

## Рекуррентная аппроксимация параметров удерживания как способ подтверждения образования гидратов N-замещенных сульфонамидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

*Т.А. Корнилова, А. Деруиш, \*И.Г. Зенкевич*

*<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, Институт химии, Российская Федерация, 198504, Санкт-Петербург, Университетский пр., 26*

*\*Адрес для переписки: Зенкевич Игорь Георгиевич, E-mail: izenkevich@yandex.ru*

Поступила в редакцию 4 ноября 2020 г., после исправления – 17 ноября 2020 г.

Подтверждение соответствия детектируемых форм аналитов приписываемым им молекулярным структурам – одна из важнейших задач аналитической химии. Ранее в результате анализа серии лекарственных препаратов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ было установлено, что закономерности удерживания сложных полифункциональных органических соединений, содержащих сульфонамидные группы  $-SO_2-N<$ , отличаются от остальных, что обусловлено обратимым образованием их гидратных форм. Для проверки этого предположения специально синтезированы три модельных аналита класса N-замещенных арилсульфонамидов: N,N-диэтил- (I), N-аллил- (II) и N-фенил- (III). Рассмотрение зависимостей абсолютных времен удерживания ( $t_R$ ) этих аналитов в обращенно-фазовой ВЭЖХ от содержания органического растворителя (метанола) в элюенте (C) не позволяет выявить какие-либо закономерности или аномалии из-за нелинейности таких зависимостей. Однако такие возможности дает использование рекуррентной аппроксимации времен удерживания  $t_R(C + \Delta C) = at_R(C) + b$  (\*), где  $\Delta C = \text{const}$  – постоянный «шаг» изменения концентрации метанола (в нашем случае 5 % объемн., а и b – коэффициенты, вычисляемые методом наименьших квадратов. Если в некотором интервале  $C_{\text{мин}} < C < C_{\text{макс}}$  химическая природа аналитов на выходе из хроматографической колонки неизменна, то зависимости (\*) обычно линейны с коэффициентами корреляции  $R > 0.999$ . Если же наблюдаются дополнительные химические превращения аналитов, обусловленные вариациями содержания воды в элюенте, в том числе – обратимое образование гидратов (или изменение их состава), то это проявляется в отклонениях рекуррентных зависимостей (\*) от линейности. Их особенности неодинаковы для трех охарактеризованных сульфонамидов: нелинейность во всем диапазоне  $C_{\text{мин}} < C < C_{\text{макс}}$  (I), наличие двух линейных участков вместо одного (II) и линейность во всем диапазоне концентраций органического растворителя (III). Первые два случая соответствуют взаимным превращениям гидратированных и негидратированных форм аналитов или (менее вероятно) гидратов разного состава, а последний – существованию аналита в условиях ВЭЖХ анализа только в одной форме (предположительно, гидратной). Тем самым подтверждено, что структурной предпосылкой образования гидратов является именно присутствие полярной функциональной группы  $-SO_2-N<$  в молекуле.

**Ключевые слова:** Высокоэффективная жидкостная хроматография, соответствие детектируемых форм аналитов их молекулярным структурам, N-замещенные *p*-толуолсульфониламиды, параметры удерживания, рекуррентная аппроксимация, выявление образования гидратов.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2020, vol. 24, no. 4, pp. 315-322

DOI: 10.15826/analitika.2020.24.4.006

## Recurrent approximation of retention parameters as confirmation of N-substituted sulfonamides hydrate formation in reversed phase HPLC

*Tatiana A. Kornilova, Abdennour Derouiche, \*Igor G. Zenkevich*

\*Corresponding author: Igor G. Zenkevich, E-mail: izenkevich@yandex.ru

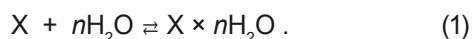
Submitted 4 November 2020, in revised form – 17 November 2020

The confirmation of the correspondence of the detected forms of analytes to their molecular structures seems to be one of the principal problems of analytical chemistry. The previous analysis of the series of drugs by reversed-phase HPLC allowed revealing that the retention regularities of the complex polyfunctional organic compounds containing sulfonamide groups  $-\text{SO}_2-\text{N}<$  differ from those of other compounds. It was explained by reversible formation of their hydrate forms. To verify this proposition, three model N-substituted arylsulfonamides were synthesized, namely N,N-diethyl- (I), N-allyl- (II), and N-phenyl (III). The consideration of the dependencies of these analytes net retention times ( $t_R$ ) in reverse-phase HPLC on the content of organic solvent (C, methanol) in an eluent did not permit us to reveal any regularities or anomalies due to the non-linearity of such dependencies. However, to achieve this, the recurrent approximation was recommended,  $t_R(C + \Delta C) = at_R(C) + b$  (\*), where  $\Delta C = \text{const}$  – constant variations of concentration of methanol (5% v/v in our case),  $a$  and  $b$  – coefficients calculated by Least Squares Method. If the chemical origin of the analytes at the outlet of the chromatographic column remained the same within concentration range  $C_{\min} < C < C_{\max}$ , dependencies (\*) were linear with correlation coefficients  $R > 0.999$ . Yet, if additional chemical transformations of analytes took place, namely reversible formation of hydrates (or variations of their composition) due to the presence of water in an eluent, it led to the deviations of recurrent dependencies (\*) from linearity. Three sulfonamides under characterization corresponded to different kinds of such deviations: non-linearity within the whole range  $C_{\min} < C < C_{\max}$  (amide I), presence of two linear dependencies instead of one (amide II), and linearity within the whole range  $C_{\min} < C < C_{\max}$  (amide III). First two cases corresponded to the interconversion of anhydrous forms and hydrates, or (less probable) different hydrates, while the latter meant the existence of analyte in the single form (probably hydrate). Thus, the analysis of model compounds confirmed that the presence of the polar functionality  $-\text{SO}_2-\text{N}<$  was just the reason of hydrate formation in water solutions.

