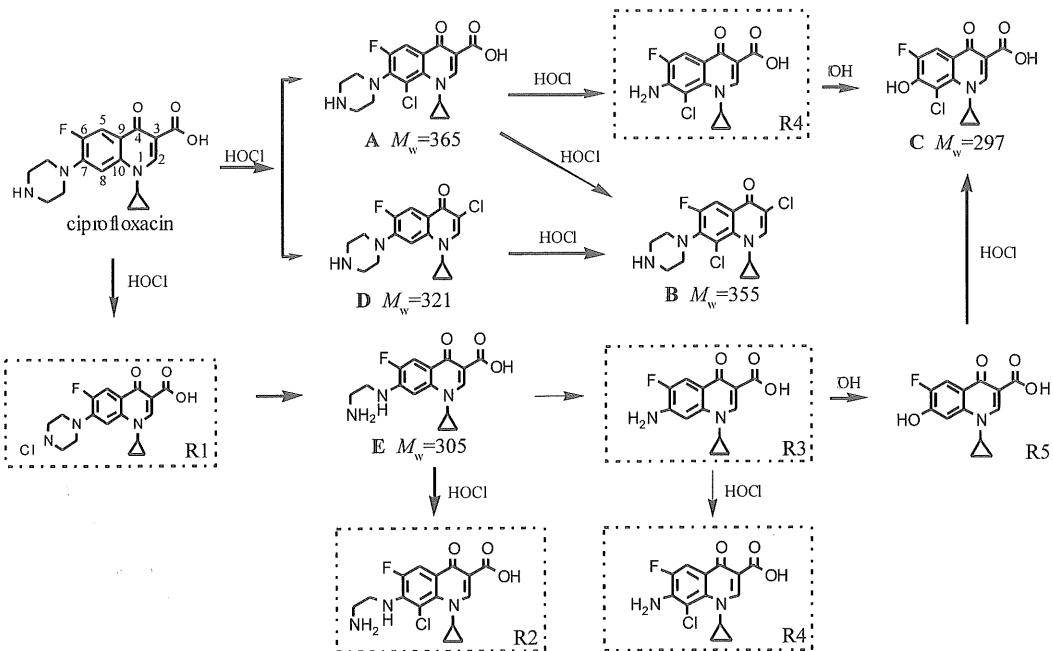


图 5 可能的反应途径

Fig. 5 Proposed reaction pathways for ciprofloxacin with HOCl

虚线框架内的化合物为 Dodd 等^[9]所报道的产物

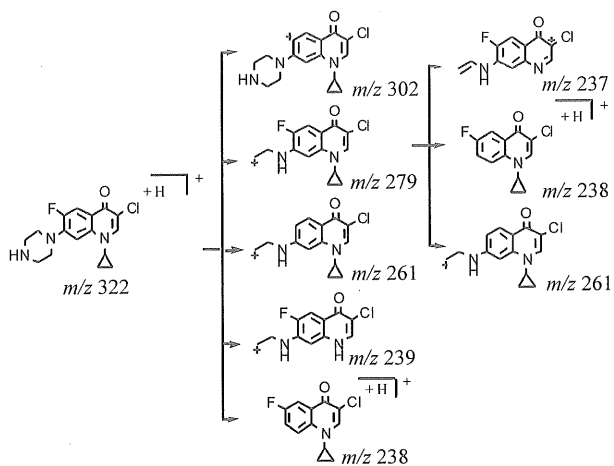


图 6 化合物 D 的 +ESI/MSⁿ 裂解途径及碎片归属

Fig. 6 +ESI/MSⁿ fragment pathway of compound D

质量数为 305.117 2 (0.5)，元素组成为 C₁₅H₁₆O₃N₃F，但没能分离得到较纯化合物进行 NMR 分析。在 Dodd 等^[8]的研究中同样得到相对分子质量为 305 的产物信息，他们通过 +ESI 二级质谱得到的碎片信息推断出的化合物结构的元素组成和我们上述的检测结构吻合。在反应物环丙沙星结构基础上，我们也认为此化合物结构为对二氮己环开环化合物，如图 5 中所示 E。

此化合物在 -ESI 模式下进行 MSⁿ 分析得到的碎片信息较多。化合物 E 在 -ESI 出现 [M - H]⁻

信号 m/z 304。在 30% ~ 40% 的碰撞能量下， m/z 304 裂解产生 m/z 264, 260, 220；然后再对 m/z 260 进行了 MS³ 轰击，产生 m/z 220, 191 的碎片。由裂解途径可以看出，环丙基丢失、羧基丢失是主要的裂解途径（如图 7 所示）。

