



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10891

Исследование маршрута реакции 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амина с N-(4-фторфенил)итаконимидом методом ВЭЖХ-МС

Яна Юрьевна Шмойлова¹✉, Данила Эдуардович Иванов¹,
Юрий Александрович Ковыгин¹, Хидмет Сафарович Шихалиев¹

¹Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия, shmoylovay@gmail.com✉

Аннотация. Современный рациональный дизайн структур органических соединений требует высокой эффективности вследствие необходимости одновременного повышения молекулярной сложности и минимизации числа стадий синтетических процедур. Эти проблемы становятся еще более значимыми при конструировании различных полиазагетероциклических матриц, в том числе с пиразолопиридиновым скелетом, являющимся одним из распространенных фрагментов в структурах природных и синтетических биологически активных соединений. Получение новых полизамещенных гетероциклических соединений – сложный многостадийный процесс, включающий как последовательные, так и параллельные стадии, осложняющие контроль реакции и выделение продуктов. Кроме этого, основной проблемой при исследовании каскадных реакций с использованием различных полинуклеофильных реагентов является определение очередности процессов, приводящих к целевым продуктам. Поэтому, актуальными являются задачи, связанные с изучением механизмов образования гетероциклических систем и идентификацией промежуточных соединений, возможность индивидуализации которых весьма затруднительна.

В настоящее время масс-спектрометрия является селективным, высокочувствительным и экспрессным методом для определения различных типов соединений в многокомпонентных пробах. Это позволяет применять высокоэффективную жидкостную хроматографию в сочетании с масс-спектрометрией (ВЭЖХ/МС) в исследовании маршрутов сложных реакций для идентификации продуктов и интермедиатов. В отличие от широко применяющегося метода ТСХ, ВЭЖХ/МС даёт возможность предварительно оценить компоненты реакционной массы по масс-спектрометрическим данным.

Цель данного исследования – разработка эффективной методики контроля синтетического процесса между N-(4-фторфенил)итаконимидом 1 и 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амина 2, для идентификации конечных продуктов и возможных промежуточных соединений. Взаимодействие между реагентами проводилось при кипячении в изопропиловом спирте в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в течение нескольких часов. Пробы для хроматографирования отбирались из реакционной массы через определенные промежутки времени. При интерпретации результатов хроматографического анализа установлено, что в ходе реакции помимо ожидаемого N-(4-фторфенил)-2-(6-оксо-1,3-дифенил-4,5,6,7-тетрагидро-1Н-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)ацетамида 5 образуется 7-(4-фторфенил)-1,3-дифенил-4,4а,5,7-тетрагидропиразоло[3,4-*b*]пирроло[3,2-*e*]пиридин-6(1Н)-она 6. Показано, что в реакционной массе присутствуют два минорных компонента, очевидно являющиеся интермедиатами.

Ключевые слова: ВЭЖХ, масс-спектрометрия, арилитаконимид, 5-аминопиразол, рециклизация.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2022-2024 годы, проект № FZGU-2022-0003.

Для цитирования: Шмойлова Я.Ю., Иванов Д.Э., Ковыгин Ю.А., Шихалиев Х.С. Исследование маршрута реакции 1,3-дифенил-1Н-пиразол-5-амина с N-(4-фторфенил)итаконимидом методом ВЭЖХ-МС // *Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 6. С. 849-855.* <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10891>



Original article

A study of the reaction route of 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine with N-(4-fluorophenyl)itaconimide by HPLC-MS

Yana Yu. Shmoilova¹✉, Danil E. Ivanov¹, Yuri A. Kovygin¹, Khidmet S. Shikhaliev¹

¹Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, shmoilovay@gmail.com✉

Abstract. The modern rational design of the structure of organic compounds needs to be highly efficient to allow both increasing molecular complexity and minimising the number of steps in synthetic procedures. These problems are even more relevant when designing various polyazaheterocyclic matrices, including those with a pyrazolopyridine backbone, which is one of the common fragments in the structures of natural and synthetic biologically active compounds. The preparation of new polysubstituted heterocyclic compounds is a complex multi-step process involving both consecutive and parallel steps that complicate the control of the reactions and product separation. In addition, the main problem associated with the study of cascade reactions using various polynucleophilic reagents is to determine the order of processes leading to the target products. Therefore, the problems associated with the study of the mechanisms of the formation of heterocyclic systems and the identification of intermediates, whose individualisation is very difficult, are relevant.

