

氧氟沙星甲基化物的核磁共振波谱研究

高秀香¹, 齐 剑¹, 赵梅仙², 涂光中³, 安东各³, 徐怡庄^{1*}, 吴瑾光¹

1. 北京大学化学与分子工程学院稀土材料化学及应用国家重点实验室, 北京 100871
2. 北京化工大学理学院应用化学系, 北京 100029
3. 北京微量化学研究所, 北京 100091

摘要 结合¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, HSQC, HMBC 谱和碳氟偶合裂分行为, 对氧氟沙星 (ofloxacin, OFL) 哌嗪部分的甲基化产物-甲基氧氟沙星 (methyl-ofloxacin, Me-OFL) 的结构进行归属, 并探讨了 Me-OFL 在酸性及碱性溶液中的¹H 和¹³C 谱的变化。碱性溶液中, 5H 的化学位移较酸性向高场移动 1.02, 推测此变化与形成 C—H...O 弱氢键有关。6C、13C、羰基碳 7C 和羧基碳 15C 分别向低场位移 12.04, 7.46, 4.33, 2.88 ppm, 推测此变化与羧基和羧酸根的转变有关。另外, 还比较了 OFL 哌嗪环 4'N 上质子化产物与烷基化产物的正电荷分布。当哌嗪环质子化形成季铵盐时, 正电荷分布在氮原子上; 当其烷基化形成季铵盐时, 正电荷分布在氮原子上。

关键词 喹诺酮; 甲基氧氟沙星; 核磁共振; 哌嗪环

中图分类号: O657.6 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-0593(2008)06-1420-06

引言

自 1962 年人工合成第一个喹诺酮类抗生素萘啶酸以来, 通过对分子结构的逐步改进, 尤其是氟原子和哌嗪基的引入, 大大提高了该类药物对革兰阴性菌的抗菌活性和水溶性^[1-3]。其中氧氟沙星 (OFL) 由于抗菌谱广, 在临床上得到广泛使用。OFL 分子中既有羧基又有氨基, 受所处介质环境的影响, 其酸碱性质以及在体内的抗菌活性也发生不同程度的变化^[4,6]。文献曾报道有关 OFL 理化性质的研究^[7-13], 我们曾利用紫外和荧光光谱^[14]研究了 OFL 在不同 pH 环境中的结构形态及其变化, 发现结构形态、荧光性质与溶液 pH 密切相关。为了更好地认识 OFL 的分子结构及特性, 本文利用碘甲烷对 OFL 的哌嗪环进行甲基化, 使 4'N 位加上一个甲基得到 Me-OFL, 利用 NMR 技术对该产物在酸碱溶液中的结构进行了归属。结合前期 OFL 的 NMR 行为结果, 比较了哌嗪环 4'N 上质子化产物与烷基化产物的正电荷分布, 得到许多有益的信息。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

收稿日期: 2007-02-06, 修订日期: 2007-05-12

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30371604, 50673005) 资助

作者简介: 高秀香, 女, 1963 年生, 北京大学化学与分子工程学院博士后

e-mail: xiuxiangao@sina.com

* 通讯联系人

Bruker AM 300 型和 DRX 500 型超导核磁共振波谱仪; 重水 (氘含量 99.8%) ; 氘代盐酸 (DCl 含量 20%) ; 氢氧化钠和碘甲烷为分析纯, 以上皆为北京化工厂产品。氧氟沙星 (昆山制药厂, 纯度 > 99%) 。

1.2 实验方法

称取 8 或 30 mg Me-OFL 和 20 mg NaOH 溶于 0.5 mL 重水中 (溶液 pH > 14) 或称取 8 或 30 mg Me-OFL 溶于 0.5 mL DCl 中 (溶液 pH < 1), 分别用于碱性溶液及酸性溶液的 NMR 谱测定。¹H, ¹³C, DEPT, COSY, HSQC, HMBC 谱采用 Bruker AM 300 和 DRX 500 测定。测试结果均以二氧六环毛细管 ($\eta = 3.7$, $c = 67.8$) 定标。脉冲序列采用谱仪中的标准脉冲程序。

