



УДК 547.631.6.06 : 543.51

## МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПРОИЗВОДНЫХ 2-АМИНОБЕНЗОФЕНОНА И ИХ МЕТАБОЛИТОВ

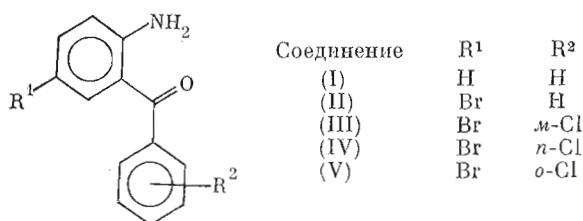
Головенко Н. Я., Зиньковский В. Г., Андронати С. А.,  
Яворский А. С.

Физико-химический институт им. А. В. Богатского  
Академии наук УССР, Одесса

Проведен масс-спектрометрический анализ 2-аминобензофенона, его галогенпроизводных и их метаболитов, образующихся в организме крыс. Определены особенности фрагментации продуктов гидроксилирования указанных соединений. Обнаружена структурная специфичность реакции окисления 2-аминобензофенонов, отличная от преобладающих процессов гидроксилирования фенильного (*o*-хлорфенильного) цикла 1,4-бенздиазепинов, продуктами гидролиза которых являются соответствующие бензофеноны.

Открытие бенздиазепиновых рецепторов в различных органах и тканях животных и человека способствовало их изучению специалистами, работающими в области фармакологии, нейрофизиологии, биохимии, биоорганической химии и др. Особый интерес в этой связи представляют работы, в которых исследуется молекулярная организация бенздиазепиновых рецепторов, а также ведется поиск их эндогенных лигандов. С этой целью используются различные методические подходы. В живых организмах 1,4-бенздиазепины подвергаются различным биохимическим превращениям [1]. Наименее изучен процесс гидролиза этих соединений до соответствующих 2-аминобензофенонов, которые в свою очередь подвергаются дальнейшему превращению в живом организме. Эти процессы могут вносить свой вклад в активность препаратов и их взаимодействие с бенздиазепиновыми рецепторами.

В настоящей работе изучена структура метаболитов экзогенных 2-аминобензофенонов, образующихся в результате окислительных реакций в организме крыс. С этой целью нами синтезированы 2-аминобензофеноны (I) — (V):



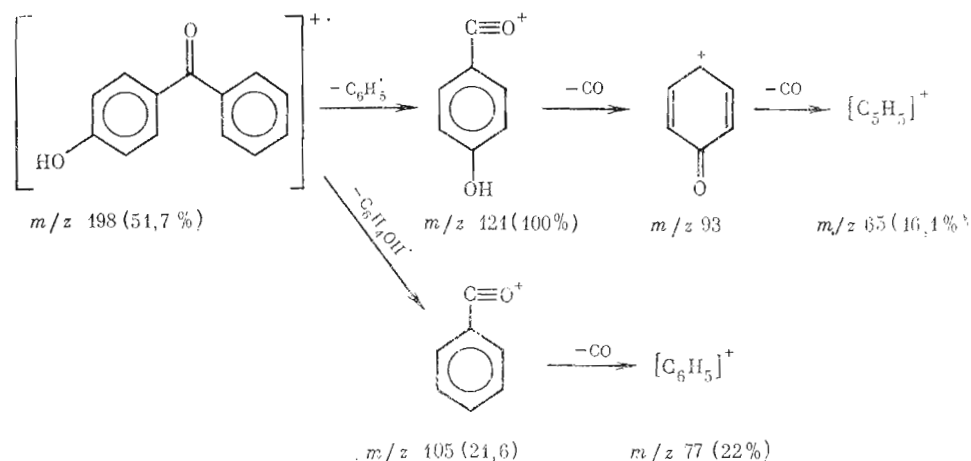
Соединения (I) — (V) и их метаболиты экстрагировали из мочи животных хлороформом и после ТСХ-разделения в системе хлороформ—четырёххлористый углерод (1 : 1) идентифицировали реакцией диазотирования — диазосочетания с резорцином,  $\alpha$ - и  $\beta$ -нафтолом [2]. Было установлено, что соединения (I) — (V) ( $R_f$  0,7—0,8) в организме животных практически полностью метаболизируют с образованием ароматических аминов ( $R_f < 0,65$ ).

