



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11789

Применение методов ТСХ и ВЭЖХ/МС в исследовании взаимодействия *N*-фениллитаконимида с 3-метил-1-фенил-5-аминопиразолом

Яна Юрьевна Шмойлова[✉], Юрий Александрович Ковыгин,
Хидмет Сафарович Шихалиев, Дмитрий Юрьевич Вандышев

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

Аннотация. Метод тонкослойной хроматографии (ТСХ) широко используется для экспрессного анализа реакционных масс в тонком органическом синтезе. Применение его позволяет не только оценивать чистоту веществ и идентифицировать отдельные компоненты, но и следить за ходом синтеза [1-3]. Для достоверной идентификации большого числа веществ в многокомпонентных системах и установления степени конверсии исходных веществ может использоваться метод ВЭЖХ-МС анализа [4-6].

Ранее было показано, что *N*-ариллитаконимиды легко рециклизуются различными бинуклеофилами при их совместном кипячении в различных растворителях, однако данные о выборе условий проведения реакции были разрозненны и не систематизированы. Целью данной работы является обоснованный выбор оптимальных условий синтеза пиразоло[3,4-*b*]пиридина, образующегося в ходе взаимодействия *N*-фениллитаконимида и 3-метил-1-фенилпиразол-5-амина, на основании мониторинга за ходом протекания реакции с применением комбинации хроматографических методов.

Взаимодействие компонентов проводилось в среде малополярных, а также полярных протонных и апротонных растворителей. Для контроля полноты протекания реакции применялся метод тонкослойной хроматографии на пластинах TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) элюенты – хлороформ, метанол и их смеси в различном соотношении. Соотнесение компонентов реакционной массы с декларируемыми структурами осуществлено на основании данных ВЭЖХ/МС-анализа.

Показано, что взаимодействие *N*-фениллитаконимида с 3-метил-1-фенилпиразол-5-амином во всех исследуемых системах в течение 10-15 часов не приводит к полной конверсии реагентов. Использование апротонных растворителей, как полярных так и малополярных не позволяет добиться препаративно значимых выходов целевого продукта. В протонных растворителях выходы пиразоло[3,4-*b*]пиридина существенно выше. Показано также, что увеличение протонодонорных свойств среды за счёт добавления уксусной кислоты приводит к более полной конверсии реагентов.

Данные ТСХ и ВЭЖХ/МС хорошо соотносятся со значениями препаративных выходов пиразоло[3,4-*b*]пиридина. Установлено, что наиболее подходящей средой для проведения синтеза является смесь пропан-2-ола и уксусной кислоты в соотношении 25:1.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, синтез, пиразоло[3,4-*b*]пиридин.

Благодарности: работа выполнена при поддержке гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-4978.2022.1.3).

Для цитирования: Шмойлова Я.Ю., Ковыгин Ю.А., Шихалиев Х.С., Вандышев Д.Ю. Применение методов ТСХ и ВЭЖХ/МС в исследовании взаимодействия *N*-фениллитаконимида с 3-метил-1-фенил-5-аминопиразолом // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2023. Т. 23, № 6. С. 1124-1133. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11789>



Original article

Application of TLC and HPLC/MS methods in the study of the interaction of N-phenylitaconimide with 3-methyl-1-phenyl-5-aminopyrazole

Yana Yu. Shmoilova[✉], Yuri A. Kovygin, Khidmet S. Shikhaliev, Dmitry Yu. Vandyshev
Voronezh State University, Voronezh, Russia, shmoylovay@gmail.com[✉]

Abstract. The thin layer chromatography (TLC) method is widely used for the rapid analysis of reaction masses in fine organic synthesis. The use of this method allows not only assessing the purity of substances and identify individual components, but also to monitor the progress of synthesis. To reliably identify a large number of substances in multicomponent systems and determine the degree of conversion of starting substances, the HPLC-MS analysis method can be used.

It was previously shown that N-arylitaconimides are easily recycled by various binucleophiles when they are boiled together in various solvents, but data on the choice of reaction conditions were scattered and unsystematized. The purpose of this study was to investigate the possibility of combining several chromatographic methods to control and optimize the synthesis of pyrazolo[3,4-b]pyridine formed during the reaction N-phenylitaconimide and 3-methyl-1-phenyl-pyrazol-5-amine.

The interaction of the components was carried out in low-polar as well as polar protic and aprotic solvents. For the control of the completeness of the reaction, thin layer chromatography on TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) plates was used, chloroform, methanol and their mixtures in various ratios were used as eluents. The components of the reaction mass were correlated with the declared structures using HPLC/MS studies.