甲基氧氟沙星按文献 [15] 的方法合成 (见图 1)。称取 3.61 g 氧氟沙星 (10 mmol) 和 0.40 g NaOH (10 mmol), 加入 40 mL 乙醇, 微热搅拌使氧氟沙星溶解。再滴加 1.42 g 碘甲

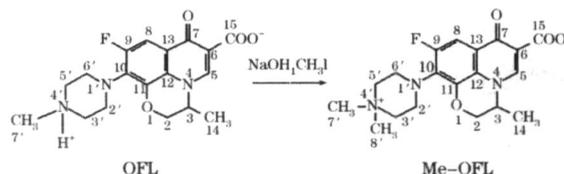


Fig 1 Synthesis of Me-OFL

烷的乙醇溶液, 搅拌 10 h, 生成大量白色沉淀, 过滤。所得固体加入 50 mL 乙醇搅拌, 过滤。得到的固体再用 10 mL 水洗, 过滤。干燥, 得 1.76 g 产品, 产率 47%。利用高分辨质谱分析拟合产物的分子式为 $C_{19}H_{23}N_3O_4F$, 分子量为 376.17, 表明产物为 Me-OFL。

2 结果和讨论

2.1 酸性及碱性溶液中 Me-OFL 的 1H 和 ^{13}C NMR 谱峰归属

Me-OFL 碱性及酸性溶液中的 1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC, HMBC 谱如图 2, 指认思路如下: 按 C 的杂化类型 (sp^3 , sp^2) 将所有 H 和 C 分类, 以 HSQC, HMBC 为桥梁,

综合利用 1H , ^{13}C , DEPT 及碳氟偶合裂分为完成指认。

以碱性溶液为例进行指认(见表 1)。

(1) sp^3 碳及与之相连氢的指认。Me-OFL 的 9 个 sp^3 碳皆有与之相连的 H 原子(按 C 上 H 数分成 CH_3 组, CH 组和 CH_2 组)。14C, 7'C, 8'C 属于 CH_3 组。14C 与咪唑环 3C 相连。7'C, 8'C 与哌嗪环 4'N 相连。由谱峰信息可判断 $\delta_{H, 0.91}(d, 3H)$ 为 14H, $\delta_{H, 2.77}(s, 6H)$ 为 7', 8'H。由 HSQC 可知 $\delta_{C, 17.26}$ 为 14C, $\delta_{C, 51.70}$ 为 7', 8'C。上述指认与定量碳谱中 $\delta_{C, 17.26}/\delta_{C, 51.70}$ 的面积比为 1/2 及 DEPT 谱一致; Me-OFL 仅有一个 CH, 为 3C。DEPT 谱上只有 $\delta_{C, 54.44}$ 符合要求, 定为 3C。由 HSQC 谱把 $\delta_{H, 4.03}(m, 1H)$ 定为 3H。COSY 谱和 HMBC 谱支持上述指认。

