

# Strukturelle Charakterisierung eines unbekanntes Metaboliten von Ciprofloxacin

F. Kees, W. Raasch und H. Grobecker

Herrn Professor Dr. Dr. Ernst Mutschler zum Geburtstag gewidmet

## Zusammenfassung

Mit Hilfe der Reversed-phase-Ionenpaarchromatographie, von UV- und Fluoreszenzspektroskopie, der Bestimmung von Verteilungskoeffizienten sowie hydrolytischen und enzymatischen Abbaureaktionen wurde ein Strukturvorschlag für einen zusätzlichen Metaboliten von Ciprofloxacin (CAS 85721-33-1) erarbeitet: N-Formyl-Desethylenciprofloxacin. Dieses Molekül kann als Zwischenprodukt des oxidativen Abbaus von Ciprofloxacin über Oxociprofloxacin zu Desethylenciprofloxacin gebildet werden oder durch Konjugation von Desethylenciprofloxacin mit Ameisensäure. Die im Plasma und Urin von Patienten gefundenen Mengen lagen in der Größenordnung von Desethylenciprofloxacin, d. h. bei etwa 1 % der Muttersubstanz.

## Summary

*Structural Characterization of an Unknown Metabolite of Ciprofloxacin*

The chemical structure of an unknown metabolite of ciprofloxacin (CAS 85721-33-1) is characterized by means of reversed phase ion pair liquid chromatography, absorption and fluorescence spectroscopy, partition coefficients as well as chemical and enzymatic hydrolytic degradation. A chemical structure of the unknown metabolite is proposed: N-formyl-desethylenciprofloxacin. It can be formed as an intermediate in the oxidative degradation of ciprofloxacin via oxociprofloxacin to desethylen-ciprofloxacin, or it may be formed by conjugation of desethylen-ciprofloxacin with formic acid. The amounts found in plasma and urine of patients were in the range of desethylen-ciprofloxacin, i.e. about 1 % of the parent compound.

**Key words:** Antibiotics · CAS 85721-33-1 · Ciprofloxacin, metabolism

## 1. Einleitung

Ciprofloxacin (CAS 85721-33-1) gehört zu einer Gruppe neuer vollsynthetischer Antibiotika, die sich von der Nalidixinsäure ableiten und hohe und breite Aktivität gegen Gram-positive und Gram-negative pathogene Keime besitzen (Cullmann et al. 1984, Sanders et al. 1987, Campoli-Richards et al. 1988). Aufgrund ihres Wirkmechanismus, der Hemmung einer bakteriellen Gyrase, werden diese Substanzen Gyrasehemmer genannt (Stille 1984). Im englischen Sprachraum ist die von der chemischen Grundstruktur abgeleitete Bezeichnung „Chinolone“ oder „Fluorochinolone“ geläufig.

Die Gyrasehemmer werden nach oraler Gabe gut resorbiert und hauptsächlich renal in unveränderter Form, zum Teil aber auch metabolisiert, ausgeschieden (Beerman et al. 1985, Christ 1987, Bergan et al. 1988). Bei Ciprofloxacin wurden vier Metaboliten aus Urin isoliert und identifiziert: Produkte des oxidativen Abbaus des Piperazinrings, Oxo-Ciprofloxacin und Desethylciprofloxacin sowie die Konjugate Sulfociprofloxacin und N-Formylciprofloxacin (Gau et al. 1985, 1986). Daneben gibt es Hinweise auf Spuren anderer Metaboliten (Borner u. Lode 1986, Borner et al. 1986, Tanimura et al. 1986 (Glucuronid bei Ratten), Myers u. Blumer 1987, Nix u. Schentag 1988). Abb. 1 zeigt die chemischen Strukturen von Ciprofloxacin, seiner beim Menschen gefundenen Metaboliten (M1 – M4) sowie einiger möglicher Metaboliten (Glucuronid, F1 – F4).

Bei früheren Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Ciprofloxacin fanden wir im Serum von Patienten mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie einen Metaboliten (MX) von Ciprofloxacin (Kees et al. 1989), der sich durch Co-Chromatographie auch nicht als identisch mit einer der Referenzsubstanzen F1 – F4 zeigte. Die Auswertung in Ciprofloxacin-Einheiten hatte ihm aber einen vorrangigen Stellenwert eingeräumt, der sich quantitativ nicht mit dem bekannten Stoffwechselschema von Ciprofloxacin vereinbaren ließ. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Struktur dieses Metaboliten zu charakterisieren und die Menge quantitativ zu bewerten.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1. Reagentien und Chemikalien