It was shown that the interaction of N-phenylitaconimide with 3-methyl-1-phenylpyrazol-5-amine in all studied systems for 10-15 hours did not lead to the complete conversion of the reagents. The use of aprotic solvents, both polar and low-polar, did not allow obtaining preparatively significant yields of the target product. In protic solvents, the yields of pyrazolo[3,4-b]pyridine were significantly higher. It was also shown that an increase in the protonogenicity of the medium due to the addition of acetic acid led to a more complete conversion of the reagents.

The TLC and HPLC/MS data correlated well with the data on the preparative yields of pyrazolo[3,4-b]pyridine. It was found that the most suitable medium for synthesis was a mixture of propan-2-ol and acetic acid in a ratio of 25:1.

Keywords: thin layer chromatography, high performance liquid chromatography, synthesis, pyrazolo[3,4-b]pyridine.

Acknowledgments: the work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists – candidates of sciences (project МК-4978.2022.1.3).

For citation: Shmoilova Ya.Yu., Kovygin Yu.A., Shikhaliev Kh.S., Vandyshev D.Yu. Application of TLC and HPLC/MS methods in the study of the interaction of N-phenylitaconimide with 3-methyl-1-phenyl-5-aminopyrazole. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(6): 1124-1133. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11789>

Введение

Несмотря на то, что химия пиразоло[3,4-b]пиридинов изучается довольно давно, и на сегодняшний день накоплен обширный материал по способам получения разнообразных производных [1-10], разработка новых методик синтеза и подбор оптимальных условий для проведения этих процессов не утратили актуальности. Интерес к построению данной матрицы прежде всего обусловлен ее структурным сходством с пуриновыми основаниями, что объясняет,

например, конкурентное ингибирование киназы гликогенсинтазы-3 (GSK-3) [11-12]. Пиразоло[3,4-b]пиридины находят применение в качестве антимикробных [12], противоопухолевых [12-14], противовирусных [15], противовоспалительных [16] препаратов.

Одним из способов синтеза пиразоло[3,4-b]пиридинов является конденсация аминопиразола с α,β -ненасыщенными реагентами. Так, 3-метил-1,4-дифенил-1H-пиразоло[3,4-b]пиридин образуется в реакции 3-метил-1-фенилпиразол-5-амин и 1-фенил-3-диметиламинопроп-

2-ен-1-она [17]. Замещенные пиразоло[3,4-*b*]пиридины могут быть получены при циклизации аминопиразолов с арилиденпировиноградными кислотами [18], бензилиденовыми производными малондинитрила [18] или с метоксиметиленовыми [19] и бензилиденовыми производными кислоты Мельдрума [20-21]. Альтернативные варианты построения пиразоло[3,4-*b*]пиридиновой системы реализуются, например, в ходе реакции гидразина с 3-ацетил- [22], 3-карбоксо- [23] или 3-цианопиридинами [24], содержащими уходящую группу во втором положении. Также взаимодействие 2-хлор-3-цианопиридина и гидразина является широко используемым методом получения 3-аминопиразоло[3,4-*b*]пиридина [24-25]. Стоит подчеркнуть, что подавляющее большинство публикаций посвящено полностью ароматизированным пиразоло[3,4-*b*]пиридинам.

Проблема поиска полифункциональных и легкодоступных субстратов для синтеза разнообразных неароматических (гидрированных) гетероциклических соединений, является одной из ключевых в современной синтетической органической химии. В этом отношении обращают на себя внимание *N*-арилитаконимиды, взаимодействие которых с различными реагентами может приводить к образованию большого числа гидрированных гетероциклических систем [26-27]. Следует также отметить, что некоторые получаемые таким образом полиазагетероциклы применяются в качестве добавок в процессах электрохимического осаждения металлов [28-29].

В рамках обозначенной проблемы, цель данной работы заключалась в обоснованном выборе оптимальных условий синтеза пиразоло[3,4-*b*]пиридина, образующегося в ходе взаимодействия *N*-фенилитаконимида и 3-метил-1-фенилпиразол-5-амина, на основании мониторинга за ходом протекания реакции с применением комбинации хроматографических методов.

Экспериментальная часть

Исходный 3-метил-1-фенил-1*H*-пиразол-5-амин **1** и *N*-фенилитаконимид **2** являются коммерческими препаратами, доступными в компании «Alinda Chemical».