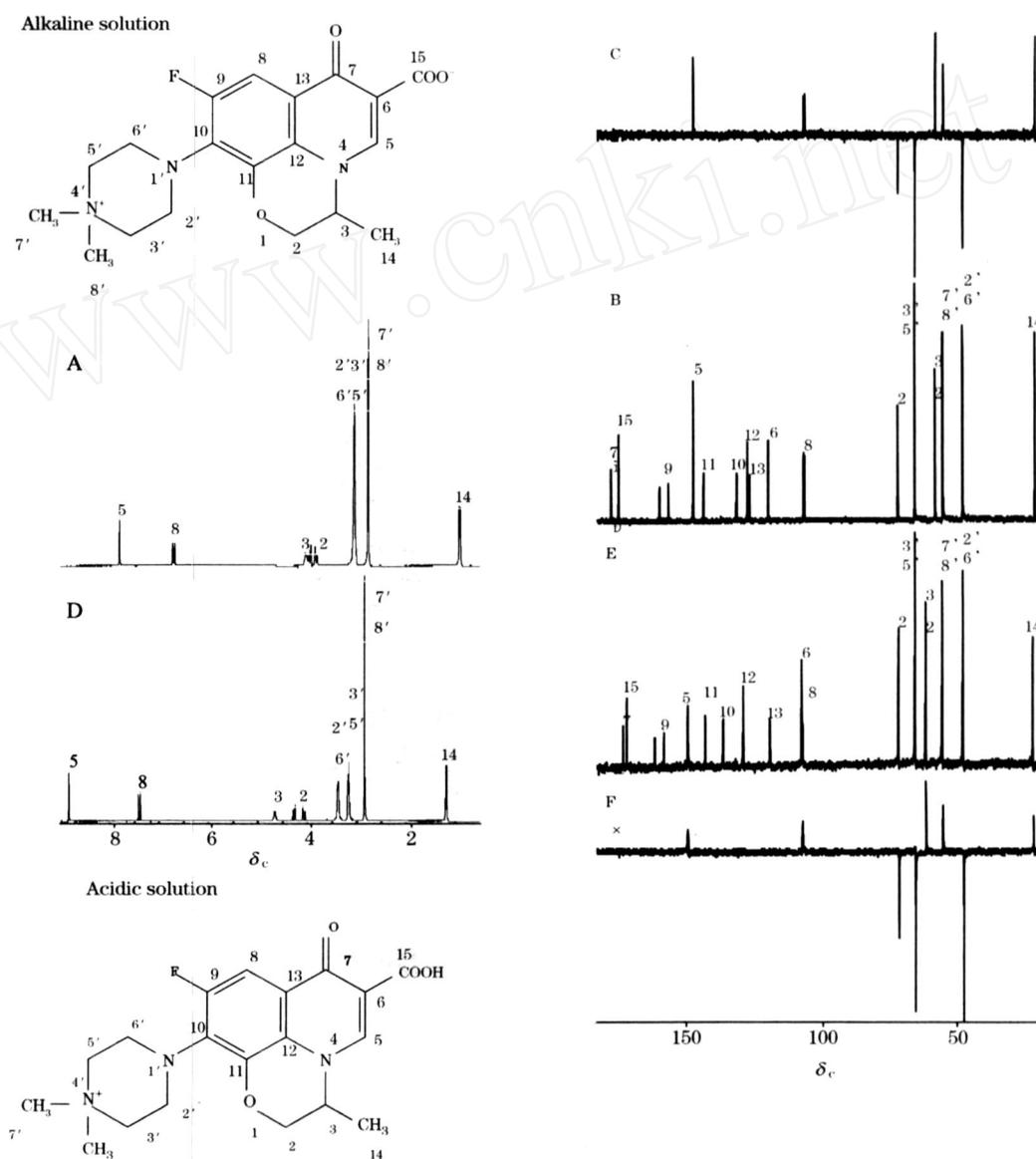


Fig 2 NMR spectra of Me-OFL in alkaline and acidic solutions

A: 1H NMR spectrum of Me-OFL in alkaline solution; B: ^{13}C NMR spectrum of Me-OFL in alkaline solution; C: DEPT spectrum of Me-OFL in alkaline solution; D: 1H NMR spectrum of Me-OFL in acidic solution; E: ^{13}C NMR spectrum of Me-OFL in acidic solution; F: DEPT spectrum of Me-OFL in acidic solution

Table 1 Assignment of Me-OFL ^1H , ^{13}C NMR spectrum in alkaline solution

Position	HSQC		COSY	HMBC
	H	C		
2	3.88m, 2H	68.54		
3	4.03m, 1H	54.44	3H-14H	3C-5, 14H
5	7.81s, 1H	144.66		
6		116.49		6C-5H
7		174.78	3.0	7C-5, 8H
8	6.71d, 1H	103.40	23.3	
9		155.02	243.6	9C-8H
10		128.28	15.2	10C-8H
11		140.48	7.1	11C-2H
12		124.33		12C-5, 8H
13		123.52	8.1	
14	0.91d, 3H	17.26	14H-3H	
15		171.92		15C-5H
2',6'	3.05s, 4H	44.21		
3',5'	3.05s, 4H	62.14		3',5'C-7',8'H
7',8'	2.77s, 6H	51.70		