Currently, mass spectrometry is a selective, highly sensitive, and rapid method for determining different types of compounds in multi-component samples. This allows using high-performance liquid chromatography in combination with mass spectrometry (HPLC/MS) to study routes of complex reactions to identify their products and intermediates. Unlike the widely used TLC method, HPLC/MS makes it possible to preliminarily estimate the components of the reaction mass from mass spectrometry data.

The purpose of this study is to develop an effective method for controlling the synthetic process between N-(4-fluorophenyl)itaconimide 1 and 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine 2 to identify the final products and possible intermediates. The reaction with the reactants was carried out when boiled for several hours in isopropyl alcohol in the presence of catalytic amounts of acetic acid. Samples for chromatography were taken from the reaction mass at specified intervals. Interpretation of the chromatographic analysis results revealed that in addition to the expected N-(4-fluorophenyl)-2-(6-oxo-1,3-diphenyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridin-5-yl)acetamide 5, 7-(4-fluorophenyl)-1,3-diphenyl-4,4a,5,7-tetrahydropyrazolo[3,4-b]pyrrolo[3,2-e]pyridin-6(1H)-one 6 was formed during the reaction. It was shown that the reaction mass had two minor components, which were obviously intermediates.

Keywords: HPLC, mass spectrometry, arylitaconimide, 5-aminopyrazole, recycling.

Acknowledgments: the work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation in the framework of the government order to higher education institutions in the sphere of scientific research for years 2022-2024, project No. FZGU-2022-0003.

For citation: Shmoilova Ya.Yu., Ivanov D.E., Kovygin Yu.A., Shikhaliev Kh.S. A study of the reaction route of 1,3-diphenyl-1H-pyrazol-5-amine with N-(4-fluorophenyl)itaconimide by HPLC-MS. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(6): 849-855. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10891>

Введение

Синтез полизамещённых гетероциклических систем – сложный многостадийный процесс, включающий как последовательные, так и параллельные стадии, осложняющие контроль реакции и выделение продуктов. Таким образом, актуальной задачей является разработка эффективных методов контроля этих синтетических процессов и установления структуры полученных продуктов. Для её решения необходимы сведения о строе-

нии промежуточных соединений, возможность индивидуализации которых весьма затруднительна. Однако использование метода ВЭЖХ/МС позволяет анализировать интермедиаты и конечные продукты реакций, проходящих в жидкой фазе, без выделения их из реакционной массы [1-5]. Гетероциклическая система пиразолопиридина, является основой структуры многочисленных биологически активных соединений. Так, среди производных пиразоло[3,4-*b*]пиридина обнаружены антагонисты аденозиновых

рецепторов A1 и ингибиторы киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3). Кроме того, производные пиразоло[3,4-*b*]пиридина находят применение в терапии ВИЧ, болезни Альцгеймера, наркомании, бесплодия [6-12]. Следует также отметить, что некоторые полиазагетероциклы применяются в качестве добавок в процессах электрохимического меднения [13-14].

В данной работе нами описана возможность использования метода ВЭЖХ/МС в качестве инструмента для исследования возможных интермедиатов взаимодействия *N*-арилитаконимида **1** с легкодоступными 1,3-дизамещенным-1*H*-пиразол-5-амином **2** (схема 1).

Экспериментальная часть

Общая методика синтеза *N*-(4-фторфенил)-2-(6-оксо-1,3-дифенил-4,5,6,7-тетрагидро-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)ацетамида **5** и 7-(4-фторфенил)-1,3-дифенил-4,4а,5,7-тетрагидропиразоло[3,4-*b*]пирроло[3,2-*e*]пиридин-6(1*H*)-она **6**. Раствор *N*-(4-фторфенил)-итаконимида **1** (25 ммоль) и 1,3-дифенил-1*H*-пиразол-5-амина **2** (25 ммоль) кипятили в изопропиловом спирте (50 см³) в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в течение 10 часов. Образовавшийся осадок отфильтровали и перекристаллизовали из смеси метанола и ДМФА, 2:1 с выделением чистого **5**, фильтрат упарили и перекристаллизовали из метанола с выделением чистого **6**.