Методика синтеза метил 2-(3-метил-6-оксо-1-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)-*N*-фенилацетамида **5**. К 5 ммоль аминопиразола **1**, растворенного в 5 см³ изопропилового спирта с добавлением уксусной кислоты (0.2 см³), прибавляли 5 ммоль *N*-фенилитаконимида **2**. Реакционную массу кипятили в круглодонной колбе, снабженной обратным холодильником, в течение 10 часов. Образовавшиеся кристаллы отфильтровывали и перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Выход 50%, т.пл. 253-255°C. ¹H ЯМР, (δ, мд., J/Hz): 10.44 (с, 1H, NH); 10.23 (с, 1H, NH); 7.29-6.95 (м, 10H, Ar); 3.01-3.09 (м, 1H, CH); 2.85 (дд, J₁=15.6, J₂=5.8, 1H, CH₂exo); 2.78 (дд, J₁=15.0, J₂=7.9, 1H, CH₂endo); 2.49-2.53 (м, 1H, CH₂exo); 2.46 (дд, 1H, J₁=15.1, J₂=7.8, CH₂endo); 2.10 (с, 3H, CH₃). ¹³C ЯМР (δ, мд.): 171.8; 169.9; 153.6-152.0; 138.0; 145.0; 138.1; 136.4; 129.1; 126.5; 122.4; 120.3; 119.1; 119.0; 116.7; 100.2; 37.4; 36.6; 21, 9; 11.7. Найдено, m/z: 360.1171 [M+H]⁺, вычислено, m/z: 360.1176 [M+H]⁺.

Для проведения анализа реакционной массы методом ТСХ в качестве подвижной фазы (ПФ) использовали хлороформ, метанол, а также их смеси в соотношении 20:1, 10:1, 5:1. Компоненты ПФ смешивали непосредственно перед анализом, время насыщения камеры составляло 10 минут. Пробоподготовка заключалась в растворении 400 мкг анализируемого образца в 0.5 см³ диметилформамида. Хроматографирование проводилось на пластине TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck) длиной 4 см. Объем пробы – 1 мкл. Для проявления хроматографических зон пластину помещали в УФ камеру или обрабатывали парами йода. Все используемые реактивы имели степень чистоты не менее «х.ч».

ЯМР ^1H и ^{13}C спектры были зарегистрированы на спектрометре BrukerDRX-500 (500.13 МГц и 125 МГц) в DMSO-D_6 с внутренним стандартом TMS. ВЭЖХ/МС анализ проводили на приборе Agilent Technologies 1260 infinity с масс-детектором Agilent 6230 TOF LC/MS (времяпролетный детектор масс высокого разрешения), метод ионизации – двойное электрораспыление (dual-ESI). Запись и регистрация сигналов проводилась в положительной полярности; небулайзер (N_2) 20 psig, газосушитель (N_2) 6 $\text{cm}^3/\text{мин}$, 325°C; 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/вода (0.1 % муравьиной кислоты); скорость потока 0.4 $\text{cm}^3/\text{мин}$. Программное обеспечение для обработки результатов исследований – MassHunter Workstation/Data Acquisition V.06.00. Температуры плавления определены на приборе Stuart SMP30.

Обсуждение результатов

Нами были изучены условия реакции между 3-метил-1-фенил-5-аминопиразолом **1** и *N*-фенилитаконимидом **2** в различных средах и на основании данных хроматографического анализа выбраны оптимальные. В качестве растворителей были исследованы полярные протонные – изопропиловый спирт, метанол, уксусная кислота, полярный апротонный *N,N*-диметилформамид, малополярные апротонные – толуол, 1,4-диоксан. Было показано, что применение индивидуальных растворителей приводит либо к незначительной конверсии исходных реагентов, либо к образованию неразделимых смесей. Ранее нами было установлено, что реакции гетероциклизации с участием итаконимидов и различных бинуклеофилов протекают с большей скоростью при

использовании кислотного катализа (уксусной кислоты) [30-32]. Установлено, что и в исследуемом процессе рециклизации *N*-фенилитаконимида добавление к выбранным растворителям каталитических количеств уксусной кислоты оказалось эффективным.