Me-OFL 有 5 个 CH_2 , 为咪唑环 2C 和哌嗪环上 2',3',5',6' C。由 DEPT 谱 $c_{44.21}$, $c_{62.14}$, $c_{68.54}$ 为 CH_2 , 定量碳谱结果显示其碳数比例为 2:2:1, 由此判定 $c_{68.54}$ 为 2C, 由 HSQC 谱判定 $_{\text{H}3.83, 3.95}(\text{m}, 2\text{H})$ 为 2H, 则 $c_{44.21}$ 和 $c_{62.14}$ 对应的 $_{\text{H}3.05}(\text{s}, 8\text{H})$ 为 3',5',2',6' H。其中, 由于受邻近 O 和 N 原子的去屏蔽效应, 使得 2H_e (平伏) 处于较低场, 2H_a (直立) 处于较高场, 故 $_{\text{H}3.83}$ 定为 2H_a, $_{\text{H}3.95}$ 定为 2H_e^[16]。哌嗪环上 2' C 与 6' C 磁等价, 3' C 与 5' C 亦磁等价。由于 2' C 与 3' C 连结在一起, 构成 AA'BB' 自旋体系, 因此我们将二者结合起来讨论。如上所述 DEPT 谱上的 3 个负峰分别对应三组 CH_2 , 其中一个已经得到指认, 剩下的 $c_{44.21}$ 和 $c_{62.14}$ 分别对应 2',6' C 和 3',5' C。HMBC 谱中显示 7',8' H 与 $c_{62.14}$ 存在远程相关, 却不与 $c_{44.21}$ 远程相关, 故 $c_{62.14}$ 为 3',5' C, $c_{44.21}$ 为 2',6' C。

(2) sp^2 碳及与之相连氢的指认。Me-OFL 有 10 个 sp^2 碳, 可分成 CH 组和季碳组。

5C 和 8C 属 CH 组, 其化学位移皆大于 6。其中 8H 受 9F 的裂分为双峰, 将 $_{\text{H}6.71}(\text{d}, 1\text{H})$ 归为 8H。余下的 $_{\text{H}7.81}(\text{s}, 1\text{H})$ 为 5H。由 HSQC 将 $c_{103.45}(J=23.3\text{ Hz})$ 归为 8C, $c_{144.66}$ 归为 5C。

季碳组有 8 个碳原子 (6, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15C), 无法借助 DEPT 和 HSQC 谱完成指认。但是 9C 上连接有一个氟原子, 在碳氢去耦的 ^{13}C 谱上, ^{19}F 对 ^{13}C 核的耦合裂分清晰可见。根据碳原子的氟偶合裂分幅度 (J_{FC} 耦合常数) 随着 C, F 间化学键数目的增加而递减^[17] 的规律, 可利用其完成指认。羰基碳和羧基碳的化学位移在 160 以上。 $c_{174.78}(J=3.0\text{ Hz})$ 受 F 的远程耦合存在微弱裂分, 且 HMBC 谱上有与 5H, 8H 的三键远程相关峰, 归为 7C; $c_{171.92}$ 不受 F 原子偶合, 且仅与 5H 有远程相关, 归为羧基 15C。9C 与 F 直接相连, 受 F 裂分, 其 J_{FC} 在 150~350 Hz 之间, 而且由于 F 的吸电子效应, 其化学位移应在低场, 而定量碳谱上

$c_{153.41}$, $c_{156.65}$ 两峰与羧基 15C ($c_{171.92}$) 峰面积比为 0.5:0.5:1, 可知 $c_{153.41}$ 和 $c_{156.65}$ 为裂分峰, $c_{155.02}$ 耦合常数为 243.6 Hz, 符合 J_{FC} 的特征, 另外 $c_{153.41}$, $c_{156.65}$ 与 8H 远程相关, 归为 9C。10C 与 F 原子相隔 2 个化学键, J_{FC} 约在 14.7~58 Hz 范围内, 受相邻 1' N 电负性的影响其谱峰应在较低场。 $c_{128.28}(J=15.2\text{ Hz})$ 与上述特征最接近, 且与 8H 远程相关, 归为 10C。11C 或 13C 和 F 相隔 3 个化学键, J_{FC} 约为 4~20 Hz, 双峰 $c_{140.48}(J=7.1\text{ Hz})$ 和 $c_{123.52}(J=8.1\text{ Hz})$ 符合以上特征。其中, 11C 受相邻 O 原子电负性的影响, 化学位移应在低场, 故前者归为 11C, 后者定为 13C。另外, HMBC 谱中 $c_{140.48}$ 与 2H 间存在交叉峰; $c_{123.52}$ 与 2H 无交叉峰, 支持上述指认。剩下的 $c_{124.33}$ 和 $c_{116.49}$ 被指认为 12C 和 6C。因诱导效应, 与 4N 相连的 12C 应在低场, 故 $c_{124.33}$ 定为 12C, $c_{116.49}$ 定为 6C。HMBC 谱中 $c_{124.33}$ 与 8H 存在交叉峰, $c_{116.49}$ 与 8H 间无交叉峰, 支持上述指认。酸性溶液中 Me-OFL 化学位移指认思路与碱性溶液类似, 结果详见表 2。