Анализ смесей осуществляли на приборе Agilent Technologies 1260 infinity (США) с масс-детектором Agilent 6230 TOF LC/MS (времяпролетный детектор масс высокого разрешения, производства США), метод ионизации – двойное электрораспыление (dual-ESI). Запись и регистрация сигналов проводилась в положительной полярности; небулайзер (N₂) 20 psig, газ-осушитель (N₂) 6 мл/мин, 325 °С; диапазон обнаружения масс составляет 50-2000 Дальтон. Напряжение на капилляре 4.0 кВ, фрагментаторе +191 В, скиммере +66 В, OctRF 750 В. Условия хроматографирования: колонка Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 50 мм; 2.7 мкм). Градиентное элюирование: ацетонитрил (А)/вода (Б) (0.1 % муравьиной кислоты) начало – А:Б = 60:40 в течение 1,5 мин, далее А 60 – 100% за 4 минуты, затем А – 100% до конца анализа; скорость потока 0.4 мл/мин. Программное обеспечение для обработки результатов исследований – MassHunter Workstation / Data Acquisition V.06.00.

Обсуждение результатов

Ввиду полифункциональности предшественников **1** и **2** в ходе реакции может образовываться несколько альтернативных продуктов. Ранее нами показано [15], что основным продуктом взаимодействия является полизамещенный пиразоло[3,4-*b*]пиридин **5**. Предполагаемый маршрут реакции включает несколько стадий: на

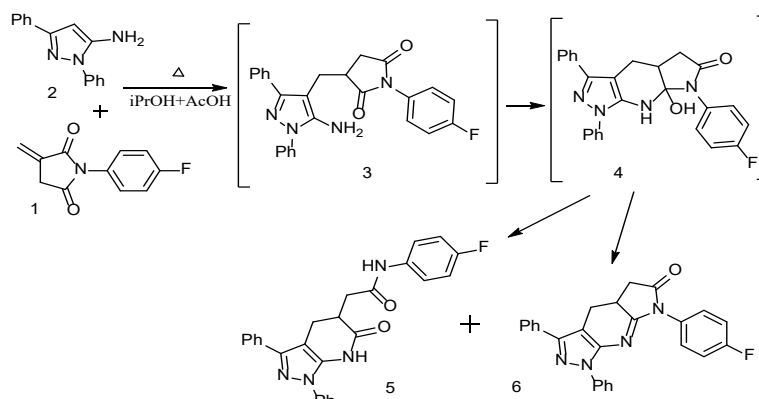


Схема 1. Целевая реакция процесса.
Scheme 1. Target reaction of the process.

первой стадии взаимодействия реализуется С-нуклеофильное присоединение по Михаэлю енамина по активированной кратной связи имида с образованием промежуточного линейного соединения **3**. Затем следует внутримолекулярное присоединение аминогруппы по имидной связи с образованием трициклического аддукта **4**. Который в свою очередь может рециклизоваться в соответствующий пиразоло[3,4-*b*]пиридин **5** или подвергнуться дегидратации без раскрытия цикла с образованием **6**.

Модельным процессом было выбрано взаимодействие итаконимида **1** и енамина **2** при кипячении в изопропиловом спирте в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты в течение нескольких часов. Пробы для хроматографирования объемом 0,05 мл отбирались из реакционной массы через определенные промежутки времени: 1, 10, 30, 60,

150, 300, 600 минут, при помощи автоматической пипетки (HTL lab solutions discovery comfort DV200/20-200 мкл) и разбавлялись ацетонитрилом (для ВЭЖХ) в 50 раз.

На приведенных ниже хроматограммах реакционной массы, (рис. 1-8), наряду с пиками исходных реагентов (**1** и **2**) можно увидеть пики продуктов реакции и возможных интермедиатов. На основании данных о реакционной способности 1,3-дифенил-1*H*-пиразол-5-амина **2** [15], нами были сделаны следующие выводы при интерпретации результатов хроматографического анализа.