Ciprofloxacin, die Metaboliten Bay r 3964 (M1, Desethylen-Ciprofloxacin, Bay s 9435 (M2, Sulfo-Ciprofloxacin), Bay q 3542 (M3, Oxo-Ciprofloxacin) und Bay q 9357 (M4, N-Formyl-Ciprofloxacin) sowie die chromatographischen Vergleichssubstanzen Bay p 1347 (F1, N-Methyl-ciprofloxacin), Bay p 7355 (F2, N-Acetyl-ciprofloxacin), Bay t 2551 (F3, N-Acetyl-desethylen-ciprofloxacin) und Bay r 3971 (F4, 7-Amino-1-cyclopropyl-4-oxo-1,4-dihydro-chinolon-3-carbonsäure) wurden von Bayer AG (Leverkusen) zur Verfügung gestellt. Tetrabutylammonium-Hydrogensulfat (TBA, puriss.) und Natrium-Octansulfonat (SOS, purum) wurde von Fluka (Neu Ulm), Methanol und Acetonitril (HPLC-Qualität) sowie alle anderen Chemikalien (p.A.-Qualität) von E. Merck (Darmstadt) bezogen. Wasser wurde mit der Wasseraufbereitungsanlage Milli-Q (Millipore, Eschborn) gereinigt.

Stamm Lösungen (100 µg/ml) von Ciprofloxacin, den Metaboliten und Vergleichssubstanzen wurden durch Lösen der entsprechenden Menge in 5 ml 0,1 mol/l Natronlauge und Auffüllen mit Wasser hergestellt und in aliquoten Teilen bei –20 °C bis zur Verwendung gelagert. Eingefrorene Proben wurden nur einmal aufgetaut und der nicht benötigte Rest verworfen.

### 2.2. Chromatographisches System

Folgende HPLC-Geräte wurden verwendet: Pumpe M6000, Autosampler WISP 710B, UV-Detektor M440 (280 nm), Data module M730, System controller M720 (alle Millipore-Waters-Chromatographie, Eschborn) oder HPLC-Pumpe 2248 (Pharmacia-LKB Biotechnology, Freiburg/Brsg.), SIL-9A Autoinjektor, Säulenofen CTO-2A (30 °C), Chromatopac C-R4A (alle Shi-

madzu, Düsseldorf), Fluoreszenzdetektor F1000, 280/445 nm (E. Merck, Darmstadt). Zur Trennung wurden eine Novapak® C18-Stahlsäule (4 µm, i. D. 150 × 4 mm) oder Novapak C18-Kartusche (4 µm, i. D. 100 × 5 mm) in Kombination mit der Kompressionskammer RCM 100 oder eine µ-Bondapak® C18-Stahlsäule (10 µm, i. D. 300 × 4 mm; alle Millipore-Waters-Chromatographie) eingesetzt. Die mobilen Phasen waren Mischungen aus Phosphatpuffer und Acetonitril, denen teilweise die Ionenpaar-Reagenzien TBA und SOS beigefügt wurden. Der Fluß betrug in allen Fällen 1 ml/min.

### 2.3. Isolierung von MX

MX wurde aus Urin eines mit Ciprofloxacin (2 × 500 mg/Tag) behandelten Patienten isoliert. Dazu wurden 500 µl Urin nach Zentrifugation in das HPLC-Gerät injiziert. Der Fluoreszenzdetektor wurde auf Ex-Em 280/550 nm eingestellt, um die Empfindlichkeit zu erniedrigen (Trennsystem: Stahlsäule, i. D. 150 × 4 mm, gefüllt mit Novapak C18 4 µm Kieselgel; Eluent: 1000 ml Wasser; 75–80 ml Acetonitril 2,0 g TBA; 2,0 ml 85 % o-Phosphorsäure, pH 3,0 mit 10 mol/l NaOH; Retentionszeit für MX: 15,5 min). Die Fraktion von 15 bis 16 min wurde gesammelt und auf chromatographische Reinheit überprüft (fluorimetrische Detektion: 280/445 nm). Die Eluate von 5 bis 10 Einzelinjektionen wurden vereinigt und mit dem gleichen Volumen Dichlormethan ausgeschüttelt, um das Acetonitril in die Dichlormethanphase zu extrahieren (vgl. Kees 1986). Der wäßrige Überstand wurde in aliquoten Teilen bei –20 °C bis zur Verwendung gelagert.

### 2.4. Verteilung von Ciprofloxacin und Metaboliten im Dichlormethan-Wasser-System

100 µl der entsprechenden Stammlösung (100 µg/ml) wurden 1 : 10 mit 0,1 mol/l Phosphatpuffer unterschiedlichen pH-Werts verdünnt. Die resultierenden Lösungen hatten die pH-Werte 1,87; 4,45; 7,00; 7,40; 9,30; 12,1. 200 µl wurden entnommen und ein Aliquot als Referenzprobe in die HPLC-Anlage injiziert. Die verbliebenen 800 µl wurden mit 800 µl Dichlormethan überschichtet, 30 min geschüttelt (Reax-2-Mischer; Heidolph, Kelheim) und 4 min bei 10 500 g zentrifugiert (Mikroliterzentrifuge; Hettich, Tuttingen). Die organische Phase wurde im Wasserstrahlvakuum abgesaugt und die Konzentration von Ciprofloxacin bzw. der Metaboliten und Vergleichssubstanzen wurde in der wäßrigen Phase mit Hilfe der HPLC bestimmt. Aus den Konzentrationen vor und nach Äquilibration mit Dichlormethan wurden die Extraktionsrate bzw. der Verteilungskoeffizient berechnet.