**Keywords:** High performance liquid chromatography, correspondence of detected forms of analytes to their molecular structures, N-substituted *p*-toluenesulfonylamides, retention parameters, recurrent approximation, revealing hydrate formation.

## ВВЕДЕНИЕ

При разделении органических соединений методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) они детектируются как компоненты растворов, содержащих органические растворители (ацетонитрил, метанол и др.) в смеси с переменными количествами воды. Эта особенность метода создает предпосылки существования аналитов в равновесии со своими гидратными формами и означает, что детектируемые формы аналитов могут отличаться от приписываемых им молекулярных структур:



Характеристикой гидратов являются константы равновесия:

$$K_{\text{равн}} = [X \cdot n\text{H}_2\text{O}] / \{[X] \times [\text{H}_2\text{O}]^n\} \quad (2)$$

По литературным данным если  $K_{\text{равн}} \ll 1$ , то образованием гидратов в растворах можно пренебречь, тогда как значения  $K_{\text{равн}} \gg 1$  подтверждают их стабильность. Следовательно, существует некоторая область значений  $K_{\text{равн}} \sim 1$ , при которых в водных растворах, в том числе используемых в ВЭЖХ в качестве элюентов, могут присутствовать аналиты, как образующие, так и не образующие гидратные формы. При этом вариации содержания воды в элюентах приводят к смещению положе-

ния равновесий (1) и, следовательно, изменению соотношения исходных и гидратированных форм аналитов. В табл. 1 в качестве примера перечислены некоторые органические соединения разных классов. При этом речь идет не о гидратах или ассоциатах неопределенного или переменного состава, а о вполне детерминированных химических соединениях. Чаще всего встречаются гидраты состава 1 : 1. Указанный состав гидратов (например, 1 : *n*) подразумевает соотношение молекул органического соединения и воды. Подтверждением предположений о существовании гидратов являются соответствующие им номера CAS, отличающиеся от номеров CAS исходных (не гидратированных) соединений. В качестве источников информации приведены не ссылки, а названия сайтов, где по приведенным номерам CAS можно найти информацию о тех или иных гидратах.

Однако возможность образования гидратов относительно редко принимают во внимание в практической работе, так что даже потенциально гидратируемым аналитам «по умолчанию» обычно приписывают структуры молекул, не содержащие гидратной воды. Причинами этого являются чаще всего невысокое равновесное содержание гидратных форм в элюентах, относительно несложное выделение из них негидратированных соединений, а также объективные трудности определения содержания гидратов. Используемые для этих целей

Таблица 1

Органические соединения, образующие нестабильные гидраты в водных растворах ( $K_{\text{равн}} \ll 1$ )

Table 1

Organic compounds forming unstable hydrates in water solutions ( $K_{\text{eq}} \ll 1$ )

Соединение	Гидрат		Источники информации
	CAS №	Состав	
Антрацен	188974-01-8	1 : 1	PubChem
Бензальдегид	4403-72-9	2 : 1	ChemSpider, PubChem, MolBase и др.
Ацетон	18879-06-6	1 : 1; 1 : n	Chemical Encyclopedia
Циклогексанон	28553-75-5	1 : 1	ChemSpider
Фенол	217182-78-0; 144796-97-4	1 : 1	PubChem, ChemSpider, Sigma-Aldrich
2,3-Дихлорфенол	848169-92-6	1 : 1	ChemSpider
Уксусная кислота	19215-29-3; 99294-94-7	1 : 1; 1 : 2	ChemSpider, PubChem
Формаид	56827-75-9	1 : 1	PubChem, ChemSpider
Ацетамид	137547-89-3	1 : 1	PubChem
Мочевина	163931-63-3	1 : 1; 2 : 1	PubChem, ChemSpider
Этаноламин	922193-26-8	1 : 1	PubChem
Триэтилфосфат	114019-85-1	2 : 1	ChemSpider, ChemSrc
Трибутилфосфат	19517-53-4	1 : 1	ChemSpider, ChemSrc
Кофеин	5743-12-4	1 : 1	PubChem, ChemSpider, Kegg Drugs, Fisher Scientific, MolBase
Теofilлин	5967-84-0	1 : 1	PubChem
Ацетонитрил	128870-13-3	1 : 1	PubChem, ChemSpider
1,3-Диоксолан	34776-95-9	1 : 1	PubChem
1,4-Диоксан	16468-05-6	1 : 1	ChemSpider
Флороглюцин	6099-90-7	1 : 1; 1 : 2	PubChem

спектральные методы, измерение диэлектрической проницаемости растворов, построение фазовых диаграмм, непосредственная сокристаллизация и другие [1-5] предполагают такую трудоемкую операцию как выделение характеризующих веществ (в том числе гидратов) в индивидуальном виде. До последнего времени не существовало способов подтверждения образования гидратов в обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Однако недавно в результате анализа нескольких лекарственных препаратов был предложен способ выявления образования гидратов органических соединений в элюенте на выходе хроматографической колонки в ОФ ВЭЖХ [6, 7]. Он основан на рекуррентной аппроксимации зависимости времен удерживания характеризующих соединений от концентрации органического компонента (и, следовательно, от концентрации воды в элюенте),  $t_R(C)$ :

$$t_R(C + \Delta C) = a t_R(C) + b, \quad (3)$$

где  $\Delta C = \text{const}$  – постоянный «шаг» изменения концентрации органического компонента элюента (в нашем случае  $\Delta C = 5\%$  объемн.),  $a$  и  $b$  – коэффициенты, вычисляемые методом наименьших квадратов.