При смешивании реагентов и кипячении в течение 1 минуты в реакционной массе помимо исходных реагентов **1** и **2** сразу появляются еще два пика **3** (сигнал при 2.777 мин.) и **4** (сигнал при 3.777 мин.) (рис. 6). В масс-спектре соединения

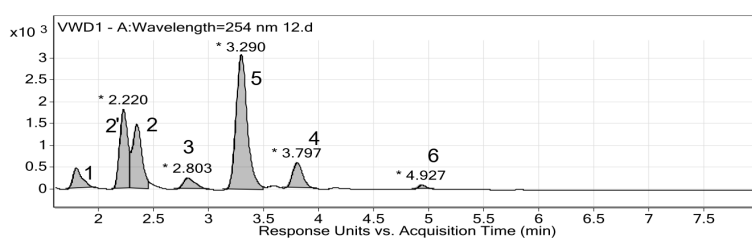


Рис. 1. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси.
Время реакции 600 мин.

Fig. 1. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 600 min.

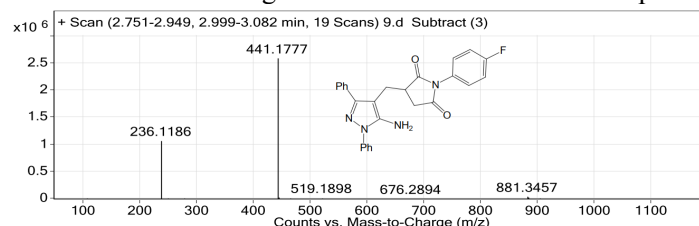


Рис. 2. Масс-спектр, соответствующий пику 3.
Fig. 2. Mass spectrum corresponding to peak 3.

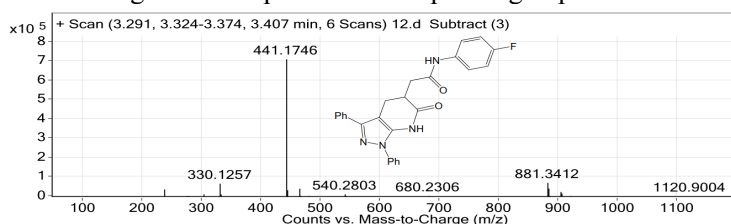


Рис. 3. Масс-спектр, соответствующий пику 5.
Fig. 3. Mass spectrum corresponding to peak 5.

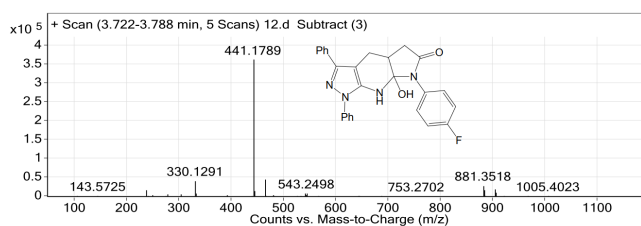


Рис. 4. Масс-спектр, соответствующий пику 4.

Fig. 4. Mass spectrum corresponding to peak 4.

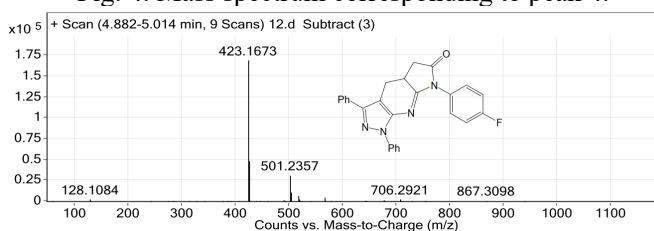


Рис. 5. Масс-спектр, соответствующий пику 6.

Fig. 5. Mass spectrum corresponding to peak 6.

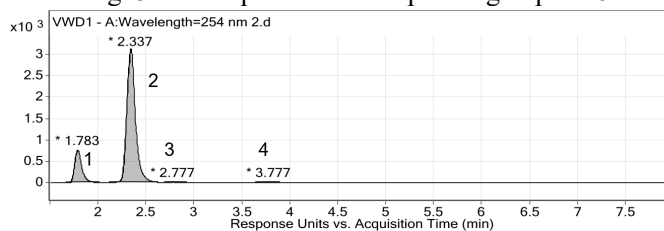


Рис. 6. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси.

Время реакции 1 мин.

Fig. 6. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 1 min.

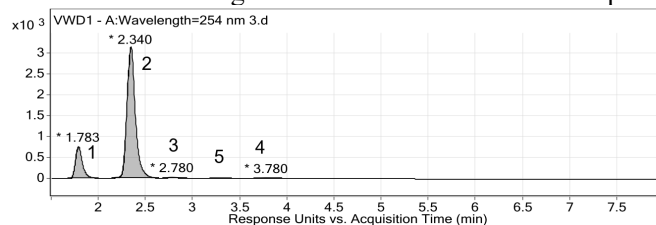


Рис. 7. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси.