2.2 酸碱性溶液 Me-OFL 的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移的比较

由于 Me-OFL 的质子化状态不同, 可能导致不同的 NMR 行为, 因此对其酸碱条件下的 Me-OFL 的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移进行比较研究。表 3 为酸碱溶液 Me-OFL 的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移比较结果, 其中数值是碱性条件减去酸性条件下得到的值。由表 3 可知, 对于 H 化学位移而言, 变化最大的是 5H, 酸性条件下向低场位移 1.02, 推测此变化与羧基有关。酸性溶液中羧基与 7 位羰基形成分子内氢键, 使羧基与 Me-OFL 母环处于同一平面, 也使羧基的双键氧与 5H 在空间上接近, 可能形成 C—H...O=C 弱氢键, 从而使 5H 移向低场。碱性溶液中羧基变为羧酸根, 分子内氢键被破坏, 羧酸根失去了氢键束缚, 转出 Me-OFL 母环所在的共轭面, 造成羧酸根上的氧与 5H 在空间上距离变远, 弱氢键的影响减弱, 从而使 5H 移向高场。

Table 2 Assignment of Me-OFL ¹H, ¹³C NMR spectrum in acidic solution

Position	HSQC		COSY	HMBC
	H	C		
2	4.17m, 2H	68.42		
3	4.65m, 1H	58.27	3H-14H	3C-5, 14H
5	8.83s, 1H	146.58		
6		104.45		6C-5H
7		170.45	5.1	7C-5,8H
8	7.40d, 1H	104.15	24.3	
9		156.92	249.7	9C-8H
10		133.38	14.1	10C-8H
11		140.06	7.1	11C-2H
12		126.02		12C-5,8H
13		116.06	12.1	
14	1.08d, 3H	18.14	14H-3H	14H-3H
15		169.04		15C-5H
2',6'	3.37m, 4H	44.32		
3',5'	3.16m, 4H	62.26		3',5' C-7',8'H
7',8'	2.84s, 6H	52.10		7',8' C-3',5'H

Table 3 Comparison of Me-OFL ¹H, ¹³C, J_{FC} data between acidic and alkaline solution

Position	* J _{FC} / Hz	H	C	Position	* J _{FC} / Hz	H	C
2		-0.29	0.12	11	0		0.42
3		-0.62	-3.83	12			-1.69
5		-1.02	-1.92	13	-4.03		7.46
6			12.04	14		-0.17	-0.88
7	-2.1		4.33	15			2.88
8	-1.0	-0.69	-0.75	2',6'		-0.32	-0.11
9	-6.1		-1.90	3',5'		-0.11	-0.12
10	1.1	-	5.10	7',8'		-0.07	-0.40

* =J_{FC} constant or chemical shift in alkaline solution minus that in acidic solution

对于¹³C 化学位移而言,变化最明显的是与羧基直接相连的6C,在碱性溶液中向低场位移12.04,其次是相邻的¹³C,向低场位移7.46,羧基碳7C和羧基碳15C向低场分别位移4.33和2.88。上述变化与羧基和羧酸根的转变有关,当羧基变为羧酸根时,与羧基相连的芳香碳可向低场位移8左右^[18]。另外可解释为酸性溶液中Me-OFL的羧基与7位羧基形成氢键,而碱性条件下,羧基变为羧酸根,内氢键被破坏,由此引起6C,7C,¹³C和羧基的电子分布改变,使¹³C谱峰发生位移。

对于偶合常数J_{FC}而言,变化最大的是9C的J_{FC},从碱性的J_{FC}=243.6变为酸性的J_{FC}=249.7,¹³C的³J_{FC}有明显变化,从酸性溶液³J_{FC}=12.1变为碱性溶液³J_{FC}=8.1,这与氧氟沙星NMR行为相同,推测上述变化与7C周围电子分布的变化有关。