### 2.5. Umsetzung von MX mit Glucuronidase

200 µl MX-Lösung wurde 1 : 10 mit β-Glucuronidase-Lösung (Typ IX; Sigma, Deisenhofen; 3200 Einheiten/ml, pH 6,8) verdünnt und 2 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert (nach Tanimura et al. 1986). In regelmäßigen Abständen wurde ein Aliquot entnommen und hochdruck-flüssigkeitschromatographisch auf Abbau überprüft. Der Versuch wurde mit anderen β-Glucuronidasen wiederholt: Typ HP-2 und H-3 (beide Sigma), β-Glucuronidase/Arylsulfatase 641 K 1901414 Art. 4114 (E. Merck).

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Polarität von MX

Die neuen Fluorochinolone sind amphotere Verbindungen mit einer basischen (z. B. Piperazin-Ring) und sauren Gruppe (Carboxyl-Gruppe). Im pH-Bereich um 6,5–7,5 zeigen sie ein Löslichkeitsminimum in Wasser, da sie eine Betain-Struktur bilden können. Dies läßt sich darstellen an der Verteilung zwischen einer lipophilen Phase und Wasser und am Retentionsverhalten an C18-Kieselgel. Dem Löslichkeitsminimum von Ciprofloxacin in Wasser bei physiologischen pH-Werten entsprechen maximale Extraktionsrate in eine organische Phase (z. B. Dichlormethan) und maximaler Kapazitätsfaktor an C18-Kieselgel bei diesem pH (Abb. 1, 2). Einen analogen Kurvenverlauf wie Ciprofloxacin zeigen der Metabolit M1 und die Vergleichssubstanz F1, am Piperazin-Ring N-methyliertes Ciprofloxacin, d. h. Substanzen, bei denen der basische Charakter des Piperazin-Rings erhalten

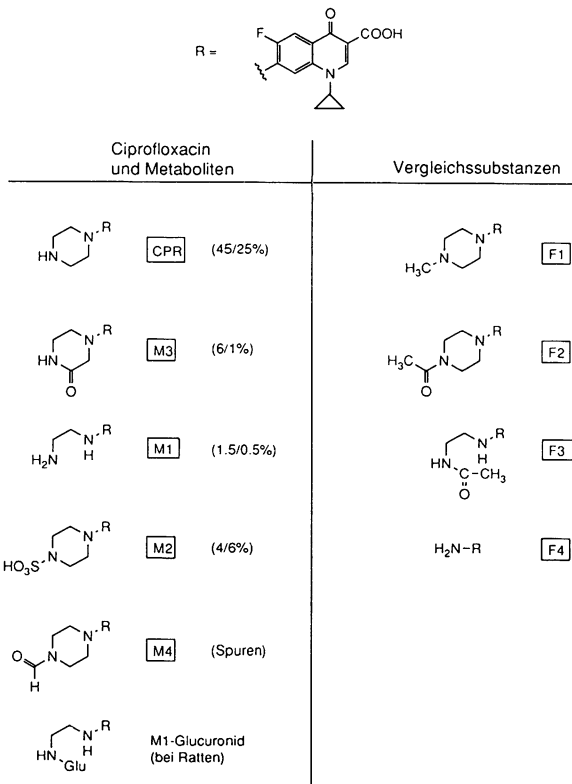


Abb. 1: Chemische Strukturen von Ciprofloxacin, Metaboliten und Vergleichssubstanzen für mögliche Metaboliten. Die Zahlen in Klammern geben die Wiederfindung im Urin/Faeces (u/f) in Prozent der Dosis an.

ist. Die Säureamid-Metaboliten, M2 und M3, haben den basischen Charakter am Piperazin-Ring verloren, weshalb sie im sauren pH-Bereich lipophiler sind und dort höhere Extraktionsraten in Dichlormethan und Kapazitätsfaktoren zeigen. Im alkalischen pH-Bereich sind alle Substanzen gut wasserlöslich. MX zeigt über den gesamten pH-Bereich einen sehr geringen Kapazitätsfaktor und läßt sich im Dichlormethan nicht aus der Wasserphase extrahieren, was MX als eine sehr polare Substanz charakterisiert.