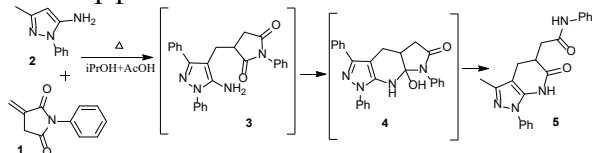
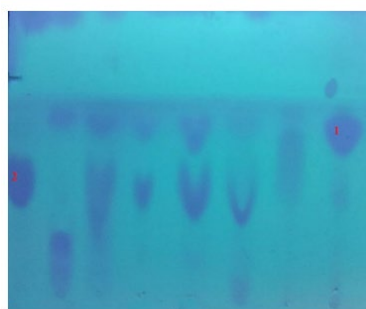


Схема 1.

Ранее нами было показано [33], что взаимодействие исследуемых реагентов **1** и **2** при кипячении в пропанол-2 с каталитическим количеством уксусной кислоты приводит к образованию 2-(3-метил-6-оксо-1-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)-*N*-фенилацетамида **5**. Вероятно, на первой стадии реализуется нуклеофильное присоединение нуклеофильного атома углерода аминопиразола **2** к активированной кратной связи *N*-фенилитаконимида **1** с образованием промежуточного аддукта Михаэля **3**. На второй стадии осуществляется внутримолекулярное присоединение аминогруппы по связи $\text{C}=\text{O}$ с образованием трициклического интермедиата **4**, который в свою очередь рециклизуется в соответствующий пиразоло[3,4-*b*]пиридин **5**.

Метод ТСХ широко применяется для качественной оценки хода реакции [34-35]. Данный метод позволяет визуализировать изменение состава реакционной массы в ходе реакции, оценить наличие исходных соединений – аминопиразола **1**, итаконимида **2** и целевого продукта пиразоло[3,4-*b*]пиридина **5**, используя соответствующие образцы – свидетели.

В качестве элюирующей системы использовали хлороформ, метанол и их смеси в различном соотношении (20:1; 10:1; 5:1). Применение этих условий хроматографирования позволяет разделить компоненты реакционной массы и таким образом контролировать ход протекания



2 I II III IV V VI 1

Рис. 1. Хроматографические профили реакционных масс через 2 часа кипячения аминопиразола 2 и N-фениллитаконимида 1 в различных растворителях (УФ-детектирование, элюент – смесь хлороформа и метанола в соотношении 10:1)
Fig. 1. Chromatographic profiles of reaction masses after 2 hours of boiling of aminopyrazole 2 and N-phenylitaconimide 1 in various solvents

процесса. В ходе эксперимента контроль состава реакционной массы проводили каждые 20 минут в течение первых 2 часов, далее каждый час. Установлено, что максимальная конверсия реагентов достигается через 10 часов кипячения. На рисунках 1-2 приведены примеры хроматограмм, получаемых в ходе анализа, где I – реакционная масса в уксусной кислоте, II – в изопропиловом спирте с каталитическим количеством уксусной кислоты, III – в толуоле с каталитическим количеством уксусной кислоты, IV – в метаноле с каталитическим количеством уксусной кислоты, V – в 1,4-диоксане с каталитическим количеством уксусной кислоты, VI – в N,N-диметилформамиде с каталитическим количеством уксусной кислоты.

Как видно из хроматограммы (рис. 1) через два часа после кипячения реагентов во всех реакционных массах остается значительное количество непрореагировавших исходных реагентов. Полной конверсии исходных компонентов добиться не удалось и после кипячения в течение 10 часов (рис. 2). При этом в реакционной



2 I II III IV V VI 1 5

Рис. 2. Хроматографические профили реакционных масс через 10 часов кипячения аминопиразола 2 и N-фениллитаконимида 1 в различных растворителях (УФ-детектирование, элюент – смесь хлороформа и метанола в соотношении 20:1).
Fig. 2. Chromatographic profiles of reaction masses after 10 hours of boiling of aminopyrazole 2 and N-phenylitaconimide 1 in various solvents (UV detection, eluent – a mixture of chloroform and methanol in a ratio of 20:1).

смеси кроме пятен, соответствующих исходным соединениям, обнаруживаются пятна еще нескольких соединений, что свидетельствует о необходимости проведения дополнительной стадии очистки продукта. Чистый пиразоло[3,4-b]пиридин 5 (рис. 2 (5)) получили после перекристаллизации из изопропилового спирта. Для идентификации компонентов смеси были определены значения R_f для индивидуальных исходных соединений и продукта (таблица 1).