与OFL不同,在酸碱条件下Me-OFL的4'N上的正电荷不发生变化,从而导致4'N原子周围甲基(7',8')和亚甲基(3',5')的化学位移几乎不发生变化。

2.3 OFL和Me-OFL的哌嗪环¹H和¹³C化学位移的比较

在碱性条件下,OFL的4'N以三级胺的形式存在,它可

以通过两种方式转变为季胺盐:(1)OFL与盐酸反应形成质子化产物盐酸盐;(2)OFL与碘甲烷反应形成本文的目标化合物(Me-OFL)季胺盐。为了探讨不同方式形成季胺盐所导致的相关原子电荷分布的变化,我们分析OFL及Me-OFL的质子化过程,结合先前的工作,研究了OFL盐酸盐和Me-OFL酸性溶液中的4'N原子周围的C和H的化学位移相对于碱性条件下OFL相应原子的变化,结果如表4所示。为了消除溶液酸碱度对核磁共振行为的影响,两种季胺盐的NMR谱皆在DCI中测定。

从H原子化学位移上看(2',3',5',6',7',8'H),酸性溶液的OFL和Me-OFL较碱性OFL均向低场位移,而且变化幅度基本一致。表明因4'N形成季胺盐引入正电荷,使周围的H产生不同程度的去屏蔽效应。但是,酸性溶液Me-OFL和OFL盐酸盐的C化学位移在形成季胺盐前后表现出完全不同的行为。酸性溶液的Me-OFL中4'N原子周围C的化学位移相对于碱性条件下的OFL表现出非常明显的变化,其中与4'N原子直接相连的3',5',7',8'C的化学位移向低场移动6.66~7.32,而与4'N原子相隔一个碳原子的2',6'C则向高场移动大约为6.04。但对OFL盐酸盐而言,

Table 4 Comparison of ^1H , ^{13}C data between Me-OFL and OFL in acidic solution and OFL in alkaline

Position	^1H	^{13}C	Position	^1H	^{13}C
2	0.21	0.20	11	-0.33	0
3	0.51	0.53	12	1.23	1.61
5	0.90	0.87	13	-7.25	-7.0
6		-12.18	14	0.06	0.15
7		-4.93	15		-3.47
8	0.24	-0.06	2,6	0.57	0.50
9		1.13	3,5	1.03	0.92
10		2.67	7,8	0.99	0.67

* δ_1 = Chemical shift of Me-OFL in acidic solution minus that of OFL in alkaline solution

** δ_1 = Chemical shift of OFL in acidic solution minus that of OFL in alkaline solution

2',3',5',6',7' ^{13}C 皆向高场移动, 移动幅度在 2.39 以内。

我们推测, 造成酸性溶液的 Me-OFL 和 OFL 盐酸盐中 4'N 周围 C 化学位移行为不同的原因是在上述两种季胺盐中正电荷的分布方式不同: 即对 OFL 盐酸盐而言, 正电荷集中在与 4'N 原子直接相连的氢(氘)离子上; 而在酸性溶液的 Me-OFL 中, 正电荷集中在 4'N 原子上。这一假设可以解释 Me-OFL 和 OFL 盐酸盐中 C 和 H 的 NMR 行为: 对于酸性溶液的 Me-OFL 而言, 由于正电荷集中在 4'N 原子上, 与该 N 直接相连的 3',5',7',8' ^{13}C 由于受到正电荷的诱导效应, 与碱性 OFL 相比化学位移向低场大幅度移动; 而 2',6' ^{13}C 不直接与 4'N 原子相连, 诱导效应被削弱。同时, 由于电场效应, 使得 2',6' ^{13}C 的谱峰移向高场。而在 OFL 盐酸盐中, 由于正电荷集中在与 4'N 相连的氢(氘)离子上, 4'N 原子周围 C 皆不直接与正电荷相连, 诱导效应被削弱, 而电场效应使各个 C 谱峰移向高场。因而, 在 OFL 盐酸盐中, 4'N 周围 C 与碱性 OFL 相比, 表现为向高场移动。