### 3.2. Basizität von MX

Eine Methode, basische (kationische) oder saure (anionische) Substanzen an Reversed-phase-Kieselgel selektiv zu trennen, besteht im Zusatz von Ionenpaar-Reagenzien, z. B. Tetrabutylammoniumsalze (TBA) für Anionen wie Carbonsäuren, Octansulfonat (SOS) für Kationen wie Amine. Durch Ionenpaarbildung zwischen unterschiedlich geladenen Teilchen (protonierte Aminogruppe und Octansulfonat) ergibt sich eine Erhöhung des Kapazitätsfaktors für die Substanz, durch Verdrängung von der stationären Phase für gleich geladene Teilchen, z. B. Tetraalkylammoniumsalz an der stationären Phase und protoniertes Amin, eine Verkleinerung des Kapazitätsfaktors. In Abb. 3 ist der unterschiedliche Einfluß der Ionenpaar-Reagenzien auf den Kapazitätsfaktor von Ciprofloxacin und von verwandten Substanzen dargestellt. Um das System zu vereinfachen, wurde ein pH-Wert von 2,5 in der mobilen Phase gewählt, bei dem die Carboxylgruppen hauptsächlich protoniert vorliegen und für die Wechselwirkung mit den Ionenpaar-Reagenzien nur noch protonierte Stickstoffatome zur Verfügung stehen. Wie Abb. 3 oben zeigt, erhöht sich der Kapazitätsfaktor von Ciprofloxacin und des Metaboliten M1 mit der Erhöhung der SOS-Konzentration durch Ionenpaarbildung

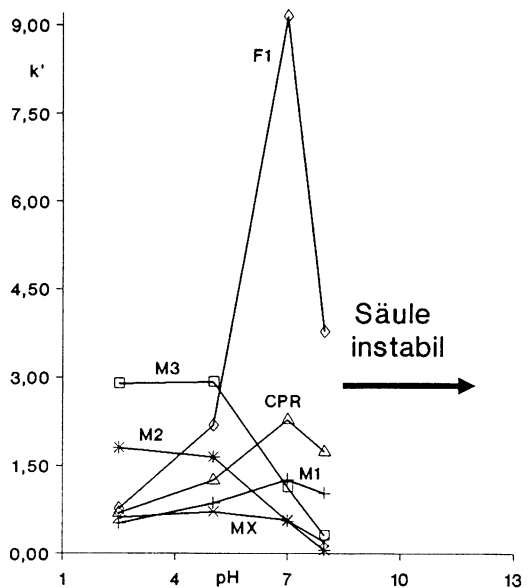
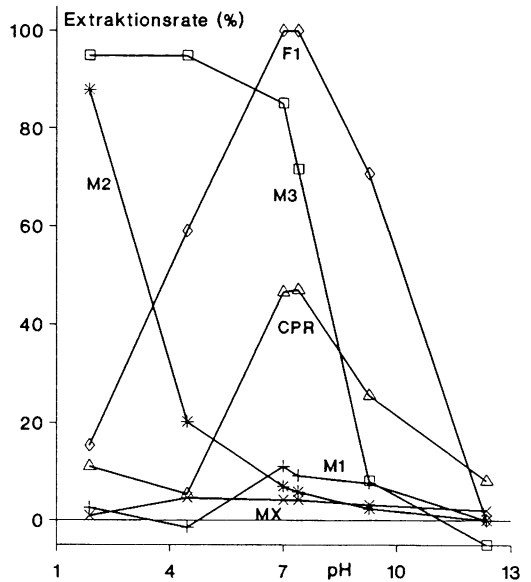


Abb. 2: Extraktionsrate (%) von Ciprofloxacin und Derivaten aus wäßriger Lösung in Dichlormethan (oben) bzw. Kapazitätsfaktoren ( $k'$ ) an C18-Kieselgel (unten). (Chromatographisches System: Stahlsäule  $\mu$ -Bondapak C18 10  $\mu$ m, 300  $\times$  4 mm. Eluent: 1000 ml Wasser, 540 ml Methanol, 12 ml THF, 6,6 ml 87 % o-Phosphorsäure, pH mit 10 mol/l NaOH eingestellt.)

und erniedrigt sich bei Zugabe von TBA (Abb. 3 unten) durch Verdrängung von CPR und M1 von der stationären Phase. Die Amidmetaboliten M3 und M4 sowie M1 verhalten sich weitgehend indifferent. Jedoch erhöht sich  $k'$  von MX bei Zugabe von SOS (von 0,8 auf 1,5), wodurch MX ein Rest basischen Charakters am intakten oder teilweise abgebauten Piperazin-Substituenten zugeteilt werden kann. Das umgekehrte Verhalten wie CPR und M1 zeigt M2, das wegen der Sulfonat-Gruppe auch bei diesem sauren pH-Wert noch in anionischer Form vorliegt.

Ein Ergebnis der oben dargestellten Versuche zum Retentionsverhalten von Ciprofloxacin und seinen Metaboliten unter Bedingungen der Reversed-phase-Ionenpaarchromatographie ist die erstmalige Beschreibung eines isokratischen Trennsystems für Ciprofloxacin und seine Metaboliten in kurzer Zeit (Abb. 4; vgl. Gau et al. 1985, 1986, Krol et al. 1986, Scholl et al. 1987).