Преобладающие продукты — метаболиты (Ia) ( $R_f$  0,50), (IIa) — (IVa) ( $R_f$  0,45), представленные в моче свободными (хлороформэкстрагируемыми) веществами и глюкуронамидами, агликонами которых извлекались после ферментативного гидролиза, были препаративно разделены и очищены методами, разработанными ранее [2, 3]. Из мочи также получены метаболиты (Ib) ( $R_f$  0,40), (IIb) ( $R_f$  0,30) и следовые количества ароматических

аминов ( $R_f$  0,6—0,65 и 0,3—0,35). Как и в исследовании, проведенном *in vitro* [2, 3], показано, что *in vivo* соединение (V) образует три метаболита с  $R_f$  0,35; 0,45 и 0,5 (Va, б, в).

Направление метаболизма бензофенона в организме крыс и кроликов [4] обусловлено симметричностью молекулы исходного соединения. Масс-спектрометрический распад образующегося *n*-оксипроизводного представлен на схеме 1:

Схема 1



Асимметричность соединений (I) — (V) обуславливает специфику гидроксирования одного из ароматических колец молекулы.

Схемы масс-спектрометрического распада 2-аминобензофенонов используются при установлении структуры метаболитов 1,4-бенздиазепинов [5—7].

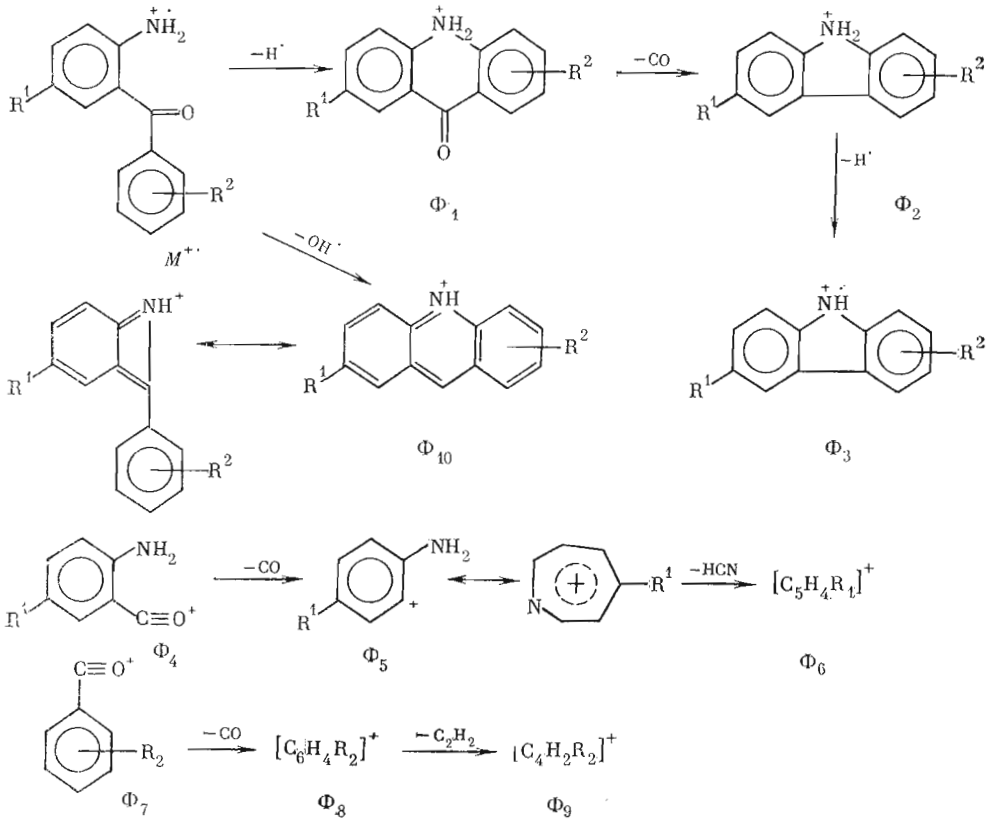
Основные (общие для соединений (I)—(V) и их метаболитов) направления фрагментации при электронном ударе заключаются в разрыве связей между карбонилем и ароматическим ядром с сохранением заряда на том или ином фрагменте (ионы  $\Phi_4$ — $\Phi_9$ ) и в последовательном элиминировании из иона  $M^{+\cdot}$  радикала водорода (ион  $\Phi_1$ ), молекулы CO (ион  $\Phi_2$ ), радикала водорода (ион  $\Phi_3$ ), а также радикала  $OH^{\cdot}$  из енольной формы  $M^{+\cdot}$  (ион  $\Phi_{10}$ ) (схема 2).