В данном случае речь не идет об абсолютном доказательстве образования гидратов. Если, в зависимости от концентрации органического компонента

элюента и, следовательно, содержания в нем воды, детектируемые формы аналитов изменяются (в том числе за счет образования гидратов), то это проявляется в отклонениях рекуррентных зависимостей вида (3) от линейности.

Рекуррентные соотношения (3) обладают уникальными свойствами; они объединяют свойства арифметических и геометрических прогрессий, а их математическими эквивалентами являются полиномы переменных степеней [8-10]. Высокие «аппроксимирующие возможности» рекуррентных соотношений позволяют приводить к линейному виду как зависимости времен удерживания аналитов от температуры в газовой хроматографии ( $\lg t_R' = a/T + b$ ), так и зависимости  $t_R(C)$  в ОФ ВЭЖХ. Под линейностью во всех этих случаях подразумевают значения коэффициентов корреляции  $R > 0.999$ . Если же в диапазонах вариаций концентраций органического компонента элюента ( $C_{\text{мин}} - C_{\text{макс}}$ ) аналиты представляют собой не индивидуальные соединения, а находятся в равновесии со своими гидратными формами (1), то рекуррентные соотношения (1) уже не способны привести наборы данных  $t_R(C)$  к линейному виду. Однако в подобных случаях сам факт нелинейности зависимостей (3) может быть интерпретирован как критерий подтверждения обратимого образования гидратных форм аналитов в диапазонах концентраций ( $C_{\text{мин}} - C_{\text{макс}}$ ). С другой

стороны, если в этих диапазонах аналиты существуют исключительно в гидратированной форме (т.е. равновесия (1) нацело смещены вправо), то линейность зависимостей (3) сохраняется.

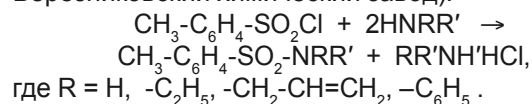
Влияние образования гидратов на линейность рекуррентных соотношений было показано ранее только на примерах нескольких лекарственных препаратов, представляющих собой сложные полифункциональные соединения. Тем не менее, удалось выявить основной структурный фактор, определяющий возможность образования гидратных форм: наличие в молекуле сульфонамидных фрагментов,  $-SO_2-NH-$  или  $-SO_2-N<$  вне зависимости от присутствия других функциональных групп. Проверка корректности этого вывода заставляет рассмотреть в настоящей работе зависимости  $t_R(C)$  для более простых моnofункциональных соединений, содержащих только указанные сульфонамидные фрагменты, а именно N-замещенных амидов *p*-толуолсульфонокислоты,  $4-CH_3-C_6H_4-SO_2-NRR'$ , где R, R' = H, алкильные или арильные заместители. Следовательно, цель работы состоит в подтверждении образования гидратов серии модельных соединений, содержащих указанный структурный фрагмент. Если детектируемые формы аналитов отличаются от предполагаемых для них молекулярных структур, то устранение такого несоответствия относится к важнейшим задачам аналитической химии.

Ранее [6, 7] выводы об образовании гидратных форм аналитов были сделаны в результате использования элюентов, в качестве органического компонента содержащих ацетонитрил, не имеющий активных атомов водорода. Представляло интерес проверить проявление аналогичных закономерностей при использовании метанола, молекулы которого способны к образованию водородных связей.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Получение реакционных смесей и их подготовка к анализу.** *p*-Толуолсульфонамиды синтезировали из *p*-толуолсульфохлорида (99 %, ACROS ORGANICS, Бельгия) как самого доступного реагента класса сульфохлоридов и следующих аминов: диэтил- (ХЧ, Ангарский химический завод),

аллил- (ЧДА, Берлин-Адлерхоф, ГДР) и анилин (ХЧ, Березниковский химический завод):



К раствору *p*-толуолсульфохлорида с концентрацией 0.06 М в хлористом метиле (ХЧ, «Вектон», Санкт-Петербург) добавляли 2.5-кратный избыток амина и выдерживали в течение 10 мин. Далее анализировали непосредственно реакционные смеси, так как избытки аминов и их солей не мешают УФ-детектированию продуктов реакции, которые (за исключением анилина) не поглощают в ближней УФ-области. Перед анализом 10 мкл реакционных смесей разбавляли 10 мл метанола или изопропилового спирта (оба ХЧ, «Вектон», Санкт-Петербург). Некоторые количества *p*-толуолсульфонокислоты (в форме аниона) проявляются в появлении пиков, положения которых совпадают со временем удерживания несорбируемого компонента.