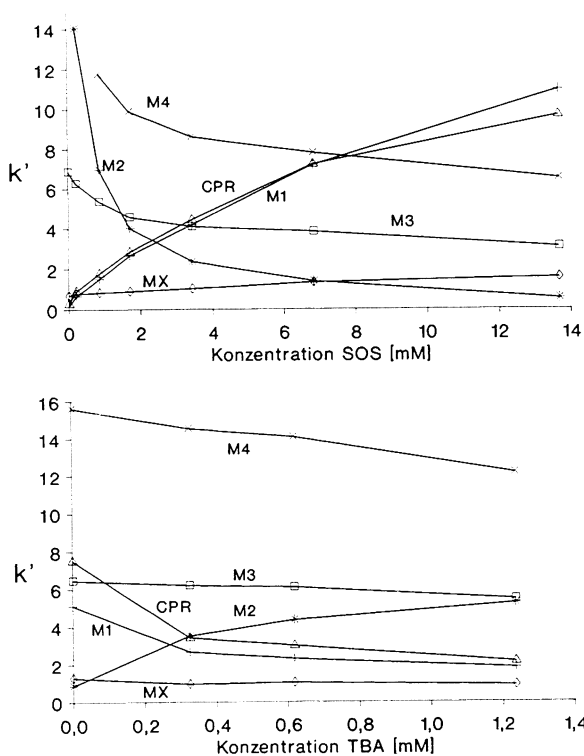


Abb. 3: Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors ( $k'$ ) von Ciprofloxacin und Derivaten von der Konzentration an Natriumoctansulfonat (SOS, *oben*) bzw. Tetrabutylammonium-Hydrogensulfat (TBA, *unten*) in der mobilen Phase. (Chromatographisches System: Stahlsäule Novapak C18 4  $\mu$ m, 150  $\times$  4 mm. Eluent A: 1000 ml Wasser, 200 ml Acetonitril, 2,0 ml 87 % o-Phosphorsäure, 1,0 g TBA, pH 3,0; davon 1000 ml genommen und mit variablen Mengen SOS versetzt. Eluent B: 1000 ml Wasser, 200 ml Acetonitril, 2,0 ml 87 % o-Phosphorsäure, 0,24 g SOS, pH 3,0; davon 1000 ml genommen und mit variablen Mengen TBA versetzt.)

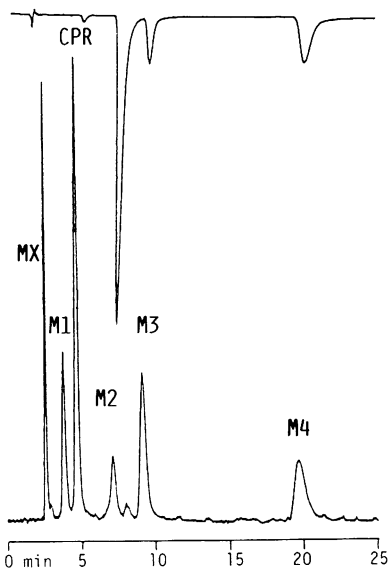


Abb. 4: Isokratische Trennung von Ciprofloxacin und seinen Metaboliten. *Oben*: Photometrische Detektion bei 280 nm; *unten*: fluorimetrische Detektion bei  $Ex/Em = 280/445$  nm. (Chromatographisches System: Stahlsäule Novapak C18 4  $\mu$ m, 150  $\times$  4 mm. Eluent: 1000 ml Wasser, 200 ml Acetonitril, 2,0 ml 87 % o-Phosphorsäure, 0,25 g TBA, 0,24 g SOS, pH 3,0).

### 3.3. Variation der Detektion

Mit Ausnahme von Enoxacin (ein Naphthyridinderivat!) zeichnen sich die Fluorochinolone durch intensive Fluoreszenz aus, weshalb zu ihrem HPLC-Nachweis in der Regel ein Fluoreszenzdetektor verwendet wird. Die