Несмотря на то, что метод ТСХ позволяет провести экспрессный качественный анализ смеси, недостатком данного метода является невозможность проведения количественного анализа. Не представляется возможным также идентифицировать побочные и промежуточные соединения, для которых отсутствуют стандарты. Для решения этих задач может быть использован метод ВЭЖХ-МС анализа, позволяющий определить количественное содержание целевого продукта, исходных компонентов и возможных примесей.



Таблица 1. Значения R_f индивидуальных соединений 1, 2, 5 на пластинках Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄, при однократном элюировании смесью хлороформ : метанол в соотношении 20:1
Table 1. R_f values of individual compounds 1, 2, 5 on Merck TLC Silica gel 60 F₂₅₄ plates, with a single elution with a mixture of chloroform : methanol in a ratio of 20:1

Компонент	R_f
3-метил-1-фенил-1H-пиразол-5-амин 2	0.56±0.02
N-фенилitaконимид 1	0.78±0.02
пиразоло[3,4-b]пиридин 5	0.11±0.02

Таблица 2. Содержание 2-(3-метил-6-оксо-1-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-1H-пиразоло[3,4-b]пиридин-5-ил)-N-фенилацетамида 5 в реакционной массе после 10 часов кипячения в различных растворителях.

Table 2. The content of 2-(3-methyl-6-oxo-1-phenyl-4,5,6,7-tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine-5-yl)-N-phenylacetamide 5 in the reaction mass after 10 hours of boiling in various solvents.

№	Растворитель	C_{rel} %
I	Уксусная кислота	28
II	Изопропиловый спирт с каталитическим количеством уксусной кислоты	54.5
III	Толуол с каталитическим количеством уксусной кислоты	13
IV	Метанол с каталитическим количеством уксусной кислоты	39.7
V	1,4-Диоксан с каталитическим количеством уксусной кислоты	14
VI	N,N-диметилформаид с каталитическим количеством уксусной кислоты	40

Установлено, что в ходе хроматографического анализа в выбранных условиях происходит удовлетворительное разделение компонентов реакционной массы. Оценка состава осуществлялась методом абсолютной нормировки на основании ВЭЖХ-МС анализа. Интерпретация сигналов произведена на основе предварительно рассчитанных масс всех возможных исходных, промежуточных и образующихся веществ (таблица 2).

На интегрированных сканированных хроматограммах полного ионного тока контрольными являются пики соединений, соответствующие по молекулярной массе N-фенилitaконимиду **1** (время удерживания 1.5 мин) и 3-метил-1-фениламинопиразолу **2** (время удерживания 2.8 мин), а также целевому пиразоло[3,4-b]пиридину **5** (время удерживания 1.3 мин).

При проведении реакции в чистой уксусной кислоте (рис. 3) в реакционной массе помимо исходных реагентов **1** и **2** фиксируются образование многочисленных побочных продуктов, которые не были идентифицированы.

При проведении реакции в изопрпиловом спирте в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты, после 10 часов кипячения реакционной массы, на хроматограмме (рис. 4) значительно увеличивается пик продукта **5**.

При проведении реакции в толуоле в присутствии каталитических количеств уксусной кислоты, преобладающим на хроматограмме (рис. 5) становится пик **X**, соответствующий компоненту с молекулярной массой 361, причём при дальнейшем кипячении реакционной массы площадь пика не изменяется. По-видимому, этот пик соответствует альтернативному аддукту, не способному к дальнейшей циклизации, структуру которого установить не удалось.

Таким образом показано, что во всех перечисленных системах достигается невысокая степень конверсии исходных реагентов, в реакционных массах, также, фиксируются сигналы интермедиатов и образующихся продуктов их внутримолекулярной циклизации. При использовании в качестве растворителя изопрпило-

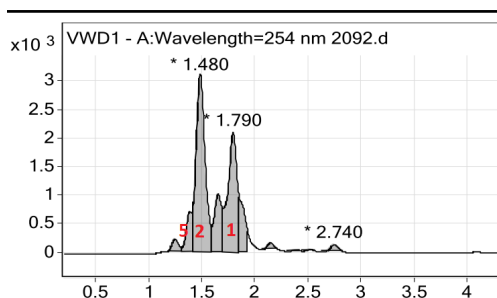


Рис. 3. Интегрированная сканированная хроматограмма полного ионного тока для реакционной массы через 10 часов кипячения аминопиразола **2** и *N*-фениллитаконимида **1** в уксусной кислоте

Fig. 3. Integrated scanned chromatogram of the total ion current for the reaction mass after 10 hours of boiling of aminopyrazole **2** and *N*-phenylitaconimide **1** in acetic acid