### Условия анализа методом ОФ ВЭЖХ.

Хроматографический анализ реакционных смесей проводили на хроматографе «Стайер-М» с УФ-детектором. Колонка: Phenomenex C18, 250 × 4.6 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. Компоненты подвижной фазы: бидистиллированная деионизованная вода [дистиллятор GFL (Германия) и деионизатор D-301(Аквилон)] с удельным сопротивлением 18.2 Мом/см и метанол (99.8 %, HPLC Grade, J.T. Baker, США, или сорт «0», «Криохром», Санкт-Петербург). Использовали режимы изократического элюирования с содержанием метанола в элюенте в различных диапазонах (см. табл. 3 далее в обсуждении результатов). Шаг варьирования концентрации метанола ( $\Delta C$ ) был выбран равным 5 % объемн., так как при больших значениях  $\Delta C$  число точек недостаточно для характеристики рекуррентных зависимостей, а при меньшем – существенно возрастают затраты времени и суммарный расход растворителей. Расход элюента 1.0 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С. Объем проб составлял 20 мкл.

**Условия ВЭЖХ-МС анализа.** Регистрацию масс-спектров сульфонамидов (II) и (III) с ионизацией электрораспылением (детектирование положительного заряженных ионов) проводили на жидкостном

Таблица 2

Некоторые свойства характеризующих *p*-толуолсульфонамидов

Table 2

Some properties of *p*-toluenesulfonamides under characterization

Соединение	Молекулярная масса, а.е.м.	CAS №	$T_{\text{плавл}}^*$ °С	$pK_a^*$
N,N-Диэтил- <i>p</i> -толуолсульфонамид (I)	227	649-15-0	60	4.7(7)
N-Аллил- <i>p</i> -толуолсульфонамид (II)	211	50487-71-3	61-65	10.9(5)
<i>p</i> -Толуолсульфонанилид (III)	247	68-34-8	102	8.6(1)
N,N-Диметил- <i>p</i> -толуолсульфонамид (для сравнения)	199	599-69-9	152-153	4.5

**Примечание:** \* – все значения  $pK_a$  – расчетные. В скобках приведены их доверительные интервалы в единицах последнего указанного десятичного знака.

Таблица 3

Времена удерживания *p*-толуолсульфонамидов при разном содержании метанола в элюенте

Table 3

Retention times of *p*-toluenesulfonamides at different methanol content in an eluent

С(CH <sub>3</sub> OH), объемн. %	<i>t<sub>R</sub></i> , мин (средние значения) ± стандартные отклонения		
	Диэтил- (I)	Аллил- (II)	Фенил- (III)
80	4.05 ± 0.01	4.38* ± 0.04	3.83 ± 0.01
75	5.01 ± 0.01	4.67* ± 0.01	4.37 ± 0.01
70	6.12 ± 0.01	5.01* ± 0.01	5.24 ± 0.01
65	7.86 ± 0.02	5.37* ± 0.00	6.68 ± 0.01
60	10.39 ± 0.02	6.32 ± 0.01	9.08 ± 0.01
55	14.94 ± 0.04	8.16 ± 0.01	13.38 ± 0.05
50	-	11.12 ± 0.07	-
45	-	16.37 ± 0.08	-
Параметры линейной ре- грессии (3)	Нелинейна во всем диапа- зоне; $a = 0.63 \pm 0.02$ , $b = 1.1 \pm 0.2$ , $R = 0.997$ , $S_0 = 0.2$	Линейна в области $C \geq 65\%$ ; $a = 0.58 \pm 0.01$ , $b = 1.7 \pm 0.1$ , $R = 0.9997$ , $S_0 = 0.07$	Линейна во всем диапазоне; $a = 0.582 \pm 0.007$ , $b = 1.33 \pm 0.06$ , $R = 0.9998$ , $S_0 = 0.05$

**Примечания:** \* – точки в области  $C \geq 65\%$  лежат на другой прямой, соответствующей уравнению линейной регрессии (3) с параметрами:  $a = 0.90 \pm 0.03$ ,  $b = 0.17 \pm 0.13$ ,  $R = 0.9996$ , генеральная дисперсия  $S_0 = 0.01$ .

хроматографе Agilent 1200 с масс-спектрометром Bruker Maxis Q-TOF. Колонка Luna C18, 150 × 2.1 мм, размер частиц сорбента 5 мкм. Компоненты подвижной фазы: бидистиллированная вода и метанол с добавками 0.1 % муравьиной кислоты (Merck-Schuchardt, Германия). Расход элюента 0.3 мл/мин, температура термостата колонки 30 °С, объем проб 10 мкл. Использовали градиентное элюирование: 50 % CH<sub>3</sub>OH (1 мин), 95 % CH<sub>3</sub>OH (10 мин), 95 % CH<sub>3</sub>OH (12 мин).

Масс-спектр аллилсульфонамида (II): 234.0585 [M + Na]<sup>+</sup>, 212.0767 [M + H]<sup>+</sup>, 155.0191 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>SO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>. Разность масс ионов с  $m/z$  212 и 155 равна 57.0576, что однозначно соответствует фрагменту [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (вычислено 57.0578).