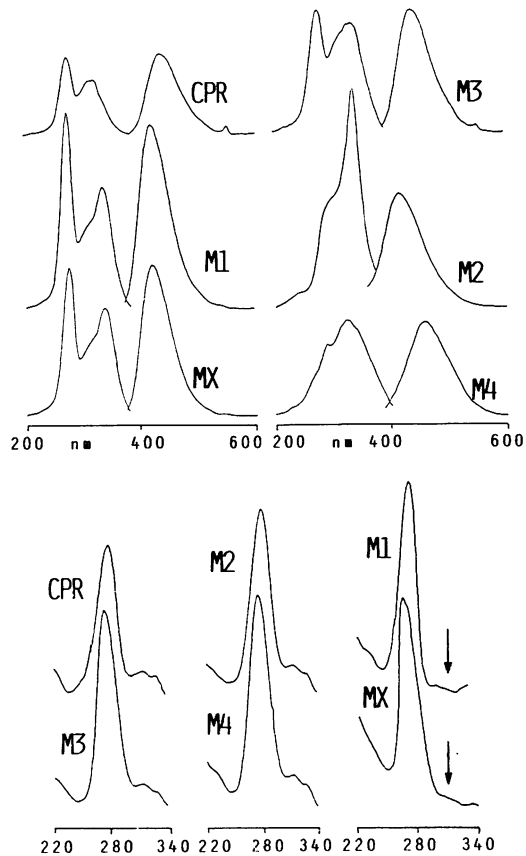


Abb. 5: Fluoreszenz- (*oben*) und UV-Spektren (*unten*) von Ciprofloxacin und Metaboliten.

Tab. 1: Quotienten der fluorimetrischen und photometrischen Detektorantwort von Ciprofloxacin und seinen Metaboliten (Strukturen s. Abb. 1) Vergleich mit Werten in der Literatur (Scholl et al. 1987) durch Berechnung aus den dort angegebenen Nachweisgrenzen.

Substanz	CPR	M1	M2	M3	M4	MX
Diese Arbeit	110	860	0,4	6,3	2,5	820
Scholl et al. 1987	78	850	0,3	3,9	2,3	

Amidmetaboliten fluoreszieren nur schwach, M1 etwa zehnfach stärker als Ciprofloxacin (Gau et al. 1985). Die photometrische Detektorantwort ist hingegen für alle Substanzen sehr ähnlich. In Tab. 1 sind die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Quotienten aus fluorimetrischer und photometrischer Detektorantwort von Ciprofloxacin und seinen Metaboliten aufgeführt und den Werten von Scholl et al. 1987 gegenübergestellt, die aus den dort aufgeführten Nachweisgrenzen der jeweiligen Detektionsmethode berechnet wurden. Bis auf M3 stimmen die Werte sehr gut überein. Wie M1 zeichnet sich MX durch gegenüber der Muttersubstanz fast um den Faktor 10 gesteigerte Fluoreszenzintensität aus.

M1 und MX weisen auch nahezu identisch Fluoreszenz- (Abb. 5 oben) und UV-Spektren (Abb. 5 unten) auf, und nur diese beiden Substanzen haben kein zweites Absorptionsmaximum bei 310 bis 340 nm.

## 4. Diskussion

Ciprofloxacin ist das Fluorochinolon, dessen Metabolismus am vollständigsten untersucht und aufgeklärt worden ist (Übersicht bei Neumann 1988). Das Metabolisierungsschema wurde von Beermann et al. 1985 und Gau

et al. 1986 erarbeitet, die Massenbilanz der Wiederfindung in Urin und Faeces lag nahezu bei 100 % (vgl. Abb. 1). Neben den so identifizierten vier Metaboliten Desethylenciprofloxacin (**M1**), Sulfociprofloxacin (**M2**), Oxociprofloxacin (**M3**) und Formylciprofloxacin (**M4**) werden zusätzliche Intermediate des oxidativen Stoffwechselabbaus von **M3** nach **M1** postuliert (Beermann et al. 1985, Nix u. Schentag 1988). Auch wurden Hinweise auf zusätzliche Metaboliten bei hochdruck-flüssigkeitschromatischen Untersuchungen gefunden (Borner et al. 1986, Myers u. Blumer 1987). In der vorliegenden Arbeit wurde ein Metabolit, der in Plasma und Gewebe bei Patienten und Ratten gefunden wurde (Raasch 1990), aus Urin isoliert und mit Hilfe von UV- und Fluoreszenzspektroskopie, der Verteilung zwischen Dichlormethan/Wasser sowie seinem chromatographischen Verhalten unter Reversed-phase-Ionenpaarchromatographie-Bedingungen charakterisiert.

Eine umfassendere Strukturanalyse, z. B. unter Zuhilfenahme von Kernresonanz- und Massenspektroskopie, wurde nicht vorgenommen. Wie bei Gau et al. 1986 beschrieben, ist bereits der Aufwand für die Isolierung von genügend Substanz der Metaboliten **M1**–**M4** für derartige Untersuchungen unverhältnismäßig hoch (Extraktion von 14 l Urin mit ca. 50 l Butanol, Eindampfen zur Trockne, Craig-Counter-Current-Verteilungschromatographie, semipräparative HPLC), und trotz des Aufwands konnte von diesen Autoren **MX** nicht gefunden werden.