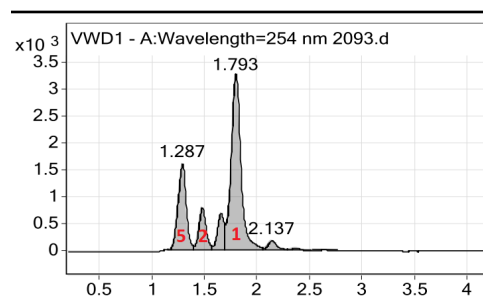


Рис. 4. Интегрированная сканированная хроматограмма полного ионного тока для реакционной массы через 10 часов кипячения аминопиразола **2** и *N*-фениллитаконимида **1** в изопропиловом спирте с каталитическим количеством уксусной кислоты

Fig. 4. Integrated scanned chromatogram of the total ion current for the reaction mass after 10 hours of boiling aminopyrazole **2** and *N*-phenylitaconimide **1** in isopropyl alcohol with a catalytic amount of acetic acid

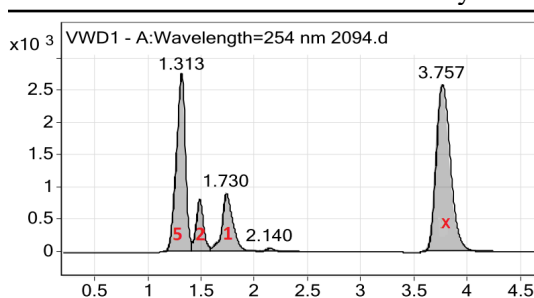


Рис. 5. Интегрированная сканированная хроматограмма полного ионного тока для реакционной массы через 10 часов кипячения аминопиразола **2** и *N*-фениллитаконимида **1** в толуоле с каталитическим количеством уксусной кислоты

Fig. 5. Integrated scanned chromatogram of the total ion current for the reaction mass after 10 hours of boiling aminopyrazole **2** and *N*-phenylitaconimide **1** in toluene with a catalytic amount of acetic acid

вого спирта с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты достигается наибольшее содержание целевого продукта. Однако полной конверсия не происходит ни в одной из рассматриваемых систем.

Таким образом, установлено, что реакция между *N*-фениллитаконимидом **1** и 1-фенилпиразол-5-амином **2** наиболее гладко протекает при 10-ти часовом кипячении реагентов в изопропиловом спирте с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты. Выход целевого продукта при этом составляет 50%.

Структура полученного 2-(3-метил-6-оксо-1-фенил-4,5,6,7-тетрагидро-1*H*-пиразоло[3,4-*b*]пиридин-5-ил)-*N*-фенилацетамида **5** была подтверждена с использованием данных ЯМР-¹H и ЯМР-¹³C.

Заключение

Установлено, что комбинация методов ТСХ- и ВЭЖХ-МС-анализа может быть эффективно использована для анализа реакционных масс и контроля за ходом протекания взаимодействия *N*-фениллитаконимида и 1-фенилпиразол-5-амин, а также позволяет получить более полную



информацию о динамике изменения смесей сложного состава. С применением такого подхода найдено, что оптимальными условиями проведения реакции *N*-фениллитаконимида и 1-фенилпиразол-5-амина является 10-ти часовое кипячение смеси реагентов в изопропиловом спирте с добавлением каталитических количеств уксусной кислоты.

Список литературы/References

1. Geiss F. Fundamentals of thin layer chromatography (planar chromatography). M., 1999. V. 1. 406 p. (In Russ.)
2. Checheta O.V., Safonova E.F., Slivkin A.I. Identification of vegetable oils and oil extracts by TLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2008; 8: 646-653. (In Russ.)
3. Marriott Ph.J., Shellie R., Cornwell Ch. Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *J. Chromat.* 2001; 936: 1-22. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)01314-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)01314-0)
4. Reiter B., Lorbeer E. Analysis of the Wax Ester Fraction of Olive Oil and Sunflower Oil by Gas Chromatography and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *JAOCS*. 2001; 78(9): 881-888.
5. Wawrzyniak R., Wasiak W., Ackowiak M. Fr. Determination of Methyl Esters in Diesel Oils by Gas Chromatography – Validation of the Method. *Chem. Pap.* 2005; 59(6b): 449-452.
6. Yunusa R., Lyeb O.T., Fakhru'l-Razia A. A Simple Capillary Column GC Method for Analysis of Palm Oil-Based Polyol Esters. *JAOCS*. 2002; 79(11): 1075-1080. <https://doi.org/10.1007/s11746-002-0606-3>
7. Emelina E.E., Petrov A.A., Firsov A.V. A. 5-Aminopyrazoles in the synthesis of heterocycles. Intermediates of the reaction of 5-aminopyrazoles with trifluoroacetylacetone. *J. Org. Chem.* 2003; 39(2): 299-301.
8. Chebanov V.A., Saraev V.E., Desenko S.M., Chernenko V.N., Shishkina S.V., Shishkin O.V., Kappe C.O. One-pot, multi-component route to pyrazoloquinolizines.