Масс-спектр фенилсульфонамида (III): 270.0591 [M + Na]<sup>+</sup>, 248.0772 [M + H]<sup>+</sup>, 155.0196 [C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>SO<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

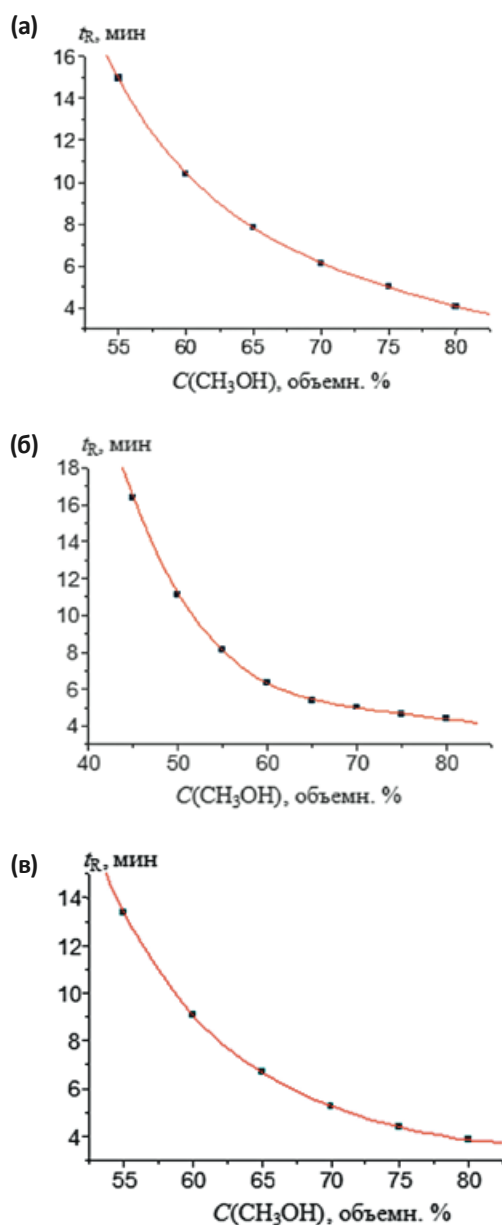
**Обработка результатов.** При рекуррентной аппроксимации данных оценки мертвого времени хроматографической системы не требуются. Времена удерживания целевых амидов в каждом из режимов анализа вычисляли усреднением результатов 2-4 определений. Стандартные отклонения времен удерживания составляли 0.02 – 0.04 мин. В отдельных случаях (выборочно для контроля воспроизводимости) число измерений увеличивали до пяти. Для статистической обработки данных и вычисления параметров линейных рекуррентных зависимостей методом наименьших квадратов использовали ПО «Origin» (версии 4.1 и 8.2).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Общая характеристика анализов и состава реакционных смесей.** Рассматриваемые в настоящей работе *p*-толуолсульфонамиды [диэтил- (I), аллил- (II) и фенил- (III)] относятся к ранее охарактеризованным соединениям, для которых известны, в частности, экспериментальные значения

температур плавления ( $T_{\text{плав}}$ ), а также расчетные константы кислотности,  $pK_a$  (приведены в табл. 2). Это допускает анализ непосредственно реакционных смесей без препаративного выделения целевых амидов. Как отмечено в экспериментальной части, избытки аминов и присутствие их солей (гидрохлоридов) не мешают детектированию продуктов реакции, не поглощающих в ближней УФ-области. Исключением является примесь анилина, однако этот компонент легко опознается по параметрам удерживания. Присутствующие в реакционных смесях переменные количества *p*-толуолсульфокислоты ( $pK_a \sim -1.7 \pm 1.0$ , CAS № 104-15-4, продукт гидролиза *p*-толуолсульфохлорида, элюируется в форме аниона моногидрата, CAS № 6192-52-5) проявляются в появлении пиков, времена удерживания которых ( $t_R = 2.73 \pm 0.05$  мин, не зависят от концентрации метанола в элюенте) и совпадают со временем удерживания несорбируемого компонента.

**Рекуррентная аппроксимация времен удерживания *p*-толуосульфонамидов.** Абсолютные времена удерживания трех характеризующихся *p*-толуолсульфонамидов с указанием их стандартных отклонений приведены в табл. 3. Общий вид зависимостей  $t_R(C)$  не отличается от их вида для других органических соединений (убывание, аппроксимируемое экспоненциальной или гиперболической функциями). Сделать какие-либо выводы о различиях удерживания амидов на основании таких нелинейных наборов данных практически невозможно. Сравнивая данные для алифатических сульфонамидов (I) и (II) можно лишь заметить, что отношение  $t_R(I)/t_R(II)$  при содержании метанола в элюенте  $C = 80\%$  составляет 0.92, но при уменьшении  $C$  до 55 % возрастает до 1.83. Однако объяснения этой особенности неочевидны. Учитывая особую важность рассматриваемых вопросов, нелинейные зависимости  $t_R(C)$  для всех



**Рис. 1.** Зависимости абсолютных времен удерживания: (а) N,N-диэтил- (I), (б) N-аллил- (II) и (в) N-фенил-*p*-толуолсульфонамидов (III) от концентрации метанола в элюенте.