Ein sehr kleiner Kapazitätsfaktor unter Reversed-phase-HPLC-Bedingungen ohne Zusatz von Ionenpaar-Reagenzien und niedrige Extraktionsrate aus wässriger Lösung in Dichlormethan im gesamten pH-Bereich weisen **MX** als sehr polare Verbindung aus. Zur Beschreibung der Lipophilie und Korrelation mit dem Kapazitätsfaktor bei der RP-HPLC wurde das System Dichlormethan/Wasser dem geläufigen System Octanol/Wasser (Carlson et al. 1975, Pietrogrande et al. 1987, Minick et al. 1987) vorgezogen, da bei der HPLC-Analyse von Fluorochinolonen Dichlormethan als Extraktionsmittel bei der Probenvorbereitung üblich ist (Claes et al. 1986, Awni et al. 1987, Granneman u. Sennello 1987, LeCogui et al. 1988, Lehr et al. 1988). Unter Bedingungen der Ionenpaar-Chromatographie verhielt sich **MX** analog zu Ciprofloxacin und **M1** und nicht zu den Konjugaten und Oxociprofloxacin (Amid-Metaboliten, vgl. Abb. 3), auch wenn der Anstieg des Kapazitätsfaktors bei Zugabe von Octansulfonat nur gering war. In seinen spektroskopischen Eigenschaften (detailgetreue UV- und Fluoreszenz-Spektren; hohe Fluoreszenz-Intensität) zeigte **MX** die größte Ähnlichkeit zu **M1**. Intensive Fluoreszenz fanden Myers u. Blumer 1987 als herausragendes Merkmal der Metaboliten von Fluorochinolonen mit gespaltenem Piperazin-Ring, d. h. Substituenten mit geringem räumlichen Anspruch.

Im Metabolisierungsschema von Ciprofloxacin fällt die Lücke zwischen **M3** und **M1** auf, die beide Glieder des oxidativen Abbaus des Piperazinrings sind. In der Literatur gibt es bereits Hinweise über Zwischenstufen zwischen Oxociprofloxacin (**M3**) und Desethylen-Ciprofloxacin (**M1**, Nix u. Schentag 1988). Hinweise, daß **MX** ein Glied des oxidativen Abbaus des Piperazin-Rings von CPR sein sollte, wurden auch bei der Säurehydrolyse von **M3** (2 mol/l HCl; 60 °C; 25 h) gefunden. Die hochdruck-flüssigkeitschromatographische Analyse des Reaktionsgemisches zeigte neben völligem Abbau des Eduktes (die Hauptreaktion dürfte in der Abspaltung des Piperazin-Ringes liegen) in Spuren die Peaks von **M1** und **MX**. In untergeordnetem Ausmaß könnten deshalb die in Abb. 6 skizzierten Oxidationsreaktionen (durch Luftsauerstoff, begünstigt durch Licht) von **M3** zu **M1** abgelaufen sein. Ein analoger oxidativer In-vivo-Abbau von Piperazin-

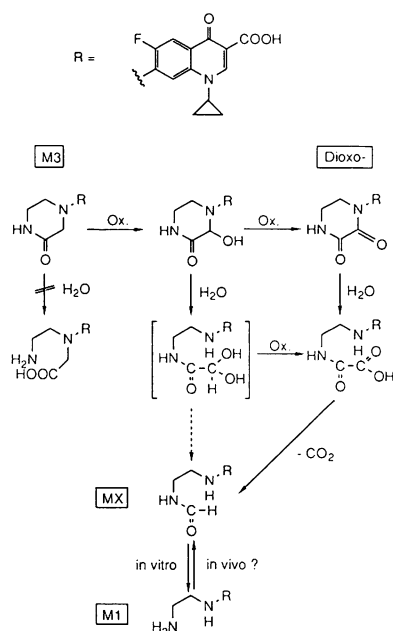


Abb. 6: Oxidative Abbauege von **M3** und Darstellung der Bildung von **MX**.

Substituenten zu einer Desethylen-Verbindung wird auch bei Phenothiazinen beobachtet, wobei Zwischenstufen nicht identifiziert werden konnten (Breyer et al. 1979, Christ u. Schmidt 1984). Die Öffnung eines Dioxopiperazin-Rings wurde *in vitro* und *in vivo* bei Piperacillin nachgewiesen (Yamana et al. 1982, Kees et al. 1985).

Das skizzierte Reaktionsschema weist **MX** als Zwischenstufe des oxidativen Abbaus von **M3** zu **M1** aus. *In vivo*, bei Patienten, wurden aber die maximalen Serumkonzentrationen von **MX** später gemessen als die von **M1** (1,5 gegenüber 0,5 h; Kees et al. 1989). Dies ließe sich dadurch erklären, daß *in vivo* **MX** aus **M1** durch Konjugation mit Ameisensäure analog der Bildung von **M4** aus Ciprofloxacin in einer Phase-II-Reaktion gebildet wird.