虽然季胺盐是一个常见的带正电荷的官能团, 但就我们所知, 正电荷究竟集中在哪一个原子上却未见报道。我们通过对 Me-OFL 和 OFL 的 NMR 研究对这一问题提出了一个初步认识, 进一步的工作正在进行中。

3 结 论

利用 NMR 技术对 Me-OFL 在酸性及碱性溶液中 ^1H 及 ^{13}C 谱进行指认, 并与 OFL 在酸碱溶液中化学位移进行比较。结果表明: 对于 Me-OFL, 与酸性条件下的 ^1H 化学位移相比, 碱性条件下 5H 的化学位移变化最大, 向高场移动 1.02, 推测此变化与酸性溶液中羧基和羰基形成的内氢键有关; 与酸性条件下 ^{13}C 化学位移相比, 碱性条件下与羧基直接相连的 6C 的化学位移变化最大, 向低场位移 12.04, 临近的 ^{13}C 向低场位移 7.46, 羰基碳和羧基碳向低场位移了 4.33 和 2.88, 推测此变化与羧基和羧酸根的转变有关。另外, 以碱性条件下的 OFL 为基础, 讨论了酸性条件下的 OFL 和 Me-OFL 形成的季胺盐上哌嗪环 4'N 的正电荷分布。结果表明当 OFL 质子化形成季胺盐时, 正电荷分布在 H 上; 当 OFL 烷基化形成季胺盐时, 正电荷分布在 N 上。通过化学位移的变化可以深入理解 OFL 的质子化作用与烷基化反应的本质区别。

参 考 文 献

- [1] Neugebauer U, Szeghalmi A, Schmitt M, et al. Spectrochimica Acta Part A, 2005, 61: 1505.
- [2] Mucci A, Malmusi L, Vandelli M A, et al. Medicinal Chemistry Research, 1996, 6(5): 353.
- [3] Fardella G, Barbetti P, Chiappini I, et al. International Journal of Pharmaceutics, 1995, 121: 123.
- [4] Masahiro Sakai, Akihiro Hara, Saeko Anjo, et al. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1999, 18:1057.
- [5] Iztok Turel. Coordination Chemistry Reviews, 2002, 232(27): 22.
- [6] Macias B, Villa M V, Sastre M, et al. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2002, 91(11): 2416.
- [7] Koester L S, Guterres S S, Le Roch M, et al. Drug Development and Industrial Pharmacy, 2001, 27(6): 533.
- [8] Sagdine S, Bayari S. Journal of Molecular Structure, 2004, 691: 107.
- [9] LIU Ming-liang(刘明亮). World Notes on Antibiotics(国外医药抗生素分册), 2006, 27(1): 22.
- [10] LI Wen, BAN Yun-dong, SHA Yi, et al(李文, 班允东, 沙沂, 等). Chinese J. of Pharm. (中国医药工业杂志), 1999, 30(9): 407.
- [11] ZHANG Guo-wen, NI Yong-nian(张国文, 倪永年). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2006, 26(1): 114.
- [12] YANG Jun, XU Yi-zhuang, WENG Shi-fu, et al(杨军, 徐怡庄, 翁诗甫, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2002, 22(5): 741.
- [13] QI Jian, GAO Xiu-xiang, ZHAO Mei-xian, et al(齐剑, 高秀香, 赵梅仙, 等). Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报), 2007, 28(5): 913.
- [14] LIU Cui-ge, XU Yi-zhuang, WEI Yong-ju, et al(刘翠格, 徐怡庄, 魏永巨, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分

- 析), 2005, 25(4): 584.
- [15] HE Li-qin, CHEN Tian-yu, XIAN Yu-juan(何黎琴, 陈天宇, 见玉娟). Anhui Chemical Industry(安徽化工), 2004, 30(6): 22.
- [16] ZHAO Tian-zeng(赵天增). Proton NMR Spectroscopy(核磁共振氢谱). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 1983. 64.
- [17] ZHU Huai-wu(朱淮武). Structural Analysis of Organic Molecules by NMR Methods(有机分子结构波谱解析). Beijing: Chemical Industry Press(北京: 化学工业出版社), 2005. 149.
- [18] SHEN Qi-feng(沈其丰). ^{13}C NMR Spectroscopy(核磁共振碳谱). Beijing: Peking University Press(北京: 北京大学出版社), 1988. 88.