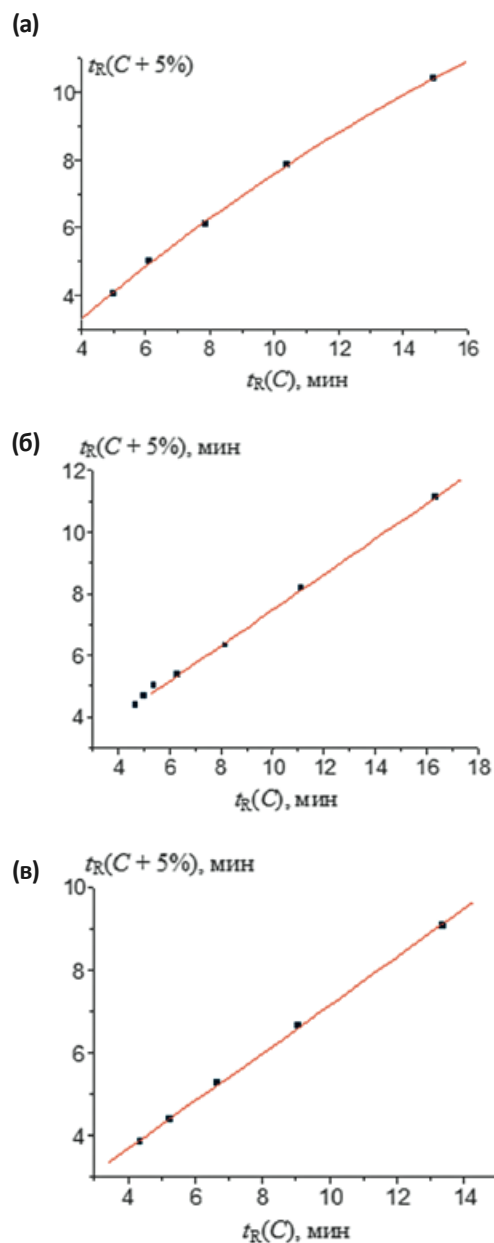
**Fig. 1.** Dependencies of net retention times of (a) N,N-diethyl- (I), (б) N-allyl- (II), and (в) N-phenyl-*p*-toluenesulfonamides (III) on the content of methanol in the eluent.

амидов дополнительно представлены в графической форме на рис. 1 (а-в).

Одним из преимуществ применения рекуррентных соотношений вида (3) в хроматографии представляется отсутствие необходимости пересчета абсолютных времен удерживания аналитов в соответствующие исправленные времена, то есть исключение необходимости определения параметров удерживания несорбируемых компонентов. В последней строке табл. 3 для всех амидов приведены параметры линейных рекуррентных соотношений (3), в том числе значения коэффициентов  $a$  и  $b$

со стандартными отклонениями, коэффициенты корреляции  $R$  и генеральные дисперсии  $S_0$ . Для наглядной иллюстрации возможностей рекуррентной аппроксимации параметров удерживания, на рис. 2 (а-в) представлены соответствующие графики.

Их сравнение иллюстрирует принципиально различные виды зависимостей  $t_R(C)$ . Рекуррентная зависимость (3) для N,N-диэтил-*p*-толуолсульфонамида (I) (рис. 2(а)), отличается заметной нелинейностью (выпуклая) во всем диапазоне концентраций метанола от 55 до 80 %. Это отражается в значении коэффициента корреляции  $R = 0.997$ , что, как отмечено выше, неприемлемо для утверждения о



**Рис. 2.** Рекуррентная аппроксимация абсолютных времен удерживания (а) N,N-диэтил- (I), (б) N-аллил- (II) и (в) N-фенил-*p*-толуолсульфонамидов (III) (уравнение 3).

**Fig. 2.** Recurrent approximation of net retention times of (a) N,N-diethyl- (I), (б) N-allyl- (II), and (в) N-phenyl-*p*-toluenesulfonamides (III) (equation 3).

линейности рекуррентных аппроксимаций. Характер такой же зависимости для N-аллил-*л*-толуолсульфонамида (II) (рис. 2(б)) принципиально иной: четыре точки, соответствующие минимальным концентрациям метанола  $45 \leq C \leq 65$  %, лежат на прямой линии при  $R = 0.9997$ . Три других точки в области  $65 \leq C \leq 80$  % соответствуют другой прямой с  $R = 0.9996$  (остальные параметры второго уравнения линейной регрессии приведены в подписи к табл. 3). И, наконец, все пять точек, характеризующих зависимость (3) для N-фенил-*л*-толуолсульфонамида (III) (рис. 2(в)) соответствуют линейной зависимости с коэффициентом корреляции  $R = 0.9998$ .

Для интерпретации наблюдаемых особенностей необходимо принять во внимание, что для соединений с фрагментами структуры  $-\text{SO}_2\text{-NH-}$  или  $-\text{SO}_2\text{-N}<$  как в кристаллическом состоянии, так и в водных растворах по литературным данным характерно образование гидратов состава 1 : 1 [11-15]. Нелинейность зависимости (3) для N,N-диэтил-*л*-толуолсульфонамида (I) может означать, что равновесие (1) проявляется во всем диапазоне концентраций  $55 \leq C \leq 80$  %. Выявление двух прямых участков зависимости (3) для N-аллил-*л*-толуолсульфонамида (II) означает существование двух различных форм этого амида. Можно предположить, что для области  $C \geq \sim 65$  % в элюенте наиболее вероятно негидратированная форма аналита, тогда как при  $C \leq \sim 65$  % (т.е. при большем содержании воды) преобладает гидратная форма. Однако, как отмечено выше, аномалии рекуррентных зависимостей не являются абсолютным доказательством как гидратов аналитов, так и их безводных форм. Формально нельзя исключать альтернативную гипотезу о существовании гидратов разного состава, например дигидрата при  $C \geq \sim 65$  % и моногидрата при  $C \leq \sim 65$  %, однако она менее вероятна.

Для третьего соединения – N-фенил-*л*-толуолсульфонамида (III) линейность зависимости (3) означает, во всем интервале концентраций метанола в элюенте присутствует одно и то же соединение, наиболее вероятно – гидрат амида (III).