Время реакции 10 мин.

Fig. 7. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 10 min.

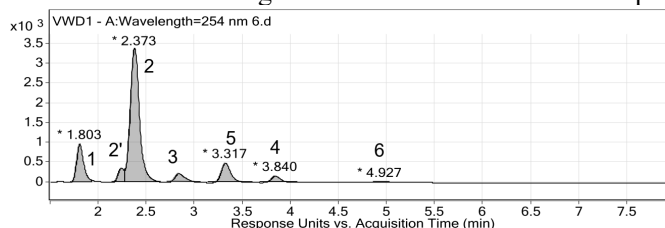


Рис. 8. Интегрированная сканированная хроматограмма реакционной смеси. Время реакции 60 мин.

Fig. 8. Integrated scanned chromatogram of the reaction mixture. Response time: 60 min.

3 (рис. 2) отмечается высокая интенсивность пика с массой 236, соответствующего исходному дифениламинопиразолу, в то время, как в спектре компонента **4** (рис. 4) и целевого пиразолопиридина **5**

(рис. 3) интенсивность данного пика существенно меньше. Это позволяет предположить, что компонент **3** является аддуктом Михаэля, а соединение **4** – циклическим интермедиатом трансамидирования.

В пробе, взятой по истечении 10 минут появляется еще один пик **5** (3.290 мин) (рис. 7). После 60 минут кипячения реакционной массы, на хроматограмме (рис. 8) значительно увеличивается площадь пика **5** и начинает появляться еще два пика: **2'**, отвечающий компоненту с массой молекулярного иона 278, вероятно являющемуся ацилированным аминопиразолом и пик альтернативного продукта **6** с массой молекулярного иона 423 (4.927 мин.).

По истечении 600 мин, преобладающим на хроматограмме (рис. 1) становится пик продукта **5**, причём при дальнейшем кипячении реакционной массы площадь его не увеличивается, что свидетельствует об окончании реакции.

Заключение

Таким образом, при помощи метода ВЭЖХ/МС установлено, что реакция

Список литературы/References

1. Medvedeva S.M., Shikhaliev Kh.S., Krylsky D.V., Gotsak I.V. New multicomponent method for the synthesis of polyhydrogenated pyrazino[1,2-a]quinolines. *Chemistry of heterocyclic compounds*. 2016; 52(5): 309-315. (In Russ.)

2. Shikhaliev Kh.S., Selemenev V.F., Medvedeva S.M., Ponomareva L.F. Mass-spectrometric analysis of 1-acyl-2,2,5-trimethyl-4,4-dichlorocyclopropane[c]quinolines. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2014; 14(2): 332-337. (In Russ.)

3. Polikarchuk V.A., Potapov A.Yu., Razumova V.E., Verezhnikov V.N., Shikhaliev Kh.S., Kostyukov V.F., Stolpovskaya N.V. HPLC-mass-spectrometric analysis of a three-component reaction with the participation of 4-hydroxy-2(1H)-quinolone and various aminoazoles. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2020; 20(6): 734-741. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2020.20/3141> (In Russ.)

между *N*-арилитаконимидом **1** и легкодоступным 1,3-дифенил-1*H*-пиразол-5-амином **2** протекает в течение 10 часов и приводит, через стадии образования интермедиатов **3** и **4** к образованию пиразолопиридина **5** и альтернативного пирролопиридинопиперазола **6**, очевидно, являющегося продуктом дегидратации общего для них интермедиата **4**. Данные о фрагментации промежуточных соединений позволяют предварительно приписать им структуры аддукта Михаэля и циклического интермедиата.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

4. Vandyshev D.Yu., Shikhaliev Kh.S., Potapov A.Yu., Krysin M.Yu., Kokonova A.V. Chromato-mass-spectrometric analysis of the reaction route between 1,2-diaminoimidazole and 1-aryl-3-(dimethylamino)prop-2-en-1-one. *Sorbtionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2017; 17(3): 490-495. (In Russ.)