Поэтому определение структуры метаболитов 2-аминобензофенонов заключается в анализе изменений величин  $m/z$  и интенсивностей пиков ионов, которые могут быть общими для масс-спектров всей группы соединений ( $M^{+\cdot}$ ,  $\Phi_1$ — $\Phi_{10}$ ) или специфическими (обусловленными характером

Таблица I

Основные направления распада 2-аминобензофенона и его метаболитов при электронном ударе

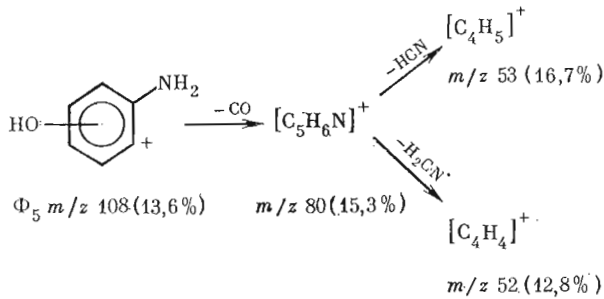
Индекс	Ион	$m/z$ , %		
		(I)	(Ia)	(Iб)
$M^+$	$M^+$	197 (78)	213 (70)	213 (65)
$\Phi_1$	$[M-H]^+$	196 (100)	212 (100)	212 (100)
$\Phi_2$	$[M-H, CO]^+$	168 (6,5)	184 (6)	184 (6)
$\Phi_3$	$[M-H, CO, H]^+$	167 (7)	183 (2)	183 (4)
$\Phi_4$	$[M-C_6H_5]^+$	120 (36)	136 (34)	136 (20)
$\Phi_5$	$[M-C_6H_5, CO]^+$	92 (23)	108 (11)	108 (19)
$\Phi_6$	$[M-C_6H_5, CO, HCN]^+$	65 (24)	—	—
$\Phi_7$	$[M-C_6H_4NH_2]^+$	105 (20)	105 (28)	105 (24)
$\Phi_8$	$[M-C_6H_4NH_2, CO]^+$	77 (42)	77 (56)	77 (51)
$\Phi_9$	$[M-C_6H_4NH_2, CO, C_2H_2]^+$	51 (12)	51 (17)	51 (9)
$\Phi_{10}$	$[M-Cl]^+$	180 (6,5)	196 (4)	196 (5)



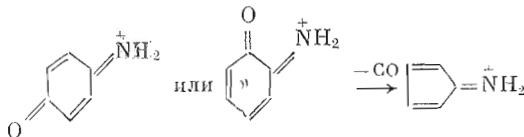
и местом замещения), а также в обнаружении альтернативных путей фрагментации метаболитов.

Данные масс-спектров соединений (I), (Ia) и (Iб) показали (табл. 1), что пики молекулярного иона, ионов  $\Phi_1$ — $\Phi_5$  и  $\Phi_{10}$  метаболитов (Ia) и (Iб) сместились в сторону больших значений  $m/z$  на 16 а. е. м. в сравнении со спектром соединения (I). Значения величин  $m/z$  фрагментов  $\Phi_7$ — $\Phi_9$  исходного соединения и метаболитов идентичны. Указанное изменение свидетельствует о наличии гидроксильной группы в 2-аминобензоильном кольце обоих метаболитов соединения (I).

Отсутствие пика иона  $\Phi_6$  ( $[C_5H_4R_1]^+$ ) и появление альтернативного пути фрагментации (Ia):



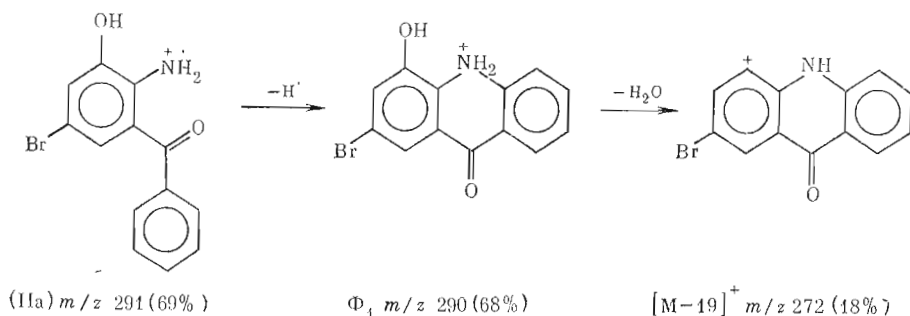
косвенно указывают на то, что оксигруппа находится в *o*- или *n*-положении (в сопряжении с аминогруппой):