Следует отметить еще одну важную особенность рекуррентных соотношений, а именно практически совпадающие значения коэффициентов “а” для амида (II) в области объемных концентраций метанола  $45 \leq C \leq 65$  % ( $a = 0.58 \pm 0.01$ ) и амида (III) в диапазоне  $55 \leq C \leq 80$  % ( $0.582 \pm 0.007$ ), несмотря на то, что сами времена удерживания заметно различаются. Этот факт можно считать дополнительным подтверждением того, что оба монозамещенных амида с одинаковыми структурными фрагментами  $-\text{SO}_2\text{-NH-}$  образуют одинаковые гидраты. Второй линейный участок для амида (II) в интервале концентраций метанола  $65 \leq C \leq 80$  % характеризуется существенно отличающимся значением коэффициента “а” ( $0.90 \pm 0.03$ ), что соответствует иной химической форме амида в элюенте.

Говоря о вероятных альтернативных причинах наблюдаемых аномалий рекуррентной аппроксимации параметров удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ (3) следует упомянуть аномалии (нелинейность) многих свойств водно-спиртовых растворов, в том числе плотностей, показателей преломления, вязкости и других. Однако если бы причиной аномалии были бы свойства системы «вода-метанол», то они должны были бы проявляться одинаково для разных соединений. В нашем же случае детали наблюдаемых эффектов различны для трех различных сульфонамидов, что позволяет объяснить их именно химической природой аналитов, а не свойствами элюента.

Таким образом, детальное рассмотрение зависимостей времен удерживания от концентрации органического растворителя (метанола) в обращенно-фазовой ВЭЖХ для трех специально синтезированных модельных N-замещенных арилсульфонамидов подтверждает, что наиболее вероятной причиной аномалий рекуррентной аппроксимации таких зависимостей следует считать равновесное образование гидратов. Структурной предпосылкой образования гидратов является присутствие в молекуле полярной функциональной группы  $-\text{SO}_2\text{-N}<$ .

Следовательно, на примере нескольких модельных соединений удалось показать, что детектируемые формы аналитов в обращенно-фазовой ВЭЖХ в зависимости от условий разделения могут отличаться от приписываемых им структур молекул за счет обратимого образования гидратов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена с использованием оборудования Ресурсного образовательного центра по направлению «Химия» Института химии Санкт-Петербургского государственного университета. Авторы благодарят сотрудников Центра за содействие и персонально к.х.н. Е.А. Бессонову за проведение ВЭЖХ-МС анализа.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Current work was carried out using the equipment of the “Chemistry” Resource Educational Centre at the Institute of Chemistry of the St. Petersburg State University. The authors are grateful to the staff of this Center for assistance, and personally to Elena A. Bessonova, Ph.D. for conducting HPLC-MS analysis.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Nakayama H., Tahara M. Hydrates of organic compounds. I. Solid-liquid phase equilibria in the water + 1,4-dioxane system and some properties of 1,4-dioxane hydrate // Bull. Chem. Soc. Japan. 1973. V. 46. P. 2965-2868.
2. Wilson G.J., Davidson D.W. Dielectric evidence for acetone hydrate // Can. J. Chem. 1963. V. 41, № 2. P. 264-273.