5. Manetti F., Schenone S., Bondavalli F., Brullo C., Bruno O., Ranise A., Botta M. Synthesis and 3D QSAR of new pyrazolo[3,4-b]pyridines: potent and selective inhibitors of A1 adenosine receptors. *J. of Med. Chem.* 2005; 48: 7172-7185. <https://doi.org/10.1021/jm050407k>

6. Falcó J.L., Lloveras M., Buiria I., Teixidó J., Borrell J.I., Guglietta A. Design, synthesis and biological activity of acyl substituted 3-amino-5-methyl-1, 4, 5, 7-tetrahydropyrazolo[3,4-b]pyridin-6-ones as potential hypnotic drugs. *Eur. J. Med. Chem.* 2005; 40: 1179-1187. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.06.008>

7. (a) Witherington, J., Bordas, V., Garland, S. L., Hickey, D. M., Ife, R. J., Liddle, J., Ward, R. W. 5-Aryl-pyrazolo[3,4-b]pyridines: potent inhibitors of glycogen



synthase kinase-3 (GSK-3). *Bioorganic medicinal chemistry letters*. 2003; 13(9): 1577-1580.

8. Chavva K., Pillalamarri S., Banda V., Gautham S., Gaddamedi J., Yedla P., Banda N. Synthesis and biological evaluation of novel alkyl amide functionalized trifluoromethyl substituted pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives as potential anticancer agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2013; 23: 5893-5895. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.089>

9. Ghaedi A., Bardajee G.R., Mirshokrayi A., Mahdavi M., Shafiee A., Akbarzadeh T., Facile, novel and efficient synthesis of new pyrazolo[3,4-b]pyridine products from condensation of pyrazole-5-amine derivatives and activated carbonyl groups. *RSC Adv.* 2015; 5: 89652-89658. 5893-5895. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.089>

10. Hamblin J.N., Angell T.D, Ballantine S.P., Cook C.M., Cooper A.W., Dawson J.W. Pyrazolopyridines as a novel structural class of potent and selective PDE4 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008; 8: 4237-4241.

11. Tucker T.J., Jeffrey T.K., Yong Li Z., Nobuyoshi Y., Yangfeng Z. Patent W02009117278A2 2009.

12. Sharma P. K., Singh K., Kumar S., Kumar P., Dhawan S. N., Lal Dannhardt S. G. A close look into the biological and synthetic aspects of fused pyrazole derivatives. *Med. Chem. Res.* 2011; 20: 239-244.

13. Zhou J. Li, G., Hong Y., Wang C., W. He, S. Wang, Y. Chen, Z. Wen, Q. Wang. Copolymer of pyrrole and 1, 4-butanediol diglycidyl as an efficient additive leveler for through-hole copper electroplating. *ACS Omega.* 2020; 5(10): 4868-4874.

14. Yang S., Thacker Z., Allison E., Bennett M., N. Cole, P. Pinhero, Electrodeposition of copper for three-dimensional metamaterial fabrication. *ACS Applied Materials Interfaces.* 2017; 9(46): 40921-40929. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04721>

15. Shmoylova Ya.Yu., Kovygin Yu.A., Kosheleva E.A., Shikhaliev K.S., Ledeneva I.V., Present M.A. Efficient synthesis of tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridines based on the recyclization of N-arylitacetonimides from aminopyrazoles. *Mendeleev Communications.* 2022; 32(5): 688-690. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.09.041>

Информация об авторах / Information about the authors

Я.Ю. Шмойлова – аспирант кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Д.Э. Иванов – студент кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ю.А. Ковыгин – к.х.н., доцент кафедры органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Х.С. Шихалиев – д.х.н., профессор, заведующий кафедрой органической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Ya.Yu. Shmoylova – postgraduate, Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: shmoylovay@gmail.com

D.E. Ivanov – student, Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: danila_ivanov_0000@mail.ru

Yu.A. Kovygin – Ph.D, Associate Professor, Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: kovygin@chem.vsu.ru

Kh.S. Shikhaliev – grand Ph.D, Professor, Head of the Department of Organic Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation, E-mail: shikh1961@yandex.ru

Статья поступила в редакцию 10.11.2022; одобрена после рецензирования 07.12.2022; принята к публикации 21.12.2022.

The article was submitted 10.11.2022; approved after reviewing 07.12.2022; accepted for publication 21.12.2022.