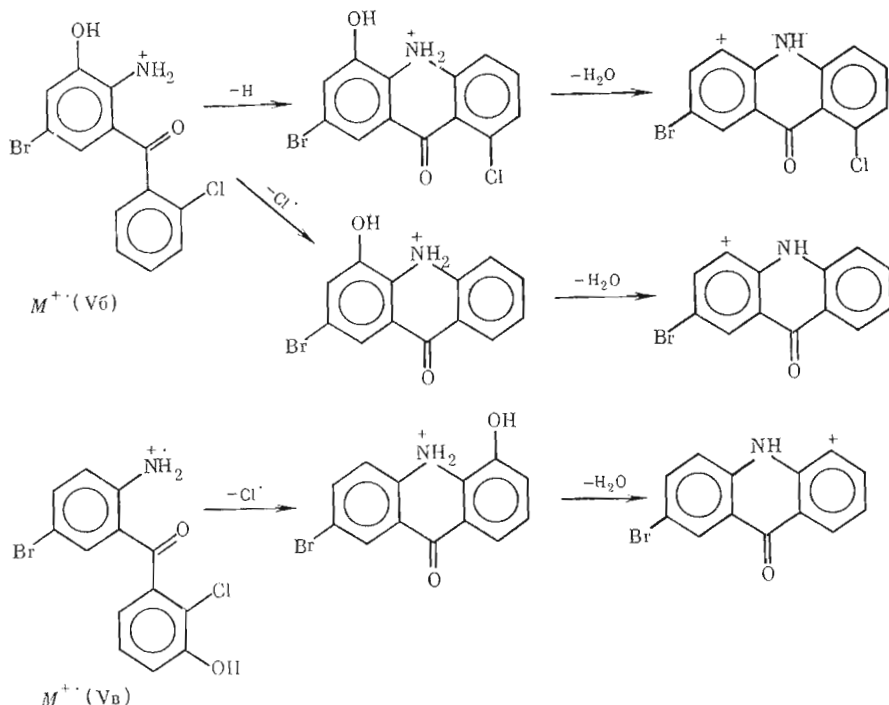
В масс-спектре соединения (Iб) аналогичного пути фрагментации не отмечено.

Основные черты фрагментации соединения (II) и его метаболитов аналогичны фрагментации соединения (I) и его метаболитов (табл. 2). Присутствие атома брома обуславливает образование фрагментов  $[M - Br]^+$ ,  $[M - H, Br]^+$  и других в масс-спектрах соединения (II) и его метаболитов (IIа) и (IIб). Возрастание значения величины  $m/z$  на 16 а. е. м. характерно для ионов  $M^{+}$ ,  $\Phi_1 - \Phi_3$  и  $\Phi_{10} - \Phi_{12}$  обоих метаболитов,  $\Phi_4 - \Phi_5$  (IIа) и  $\Phi_7 - \Phi_8$  (IIб). Из этого следует, что метаболит (IIа) содержит оксигруппу в 5-бром-2-аминобензоильном, а (IIб) — в фенильном кольце молекулы (II).

В масс-спектре соединения (IIа) присутствует ион  $[M - 19]^+$  с  $m/z$  272. Предположительный путь образования фрагмента следующий:

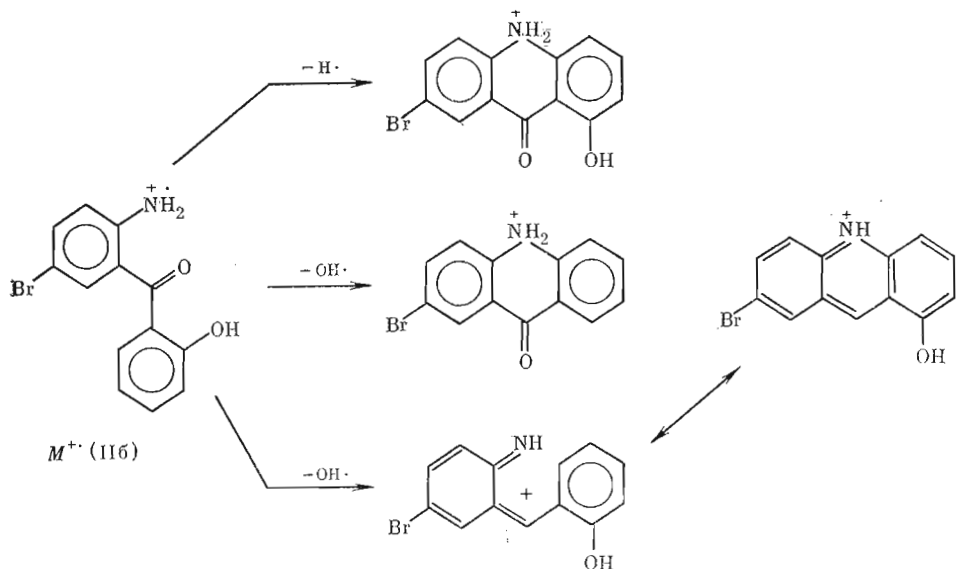


В предыдущем исследовании [6] обнаружен аналогичный путь фрагментации метаболита (Vб), структура которого (положение оксигруппы) была определена также методом ПМР [3]. Фрагментация соединения (Vв) протекает по однотипному механизму  $[M - Cl, H_2O]^+$ :



Для фрагментации метаболита (IIб) отмечено существенное возрастание интенсивности пика иона  $[M - OH]^+$  (табл. 2). Можно предположить, что в данном случае протекает процесс, параллельный основному пути

образования иона  $[M - H]^+$  трициклической структуры:



Это подтверждается дальнейшей (аналогичной  $[M - H]^+$ ) фрагментацией иона  $[M - OH]^+$  с образованием  $[M - OH, CO]^+$ ,  $[M - OH, CO, H]^+$ . Аналогичный процесс отмечен для соединения (Va). В предыдущих исследованиях особенности фрагментации продукта гидролиза основного метаболита феназепам — бензофенона (Va), а также самого феназепам позволили охарактеризовать соединение (Va) как 5-бром-6'-окси-2'-хлор-2-аминобензофенон [3, 5].

Особенности фрагментации соединений (III)—(V) и их метаболитов обусловлены присутствием атома хлора в фенильном кольце молекулы (табл. 3). В масс-спектрах соединений (III), (IV) и их метаболитов пики ионов  $[M - Cl]^+$  существенно менее выражены, чем в масс-спектрах соединений (V), (Va)—(Vb). Образование иона  $[M - Cl]^+$  в спектрах соединения (V) и его метаболитов — основной процесс фрагментации, обусловленный *o*-положением атома хлора. Он сопровождается образованием иона трициклической структуры, дальнейшим отщеплением радикала  $Br^•$ , а также молекулы  $H_2O$  у метаболитов (Va) и (Vb).

В масс-спектре метаболита (IIIa) значения ионов  $M^+$ ,  $\Phi_1 - \Phi_5$ ,  $\Phi_{11}$  и  $\Phi_{12}$  (а не ионов  $\Phi_7$ ,  $\Phi_8$  и  $\Phi_{13}$ ) сместились в сторону более высоких масс

Таблица 2

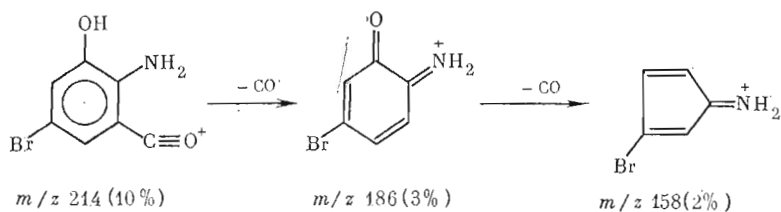
Основные направления распада 5-бром-2-аминобензофенона и его метаболитов при электронном ударе