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.

Org. Letter. 2007; 9(9): 1691-1694. <https://doi.org/10.1021/ol070411>

9. Quiroga J., Hormaza A., Insuasty B., Saitz C., Cañete A., Jullian, C. Synthesis of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines in the reaction of 5-amino-3-arylpyrazoles with methoxymethylene Meldrum's acid derivatives and thermolysis of their pyrazolylaminomethylene derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* 1998; 35(1): 61-64. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570350112>

10. Quiroga J., Insuasty B., Hormaza A., Cabildo P., Claramunt R. M., Elguero, J. Synthesis, Molecular Structure and Tautomerism of 1(2)H-Dihydropyrazolo[3,4-b]pyridin-6-ones. *Heterocyclic Comm.* 1999; 5(2): 115-122. <https://doi.org/10.1515/HC.1999.5.2.115>

11. Falcó J.L., Lloveras M., Buirra I., Teixidó J., Borrell J.I., Méndez E., 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(11): 1179-1187. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2005.06.008>

12. Dodiya D., Trivedi A., Katari V., Shah V. Advances in the synthesis of pyrazolo[3,4-b]pyridines. *Curr. Org. Chem.* 2012; 16(3): 400-417. <https://doi.org/10.2174/138527212799499912>

13. 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(21): 5893-5895. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.08.089>



14. 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 advances*. 2015; 5(109); 89652-89658.
15. Tucker T.J., Jeffrey T.K., Yong L.Z., Nobuyoshi Y., Yangfeng Z. Patent *WO 2009117278 A2*, 2009.
16. Sharma P.K., Singh K., Kumar S., Kumar P., Dhawan S.N., Lal S., Dannhardt G. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of some pyrazolo[3,4-b]pyridines. *Med. Chem. Res.* 2011; 20: 239-244.
17. Al-Mousawi S.M., Kaul K., Mohammad M.A., Elnagdi M.H. Studies with Condensed Azines: New Routes to Pyrazolo[3,4-b]pyridines and Pyrrolo[3,2-b]pyridines. *J. Chem. Res. (S)*. 1997; 9: 318-319.
18. Chebanov V.A., Sakhno Y.I., Desenko S.M., Chernenko V.N., Musatov V.I., Shishkina S.V., Kappe C.O. Cyclocondensation reactions of 5-aminopyrazoles, pyruvic acids and aldehydes. Multicomponent approaches to pyrazolopyridines and related products. *Tetrahedron*. 2007; 63(5): 1229-1242. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2006.11.048>
19. Quiroga J., Hormaza A., Insuasty B., Saitz C., Cañete A., Jullian C. Synthesis of pyrazolo[1,5-a]pyrimidines in the reaction of 5-amino-3-arylpyrazoles with methoxymethylene meldrum's acid derivatives and thermolysis of their pyrazolylaminomethylene derivatives. *J. Heterocycl. Chem.* 1998; 35(1): 61-64. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570350112>
20. Quiroga J., Hormaza A., Insuasty B., Marquez M. Reaction of 5-amino-1-aryl-3-methylpyrazoles with benzylidene derivatives of meldrum's acid: Synthesis and characterization of pyrazolo[3,4-b]pyridinones. *J. Heterocycl. Chem.* 1998; 35(2): 409-412. <https://doi.org/10.1002/jhet.5570350225>
21. Quiroga J., Insuasty B., Hormaza A., Cabildo P., Claramunt R.M., Elguero J. Synthesis, Molecular Structure and Tautomerism of 1(2)H-Dihydropyrazolo[3,4-b]pyridin-6-ones. *Heterocycl. Commun.* 1999; 5(2): 115-122. <https://doi.org/10.1515/HC.1999.5.2.115>
22. Liu N., Wang Y., Huang G., Ji C., Fan W., Li H., Tian H. Design, synthesis and biological evaluation of 1H-pyrrolo[2,3-b]pyridine and 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives as c-Met inhibitors. *Bioorg. Chem.* 2016; 65(4): 146-158. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.02.009>
23. Orlikova B., Chaouni W., Schumacher M., Aadil M., Diederich M., Kirsch G. Synthesis and bioactivity of novel aminopyrazolopyridines. *J. Med. Chem.* 2008; 51: 2146.
24. Fathy U., Younis A., Awad H. Ultrasonic assisted synthesis, anticancer and antioxidant activity of some novel pyrazolo[3,4-b]pyridine derivatives. *J. Chem. Pharm. Res.* 2015; 7: 4-12.
25. Lavecchia G., Berteina-Raboin S., Guillaumet G. Synthesis and functionalisation of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridines involving copper and palladium-promoted coupling reactions. *Tetrahedron Lett.* 2004; 45(11): 2389-2392. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2004.01.067>
26. Vandyshev D.Yu., Shikhaliev K.S., Kokonova A.V., Potapov A.Y., Kolpakova M.G., Sabynin A.L., Zubkov F.I. A novel method for the synthesis of pyrimido[1,2-a]benzimidazoles. *Chem. Heterocycl. Compd.* 2016; 52: 493-497.
27. Vandyshev D.Y., Shikhaliev K.S., Potapov A.Y., Krysin M.Y., Zubkov F.I., Saponova L.V. A novel synthetic approach to hydroimidazo[1,5-b]pyridazines by the recyclization of itaconimides and HPLC–HRMS monitoring of the reaction pathway. *J. Org. Chem.* 2017; 13(1): 2561-2568. <https://doi.org/10.3762/bjoc.13.252>
28. Zhou J.Li, 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.