3. Gough S.R., Ripmeester J.A., Davidson D.W. 1,4-Dioxane hydrate: dielectric absorption by a nondipolar enclathrated molecule // *Can. J. Chem.* 1975. V. 53, № 15. P. 2216-2222.
4. Kinetics and chemical equilibrium of the hydration of formaldehyde / L.G.M. Winkelman [et.al.] // *Chem. Eng. Sci.* 2002. V. 57. P. 4067-4076.
5. Du J., Liang D.-O., Li D.-L., Li X.-J. Phase equilibrium data of binary hydrate in the system hydrogen plus acetone plus water // *J. Chem. Eng. Data.* 2010. V. 55. № 10. P. 4532-4535.
6. Зенкевич И.Г., Никитина Д.А. Выявление обратимого образования гидратов лекарственных препаратов рекуррентной аппроксимацией их параметров удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ // Тез. докл. IV Всерос. конф. молодых ученых «Медико-биологические аспекты химической безопасности». СПб: 18-20 сент. 2020 г. MEDLINE.RU. t11. 5 с.
7. Зенкевич И.Г., Никитина Д.А. Особенности рекуррентной аппроксимации параметров удерживания полифункциональных соединений в обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии // *Журн. физ. химии.* 2021. Т. 95. № 2 (В печати).
8. Зенкевич И.Г. Применение рекуррентных соотношений в хроматографии // *Журн. физич. химии.* 2008. Т. 82, № 6. С. 1012-1018.
9. Zenkevich I.G. Application of recurrent relationships in chromatography // *J. Chemometrics.* 2009. V. 23. P. 179-187.
10. Zenkevich I.G. Recurrent relationships in separation science. Ch. 24 in "Chemometrics in Chromatography" / Eds. L. Komsta, Y.V. Heyden, J. Sherma. London: CRC Press. 2018. P. 449-468.
11. Guo M.-L. 4-Acetamido-N-(4-methylpiperazinyl)benzenesulfonamide monohydrate // *Crystallogr. Commun.* 2008. V. 60. Part 4. P. 574-575.
12. Suchetan S.F., Foro S., Gowda B.T., Prakash M.S. 4-Chloro-N-(3-methylbenzoyl)benzenesulfonamide monohydrate // *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Rep. Online.* 2012. V. 68, № 1. P. o46.
13. Large scale process to prepare highly pure Bosentan monohydrate / A. Kompella [et. al.] // *Science J. Chem.* 2014. V. 2, № 6-1. P. 9-15.
14. Development and validation of a UHPLC UV method for the in-process control of bosental monohydrate synthesis / M. Jatczak [et. al.] // *Chromatographia.* 2016. V. 79. P. 1131-1141.
15. Tan S.L., Tiekink E.R.T. N,N'-Bis(pyridine-3-ylmethyl)ethanediamide monohydrate: crystal structure, Hirshfield surface analysis and computational study // *Acta Crystallogr.* 2020. V. E76. P. 25-31.
3. Gough S.R., Ripmeester J.A., Davidson D.W. 1,4-Dioxane hydrate: dielectric absorption by a nondipolar enclathrated molecule. *Can. J. Chem.*, 1975, vol. 53, no. 15, pp. 2216-2222. doi: 10.1139/v75-311.
4. Winkelman L.G.M., Voorwinde O.K., Ottens M., Beenackers A.A.C.M., Janssen L.P.B.M. Kinetics and chemical equilibrium of the hydration of formaldehyde. *Chem. Eng. Sci.*, 2002, vol. 57, pp. 4067-4076. doi: 10.1016/S0009-2509(02)00358-5
5. Du J., Liang D.-O., Li D.-L., Li X.-J. Phase equilibrium data of binary hydrate in the system hydrogen plus acetone plus water. *J. Chem. Eng. Data*, 2010, vol. 55, no. 10, pp. 4532-4535. doi: 10.1021/je100589u
6. Zenkevich I.G., Nikitina D.A. [Revealing the reversible formation of drug hydrates by recurrent approximation of their retention parameters in reversed-phase HPLC Vyyavlenie obratimogo obrazovaniya gidratov lekarstvennykh preparatov rekurrentnoi approksimatsiei ikh parametrov uderzhivaniya v obrashchenno-fazovoi VEZHKh]. *Tez. dokladov IV Vseros. konf. molodych uchenykh "Mediko-biologicheskie aspekty khimicheskoi bezopasnosti" SPb: 18-20 Sept. 2020 g.* [Abstr. IV Conference of young scientists "Medico-biological aspects of chemical safety. St. Petersburg: Sept. 18-20, 2020], MEDLINE.RU, t11, 5 p. (In Russian).
7. Zenkevich I.G., Nikitina D.A. Features of recurrent approximation of retention parameters of polyfunctional compounds in reversed phase HPLC. *J. Phys. Chem. A.*, 2021, vol. 95, no. 2, pp. 000-000. doi: 10.31857/S004445372102028X.
8. Zenkevich I.G. Application of recurrent relations in chromatography. *J. Phys. Chem. A.*, 2008, vol. 82, no. 6, pp. 886. doi: 10.1134/S0036024408060022.
9. Zenkevich I.G. Application of recurrent relationships in chromatography. *J. Chemometrics*, 2009, vol. 23, pp. 179-187. doi: 10.1002/cem.1214.
10. Zenkevich I.G. Recurrent relationships in separation science. Ch. 24 in "Chemometrics in Chromatography" / Eds. L. Komsta, Y.V. Heyden, J. Sherma. London: CRC Press, 2018, pp. 449-468.
11. Guo M.-L. 4-Acetamido-N-(4-methylpiperazinyl)benzenesulfonamide monohydrate. *Crystallogr. Commun.*, 2004, vol. 60, part 4, pp. 574-575. doi: 10.1107/S1600536804005446.
12. Suchetan S.F., Foro S., Gowda B.T., Prakash M.S. 4-Chloro-N-(3-methylbenzoyl)benzenesulfonamide monohydrate. *Acta Crystallogr., Sect. E Struct. Rep. Online*, 2012, vol. E68, no 1, p. o46. doi: 10.1107/S1600536811051932.
13. Kompella A., Kasa S., Balina V.S., Kusumba S., Adibhatla B.R.K., Muddasani P.R. Large scale process to prepare highly pure Bosentan monohydrate. *Science J. Chem.*, 2014, vol. 2, no.6-1, pp. 9-15. doi: 10.11648/j.sjc.s.2014020601.12
14. Jatczak M., Sidoryk K., Kossykowska M., Luniewski W., Zagrodzka J., Lipiec-Abramska E. Development and validation of a UHPLC UV method for the in-process control of bosental monohydrate synthesis. *Chromatographia*, 2016, vol., 79, pp. 1131-1141. doi: 10.1007/s10337-016-3124y.
15. Tan S.L., Tiekink E.R.T. N,N'-Bis(pyridine-3-ylmethyl)ethanediamide monohydrate: crystal structure, Hirshfield surface analysis and computational study. *Acta Crystallogr.*, 2020, vol., E76, pp. 25-31. doi: 10.1107/S2056989019016153.

## REFERENCES

1. Nakayama H., Tahara M. Hydrates of organic compounds. I. Solid-liquid phase equilibria in the water + 1,4-dioxane system and some properties of 1,4-dioxane hydrate. *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1973, vol. 46, pp. 2965-2868. doi: 19.1246/bcsj. 46.2965.
2. Wilson G.J., Davidson D.W. Dielectric evidence for acetone hydrate. *Can. J. Chem.*, 1963, vol. 41, no. 2, pp. 264-273. doi: 19.1138/v63-041.