Индекс	Ион	<i>m/z</i> , %		
		(II)	(IIa)	(IIб)
$M^+$	$M^+$	275 (71)	291 (69)	291 (97)
$\Phi_1$	$[M - H]^+$	274 (64)	290 (68)	290 (100)
$\Phi_2$	$[M - H, CO]^+$	246 (1)	262 (2,7)	262 (1)
$\Phi_3$	$[M - H, CO, H]^+$	245 (3,4)	261 (1)	261 (1)
$\Phi_4$	$[M - C_6H_5]^+$	198 (25)	215 (41)	
$\Phi_5$	$[M - C_6H_5CO]^+$	170 (20)	186 (12)	
$\Phi_6$	$[M - C_6H_5, CO, HCN]^+$			
$\Phi_7$	$[M - C_6H_3BrNH_2]^+$	105 (68)	105 (75)	121 (1)
$\Phi_8$	$[M - C_6H_3BrNH_2, CO]^+$	77 (100)	77 (100)	93 (40)
$\Phi_9$	$[M - C_6H_3BrNH_2, CO, C_2H_2]^+$			
$\Phi_{10}$	$[M - OH]^+$	258 (6,2)	274 (3,4)	274 (38)
$\Phi_{11}$	$[M - Br]^+$	196 (9)	212 (8)	212 (4)
$\Phi_{12}$	$[M - H, Br]^+$	195 (64)	211 (77)	211 (50)

Основные направления распада производных 2-аминобензофенонов и их метаболитов при электронном ударе

Индекс	Ион	m/z, %											
		(III)	(IIIa)	(IV)	(IVa)	(V)	(Va)	(Vb)	(Vc)	(Vd)	(Ve)	(Vf)	
M <sup>+</sup>	M <sup>+</sup>	309 (80)	325 (43)	309 (68)	325 (48)	309 (100)	325 (100)	325 (98,5)					
Ф <sub>1</sub>	[M-H] <sup>+</sup>	308 (70)	324 (29)	308 (64)	324 (35)	308 (24,5)	324 (28,5)	324 (28,1)					
Ф <sub>2</sub>	[M-H, CO] <sup>+</sup>					280 (1,5)	296 (1,4)	296 (4,7)					
Ф <sub>3</sub>	[M-H, CO, H] <sup>+</sup>												
Ф <sub>4</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl] <sup>+</sup>	198 (46)	214 (10)	198 (40)	214 (22)	198 (25,5)	198 (25)	198 (54,2)					
Ф <sub>5</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl, CO] <sup>+</sup>	170 (26)	186 (3)	170 (32)	186 (15)	170 (11,1)	170 (18)	170 (46,5)					
Ф <sub>6</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl, CO, HCN] <sup>+</sup>	143 (12)		143 (9)									
Ф <sub>7</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> BrNH <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>	139 (67)	139 (59)	139 (75)	139 (60)	139 (38,5)	155 (86)	155 (43,3)					
Ф <sub>8</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> BrNH <sub>2</sub> , CO] <sup>+</sup>	111 (100)	111 (100)	111 (100)	111 (100)	111 (30)	127 (15)	127 (15,8)					
Ф <sub>9</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> BrNH <sub>2</sub> , CO, C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ] <sup>+</sup>												
Ф <sub>10</sub>	[M-OH] <sup>+</sup>	292 (1)		292 (1)		292 (1,6)	308 (4,7)	308 (1,8)					
Ф <sub>11</sub>	[M-Br] <sup>+</sup>					230 (1,9)	245 (1,5)	245 (4,4)					
Ф <sub>12</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl, CO, Br] <sup>+</sup>	91 (60)	107 (18)	91 (73)	107 (36)	91 (17)	91 (68,5)	91 (95,6)					
Ф <sub>13</sub>	[M-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> BrNH <sub>2</sub> , CO, HCl] <sup>+</sup>	75 (68)	75 (56)	75 (56)	75 (50)								
Ф <sub>14</sub>	[M-Cl] <sup>+</sup>	274 (15)	290 (0,2)	274 (25)	290 (1)	274 (59,5)	290 (63,7)	290 (100)					
Ф <sub>15</sub>	[M-Cl, Br] <sup>+</sup>					195 (17,5)	211 (22,5)	211 (24,1)					

на 16 а.е.м. Присутствие пика иона  $[M-C_6H_4Cl, CO]^+$  и отсутствие пика иона  $[M-C_6H_4Cl, CO, HCN]^+$  однозначно (ввиду присутствия в кольце атома брома) определяет место оксигруппы в молекуле бензофенона:

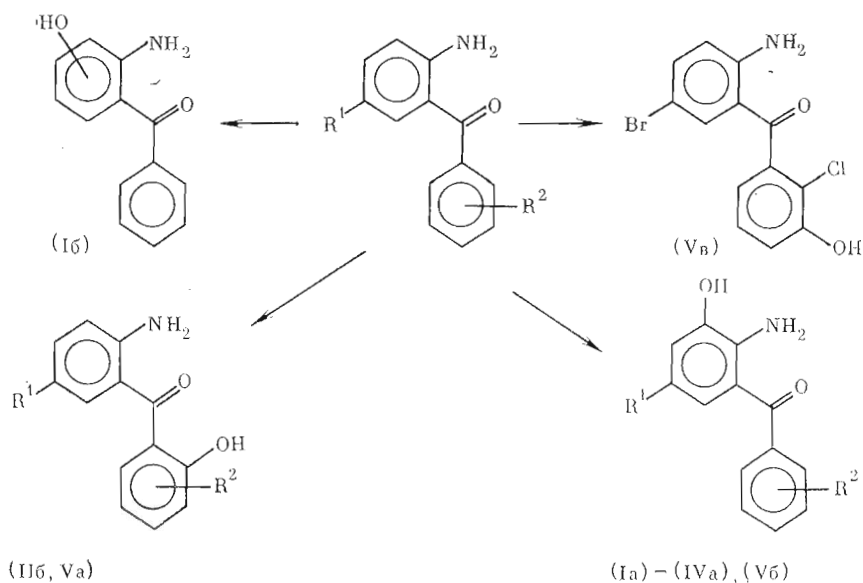


Фрагментация соединений (IV) и (IVa) аналогична фрагментации соединений (III) и (IIIa). Интенсивность пиков образующихся ионов отличается на 20—25% (табл. 3).

Особенности фрагментации соединений (V), (Va) — (Vb) и основные пути метаболизма соединения (V) в организме крыс, мышей и *in vitro* описаны нами ранее [3, 5, 6].

На основании изложенного мы можем охарактеризовать метаболиты (Ia)—(IVa) и (Vb) как 3-оксипроизводные 2-аминобензофенона (основной путь метаболизма в организме крыс), а также отметить образование соединений, гидроксильированных в *o*-положение фенильного (IIb) и *o*-хлорфенильного (Va) колец. Указанные бензофеноны являются продуктами гидролиза основных метаболитов соответствующих бензодиазепинов.

Интересно, что метаболит, гидроксильированный по 2-аминобензоильному фрагменту, но не в положение 3, отмечен только для незамещенного 2-аминобензофенона:

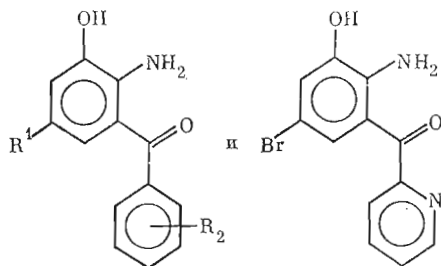


В дальнейшем оксипроизводные 2-аминобензофенона подвергаются глюкуроновой конъюгации и выводятся из организма крыс в виде свободных и конъюгированных соединений.

Настоящие исследования, а также литературные данные [2, 8, 9] показывают, что 2-аминобензофенон, а также 2-(2-амино-5-бромбензоил)-пиридин подвергаются в организме животных и человека интенсивному метаболизму с образованием 3-оксипроизводных (схема 3).

Данный процесс не зависит от природы радикалов  $R^1$  и  $R^2$ . Мы попытались объяснить некоторые механизмы окисления 2-аминобензофенона и 2-(2-амино-5-бромбензоил)-пиридина.

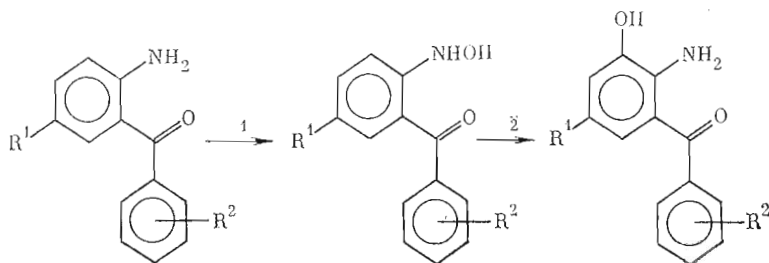
Во-первых, окисление названных субстратов осуществляется ферментными комплексами микросом гепатоцитов [4, 8]. Основную роль при этом



выполняют монооксигеназы, содержащие электронно-транспортную систему, специфичную к NADPH.