Eine vorsichtige Schätzung über die beim Menschen gebildete Menge **MX** kann abgegeben werden vor dem Hintergrund der postulierten großen strukturellen Ähnlichkeit mit **M1** und den detailgetreuen Fluoreszenz- und UV-Spektren beider Verbindungen, die eine Quantifizierung von **MX** in Einheiten von **M1** erlauben. Danach liegen die von uns im Plasma von Patienten beobachteten Mengen von **MX** (Kees et al. 1989) in der Größenordnung derjenigen von **M1**. Einen Hinweis über die Wiederfindung im Urin ergibt die Zusammensetzung des Patientenurins (0–6 h nach 750 mg Ciprofloxacin p.o.), den wir zur Isolierung von **MX** benutzten. Der Anteil von **M1** betrug darin 2,7 %, der berechnete von **MX** 1,9 %.

## 5. Literatur

- Awni, W. M., Clarkson, J., Guay, D. R. P., J. Chromatogr. **419**, 414 (1987) — Beermann, D., Scholl, H., Wingender, W., Förster, D., Beubler, E., Kukovetz, W. R., 1st Int. Ciprofloxacin Workshop, Leverkusen Nov. 6–8, 1985 (unveröffentlicht) — Bergan, T., Dalhoff, A., Dohwedder, R., Infection **16** (Suppl. 1), S3 (1988) — Borner, K., Lode, H., Höffken, G., Prinzing, C., Glatzel, P., Wiley, R., J. Clin. Chem. Biochem. **24**, 325 (1986) — Borner, K., Lode, H., Infection **14** (Suppl. 1), 54 (1986) — Breyer, U., Gärtner, H. J., Prox, A., Biochem. Pharmacol. **23**, 313 (1974) — Campoli-Richards, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., Ward, A., Drugs **35**, 373 (1988) — Carlson, R. M., Carlson, R. E., Kopperman, H. I., J. Chromatogr. **107**, 219 (1975) — Christ, W., Schmidt, V., Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. **3–5**, 795 (1984) — Christ, W., Fortschr. anti-

- mikrob. antineoplast. Chemother. **6–10**, 1999 (1987) — Claes, R., Dusart, Y., Dupont, J. C., Jeanbaptiste, B., Podoor, M., Dou-champs, J., Infection **14** (Suppl. 4), 263 (1986) — Cullmann, W., Karch, H., Stieglitz, M., Baars, B., Opferkuch, W., Fortschr. anti-mikrob. antineoplast. Chemother. **3–5**, 571 (1984) — Gau, W., Kurz, J., Petersen, U., Ploschke, H. J., Wünsche, C., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **36 (II)**, 1545 (1986) — Gau, W., Ploschke, H. J., Schmidt, K., Weber, B., J. Liquid Chromatogr. **8**, 485 (1985) — Granneman, G. R., Sennello, L. T., J. Chromatogr. **413**, 199 (1987) — Kees, F., Naber, K. G., Bartoschik-Wich, B., Stock-mann, P., Meyer, G. P., Grobecker, H., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **35 (II)**, 1099 (1985) — Kees, F., Naber, K. G., Meyer, G. P., Grobecker, H., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **39 (I)**, 523 (1989) — Kees, F., in: High Performance Liquid Chromatography in Medical Microbiology, D. S. Reeves, U. Ullmann (Hrsg.), S. 7–19, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart—New York (1986) — Krol, G. J., Joe, A. J., Beer mann, D., J. Liquid Chromatogr. **9**, 2897 (1986) — LeCogic, A., Bidault, R., Farinotti, R., Dauphin, A., J. Chromatogr. **434**, 320 (1988) — Lehr, K.-H., Damm, P., J. Chromatogr. **425**, 153 (1988) — Minick, D. J., Sabatka, J. J., Brent, D. A., J. Liquid Chromatogr. **10**, 2565 (1987) — Myers, C. M., Blumer, J. L., J. Chromatogr. **422**, 153 (1987) — Neu-mann, M., Clin. Pharmacokinet. **14**, 96 (1988) — Nix, D. E., Schentag, J. J., J. Clin. Pharmacol. **28**, 169 (1988) — Pietro-grande, M. C., Dondi, F., Blo, G., Borea, P. A., Bighi, C., J. Li-liquid Chromatogr. **10**, 1065 (1987) — Raasch, W., Dissertation, Universität Regensburg (1990) — Sanders, C. C., Sanders, W. E. jr., Goering, R. V., Am. J. Med. **82** (Suppl. 4A), 2 (1987) — Scholl, H., Schmidt, K., Weber, B., J. Chromatogr. **416**, 321 (1987) — Stille, W., Fortschr. antimikrob. antineoplast. Chemother. **3**, 481 (1984) — Tanimura, H., Tominaga, S., Rai, F., Matsumoto, H., Arzneim.-Forsch./Drug Res. **36 (II)**, 1417 (1986) — Yamana, T., Mizukami, Y., Ichimura, F., Shimazaki, K., Ishioka, M., Suda, M., Int. J. Pharm. **11**, 71 (1982)

Korrespondenz: PD Dr. F. Kees, Lehrstuhl für Pharmakologie der Universität Regensburg, Universitätsstraße 31, W-8400 Regensburg