A Study on the NMR Spectrum of Methyl-Ofloxacin

GAO Xi-xiang¹, QI Jian¹, ZHAO Mei-xian², TU Guang-zhong³, AN Dong-ge³, XU Yi-zhuang^{1*}, WU Jin-guang¹

1. National Laboratory of Rare Earth Material Chemistry and Application, College of Chemical and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China
2. Applied Chemistry Department, School of Science, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China
3. Beijing Institute of Microchemistry, Beijing 100091, China

Abstract Ofloxacin ((±)-9-fluoro-3-methyl-10-(4-methylpiperazin-1-yl)-7-oxo-2,3-dihydro-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid) is a totally synthetic fluoroquinolone antimicrobial agent with a broad spectrum of activity against Gram positive and Gram negative bacteria and atypical pathogens such as Mycoplasma, Chlamydia and Legionella. Even though it is widely used for the treatment of gastrointestinal, pulmonary, urinary, and other infections, the comprehensive mechanism of action at molecular level has not been known so far. It is very important to understand the structural characteristics of the drug and the effects that are caused by the environments. With the purpose of deeply investigating the structure of Ofloxacin, an analog of Ofloxacin, Methyl-Ofloxacin (Me-OFL), was synthesized by methylation of 4-N in piperazine ring from Ofloxacin with CH_3I . Then appropriate Me-OFL was dissolved in $\text{DCI}/\text{D}_2\text{O}$ and $\text{NaOH}/\text{D}_2\text{O}$ to prepare corresponding acidic and alkaline solutions. Systematic NMR spectroscopic investigation on Me-OFL in both acidic and alkaline solution was conducted using quantitative ^1H and ^{13}C spectra, DEPT, HSQC together with HMBC techniques. The spectra were recorded with Bruker AM-300 spectrometer and DRX500 spectrometer. Chemical shifts have been given in values referred to dioxane ($\delta_{\text{H}} = 3.7$, $\delta_{\text{C}} = 67.8$). Complete assignments on ^1H and ^{13}C signals of Me-OFL were obtained in different pH environments where the coupling constant between ^{13}C and ^{19}F was found to be very helpful for the assignment of aromatic ^{13}C signals. A comprehensive comparison between the ^1H , ^{13}C chemical shifts, together with the structural transformation in acidic and alkaline solutions was made and discussed in details. Due to the formation of hydrogen bond between COOH and $\text{C}=\text{O}$, the COOH and aromatic ring are in the same plane. As a result, a weak $\text{O}\cdots\text{H}-\text{C}$ hydrogen bond forms between $\text{C}=\text{O}$ from the carboxyl group and 5-H from aromatic ring. In alkaline solution, the deprivation of H^+ from COOH destroys not only the hydrogen bond between COOH and carbonyl group but also the weak hydrogen between the $\text{C}=\text{O}$ from COOH and 5H. As a result, the 5H exhibited remarkable shift toward high field (1.02). Meanwhile, the chemical shift of 6C, 13C, 7C, 15C also exhibited remarkable shift to low field at 12.04, 7.46, 4.33, 2.88 respectively. Such variations were related to the changes of p electrons from carboxyl group caused by the transformation between the carboxyl group and the carboxylate group in different pH environments. Comparison of δ_{H} , δ_{C} data between Me-OFL and OFL in acidic solution and OFL in alkaline was made. In Me-OFL acidic solution, the chemical shift of 3'C, 5'C, 7'C, 8'C also exhibited remarkable shift to low field at 6.66-7.32 respectively, the chemical shift of 2'C and 6'C also exhibited remarkable shift to high field 6.04. In OFL acidic solution, the chemical shift of 2'C, 3'C, 5'C, 6'C, 7'C, 8'C also exhibited remarkable shift to high field within 2.39, Comparison between the protonation and the methylation on the 4-N atom from the piperazine ring was also made. The distribution of positive charge also showed difference. When protonation occurred on the piperazine ring, the positive charge was on the proton connected with 4-N. However, if methylation occurred, the positive charge is on the 4- ^1N atom.

Keywords Quinolone; Methyl-Ofloxacin; NMR; Piperazine ring

*Corresponding author

(Received Feb. 6, 2007; accepted May 12, 2007)