Во-вторых, исходя из общих механизмов ароматического гидроксирования [10], можно предположить, что этот процесс осуществляется за счет присоединения атома кислорода, активированного на цитохроме P-450, к двойной связи и образования соответствующего эпоксида. Впоследствии происходит изомеризация эпоксида до фенола, которая при физиологических условиях протекает довольно быстро. К сожалению, нет данных, свидетельствующих о миграции дейтерия или трития по кольцу, сопровождающей, как правило, ароматическое гидроксирование, идущее через промежуточное соединение эпоксидной природы.

Предполагается и другой вариант возможного окисления монооксигеназами исследуемых соединений в положении 3 их молекулы. В этом случае в качестве промежуточного продукта может образовываться соответствующий гидроксиламин:



При этом реакция 1 катализируется ферментами микросом печени экспериментальных животных, а реакция 2 — растворимой фракцией гепатоцитов. Об этом свидетельствует и тот факт [8], что выход 3-оксипроизводных 2-аминобензофенона увеличивается при добавлении в среду, содержащую микросомы печени животных, цитозоля.

### Экспериментальная часть

Исследуемые соединения вводили внутривенно (50 мг/кг) в твиновой эмульсии крысам-самцам линии Вистар массой 180—200 г. Животных содержали в течение 48 ч в метаболических клетках «Simax» (ЧССР), снабжая водой и стандартным пищевым рационом. Отбор проб мочи, извлечение конъюгированных метаболитов, хроматографическое разделение, идентификацию (включая цветные реакции), препаративное выделение исходных соединений и их метаболитов осуществляли как описано в предыдущих работах [2, 3]. Масс-спектрометрию производных 2-аминобензофенона проводили на приборе МХ-1303 при энергии ионизации 70 эВ и токе эмиссии 1,5 мА.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Богатский А. В., Андронати С. А., Головенко Н. Я. Транквилизаторы (1,4-бензодиазепины и родственные структуры). Киев: Наук. думка, с. 356.
2. Карасева Т. Л., Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Яворский А. С., Старовойт И. А., Фельдман Е. В., Абрамович Е. В. Тез. докл. Всесоюз. симпозиума «Цитохром P-450 — структура и функция». Минск, 1982, с. 33.



3. Головенко Н. Я., Зильковский В. Г. В кн.: Феназепам/Ред. Богатский А. В. Киев: Наук. думка, 1982, с. 32—36.
4. Stocklinsski A. W., Ware O. B., Oberst T. J. *Life Sci.*, 1980, v. 26, № 5, p. 365—369.
5. Богатский А. В., Зильковский В. Г., Головенко Н. Я., Андронати С. А., Яворский А. С., Шарбатян П. А. Докл. АН УССР. Сер. Б, 1979, т. 11, с. 943—947.
6. Головенко Н. Я., Зильковский В. Г., Богатский А. В., Шарбатян П. А., Андронати С. А. *Хим.-фармацевт. журн.*, 1980, № 4, с. 15—21.
7. Шарбатян П. А. Масс-спектрометрическое исследование бензодиазепинов и их производных. Автореф. дис. на соискание уч. степени канд. хим. н. МГУ, 1975, с. 18.
8. Sawada H., Hara A., Kido A., Fucumoto M. *J. Pharm. Soc. Jap.*, 1974, v. 94, № 8, p. 991—997.
9. Sawada H., Hara A. *J. Pharm. Soc. Jap.*, 1979, v. 99, № 1, p. 30—37.
10. Головенко Н. Я. Механизмы реакций метаболизма ксенобиотиков в биологических мембранах. Киев: Наук. думка, 1981, с. 256.

Поступила в редакцию

5.V.1985

После доработки

26.IX.1985

### MASS-SPECTROMETRIC ANALYSIS OF 2-AMINOBENZOPHENONE DERIVATIVES AND THEIR METABOLITES

GOLOVENKO N. YA., ZINKOVSKY V. G., ANDRONATI S. A., YAVORSKY A. S.

*A. V. Bogatsky Physico-Chemical Institute, Academy of Sciences  
of the Ukrainian SSR, Odessa*

Mass-spectrometry analysis was carried out for 2-aminobenzophenone, its halogen derivatives and metabolites formed in the rat organism. The characteristic fragmentation patterns were outlined for the products arising on hydroxylation of the above compounds. The structural specificity in the oxidation of 2-aminobenzophenones was found to be different from that predominant in hydroxylation of phenyl (*o*-chlorophenyl) ring of 1,4-benzodiazepines which give on hydrolysis the respective benzophenones.