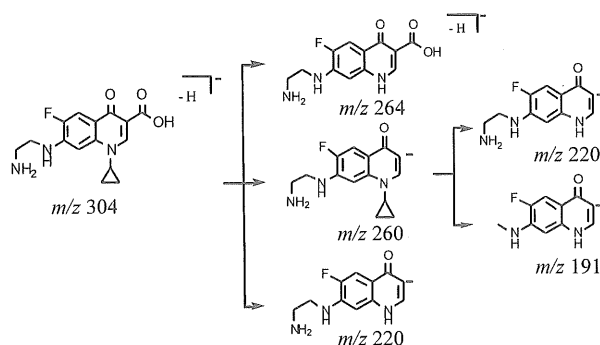


图 7 化合物 E 的 -ESI/MSⁿ 裂解途径及碎片归属

Fig. 7 -ESI/MSⁿ fragment pathway of compound E

2.3 从产物结构探讨氯化反应机理

从试验得到的产物结构看，喹诺酮环 C3 位和 C8 位上容易发生氯代反应。氯化过程中，喹诺酮环 C3 位上的羧基可以脱去，并被氯取代，脱羧氯代后的产物 (D) 可以进一步在喹诺酮环 C8 位上氯化生成形成二氯产物 (B)。化合物 A 的检出，说明 C3 位和 C8 位上发生的氯代反应同时发生，

形成的一氯产物同样可以进一步发生脱羧氯代形成二氯产物(B)。除此以外,对二氮己环在反应过程发生了开环反应,形成不含氯的开环产物(E)。

Dodd等^[9]依据LC/MS图谱推导出产物的结构,进而推测了环丙沙星的氯化反应机理。首先,他们认为HOCl与对二氮己环上仲胺的氮原子上发生氯原子取代反应形成一种不稳定的氯胺中间产物R1,然后通过对二氮己环的开裂形成产物(E);另一途径则是直接在喹诺酮环8位碳上发生氯代反应。在他们的试验中除了检出与本试验相同的化合物A、E以外,还推测出了另外3个可能的产物,分别为:C8位氯代开环化合物(R2)、对二氮己环为氨基取代(R3)及其C8位氯代的产物(R4)。在他们的试验中并没有检测出脱羧氯代后相关的化合物,而在我们的试验中则分离得到多个脱羧氯代的产物。

在Dodd等^[9]的试验中,得到一个7位为-NH₂的化合物R3,而在本试验中,分离得到一个相似的、氨基为羟基所取代的产物C。我们认为,对二氮己环开裂后形成烷基胺,烷基胺发生脱烷基作用形成氨基化合物(R3),在·OH攻击下,喹诺酮环上的C7位上氨基被羟基取代,生成化合物R5。Torrent等^[13]在研究阿特拉津氯化反应产物时有报道发生类似的现象。这个反应有可能是比较迅速的,或者R3、R5的生成量是比较少的,因此在本试验中未能检测到。综合本试验结果以及前人的研究报告,环丙沙星氯化反应途径如图5所示。

参考文献:

- [1] XU H H, ZHANG G, ZOU S C, et al. Determination of selected antibiotics in the Victoria Harbour and the Pearl River, South China using high performance liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Environmental Pollution*, 2007, 145(3): 672 - 679.
- [2] 叶计朋,邹世春,张干,等. 典型抗生素类药物在珠江三角洲水体中的污染特征[J]. *生态环境*, 2007, 16(2): 384 - 388.
- [3] 姜蕾,陈书怡,杨蓉,等. 长江三角洲地区典型废水中抗生素的初步分析[J]. *环境化学*, 2008, 27(3): 371 - 374.
- [4] YE Z Q, WEINBERG H S, MEYER M T. Trace analysis of trimethoprim and sulfonamide, macrolide, quinolone, and tetracycline antibiotics in chlorinated drinking water using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(3): 1135 - 1144.
- [5] PENG X, TAN J, TANG C, et al. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in China [J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2008, 27(1): 73 - 79.
- [6] MARTINEZ J L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants [J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(11): 2893 - 2902.
- [7] WATKINSON A J, MURBY E J, KOLPIN D W, et al. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: from wastewater to drinking water [J]. *Science of the Total Environment*, 2009, 407(8): 2711 - 2723.
- [8] 朱舟,胡建英. 诺氟沙星的氯化反应及其遗传毒性的变化[J]. *环境化学*, 2008, 27(6): 762 - 765.
- [9] DODD M C, SHAH A D, GUNTEN U V, et al. Interactions of fluoroquinolone antibacterial agents with aqueous chlorines: reactions kinetics, mechanisms, and transformation pathways [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39: 7065 - 7076.
- [10] DODD M C, HUANG C H. Transformation of the antibacterial agent sulfamethoxazole in reaction with chlorine: kinetics, mechanisms, and pathways [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38: 5607 - 5615.
- [11] DODD C C, HUANG C H. Aqueous chlorination of the antibacterial agent trimethoprim: Reaction kinetics and pathways [J]. *Water Research*, 2007, 41(3): 647 - 655.
- [12] FISS E M, RULE K L, VIKESLAND P J. Formation of chloroform and other chlorinated byproducts by chlorination of triclosan - containing antibacterial products [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(7): 2387 - 2394.
- [13] TORRENTS A, ANDERSON B G, BILBOULIAN S, et al. Atrazine photolysis: mechanistic investigations of direct and nitrate-mediated hydroxy radical processes and the influence of dissolved organic carbon from the Chesapeake Bay [J]. *Environmental Science & Technology*, 1997, 31: 1476 - 1482.