29. Yang S., Thacker Z., Allison E., Bennett M., N. Cole, Pinhero P. Electrodeposition of copper for three-dimensional metamaterial fabrication. *ACS Applied Materials Interfaces*. 2017; 9(46): 40921-40929.
30. Vandyshev D.Y., Shikhaliev K.S., Kokonova A.V., Potapov A.Y., Kolpakova M.G., Sabyinin A.L., Zubkov F.I. A novel method for the synthesis of pyrimido[1,2-a]benzimidazoles. *Chem. Heterocycl. Comp.* 2016; 52: 493-497. <https://doi.org/10.1007/s10593-016-1914-7>
31. Shmoilova Y.Yu., Kovygin Yu.A., Vandyshev D.Yu., Ledeneva I.V., Kosheleva E.A., Shikhaliev Kh.S. Efficient synthesis of pyrido[2,3-d]pyrimidines based on the recyclization of N-arylitaconimides with aminopyrimidinones. *J. Org. Chem.* 2020; 56(9): 1329-1336. <https://doi.org/10.31857/S0514749220090025>
32. Shmoylova Y.Y., Kovygin Y.A., Kosheleva E.A., Shikhaliev K.S., Ledenyova I.V., Prezent M.A. Efficient synthesis of tetrahydro-1H-pyrazolo[3,4-b]pyridines based on the recyclization of N-arylitaconimides with aminopyrazoles. *Mend. Comm.* 2022; 32(5): 688-690. <https://doi.org/10.1016/j.mencom.2022.09.041>
33. Leung D.Y.C., Guo Y. Transesterification of neat and used frying oil: optimization for biodiesel production. *Fuel processing technology*. 2006; 87(10): 883-890. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2006.06.003>
34. Enweremadu C.C., Mbarawa M.M. Technical aspects of production and analysis of biodiesel from used cooking oil – A review. *Renewable and sustainable energy reviews*. 2009; 13(9): 2205-2224. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2009.06.007>
35. Glass R.L. Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. *Lipids*. 1971; 6(12): 919-925.

Информация об авторах / Information about the authors

Я.Ю. Шмойлова – аспирант 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, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

Д.Ю. Вандышев – к.х.н., доцент кафедры органической химии, доцент кафедры высокомолекулярных соединений и коллоидной химии, Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

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

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

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

D.Yu. Vandyshev – Ph.D., Associate Professor of the Organic Chemistry Department, Associate Professor of High Molecular Compounds and Colloid Chemistry Department, Voronezh State University, Voronezh, Russia

Статья поступила в редакцию 25.10.2023; о одобрена после рецензирования 19.12.2023; принята к публикации 20.12.2023.

The article was submitted 25.10.2023; approved after reviewing 19.12.2023; accepted for publication 20.12.2023.