

Б. О. Варинський

Запорізький державний медичний університет, Україна
69035, Запоріжжя, пр. Маяковського, 26. E-mail: varinsky@zsmu.zp.ua

Термодинамічне дослідження морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок в умовах гідрофільної хроматографії

Мета. Вивчити залежність утримання морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату і його технологічних домішок від температури, а також визначити термодинамічні характеристики переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу під час гідрофільної хроматографії.

Результати та їх обговорення. Для дослідження термодинамічних параметрів переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу визначено коефіцієнти ємності залежно від абсолютної температури. На основі рівняння Вант-Гофа побудовано криву залежності $\ln k$ від $1/T$. Для створення рівняння лінійної залежності застосовано метод найменших квадратів. Розраховано стандартні молярні ентальпії, а також умовні стандартні ентропії переносу досліджуваних речовин із рухомої в стаціонарну фазу, а саме морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату, піридин-4-карбогідразиду, 2-ізонікотинойл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду та 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіону. Отримані негативні значення ентальпій переносу для всіх речовин свідчать, що вони адсорбуються на поверхні силікагелю із виділенням теплоти. Тому процес переходу речовини з рухомої фази в стаціонарну переважає над зворотним процесом.

Експериментальна частина. Для проведення експериментів було використано рідинно-хроматографічну систему Agilent 1260 Infinity, що складалася з дегазатора, бінарного насоса, автосамплера, термостата колонки, діодно-матричного детектора.

Висновки. Визначено, що всі досліджувані речовини мають негативні значення ентальпій переносу з рухомої в стаціонарну фазу, тому процес переходу речовини з рухомої фази в стаціонарну переважає над зворотним процесом. Розраховано умовні стандартні ентропії переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу та доведено, що вони суттєво впливають на процес переносу.

Ключові слова: термодинамічні характеристики; гідрофільна рідинна хроматографія; похідні 1,2,4-триазолу

B. O. Varynskyi*Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine*

The thermodynamic study of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and its technological impurities in hydrophilic chromatography

Aim. To study the dependence of the retention of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate and its technological impurities on temperature, as well as determine the thermodynamic characteristics of the transfer from the mobile phase to the stationary phase using hydrophilic chromatography.

Results and discussion. The retention factors depending on the absolute temperature were determined in order to study the thermodynamic parameters of the transfer of analytes from the mobile phase to the stationary one. Based on the van 't Hoff equation a curve of $\ln k$ dependence on $1/T$ was constructed. The least squares method was used to create the linear dependence equation. The standard molar enthalpies, as well as the conditional standard entropy of the transfer from the mobile to the stationary phase of the test substances, namely morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl)thio)acetate, pyridine-4-carbohydrazide, 2-isonicotinoyl-N-(2-methoxyphenyl)hydrazine-1-carbothioamide and 4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridinyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione were calculated. The negative enthalpy of the transfer for all substances shows that the substances are adsorbed on the surface of a silica gel with the release of heat. Therefore, the process of transition of a substance from the mobile phase to the stationary one prevails over the reverse process.

Experimental part. The Agilent 1260 Infinity liquid chromatography system consisting of a degasser, binary pump, autosampler, column thermostat, diode array detector was used for our experiments.

Conclusions. It has been found that all the compounds studied have a negative value of the transfer enthalpy, and it indicates the predominant transition of these analytes from the mobile phase to the stationary one. Conditional standard entropies of the analyte transfer from the mobile phase to the stationary phase have been calculated, and it has been proven that they significantly affect the transfer process.

Key words: thermodynamic characteristics; hydrophilic liquid chromatography; 1,2,4-triazole derivatives

Copyright © 2020, B. O. Varynskyi

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>)

Похідні 3-тіо-1,2,4-триазолів виявляють різноманітну біологічну активність, через що в останні роки привертають дедалі більшу увагу дослідників [1–3]. Морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетат є активним фармацевтичним інгредієнтом (АФІ) потенційного нейропротекторного та адаптогенного лікарського засобу, який перебуває на стадії реєстрації [3]. Створення хроматографічних методик кількісного визначення цього АФІ є актуальним завданням та потребує теоретичного обґрунтування.

Раніше було запропоновано методику визначення вказаного АФІ та його метаболітів в умовах гідروفільної хроматографії [4].

Термодинамічне пояснення хроматографічного утримання морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату має теоретичне та практичне значення. За допомогою температури можна контролювати селективність хроматографічного розділення. Також із підвищенням температури знижується в'язкість елюента, що є корисним з огляду на обмеження тиску під час роботи колонок. Крім того, підвищення температури збільшує розчинність неполярних сполук у воді [5].

Термодинамічні параметри дозволяють пояснити характер взаємодії аналітів із рухомою та стаціонарною фазами, а також допомагають підібрати кращі умови розділення. З огляду на це, деякі дослідники приділяють велику увагу дослідженню термодинамічних параметрів утримання [6–10]. Перехід аналіту з рухомої фази в стаціонарну та навпаки можна розглядати як рівноважний процес. Під час переважного переходу аналіту з рухомої в стаціонарну фазу спостерігається негативне значення ентальпії переносу [6, 7].

Метою цієї роботи було вивчити залежність утримання морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату та його технологічних домішок [3] від температури, а також визначити термодинамічні характеристики переносу цього АФІ з рухомої в стаціонарну фазу під час гідروفільної хроматографії.

Результати та їх обговорення

Визначення ентальпії переносу речовин з рухомої фази в нерухому проводили за допомогою методики, описаної раніше [4], із використанням колонки Agilent Zorbax Rx-Sil (4,6×50 мм, 1,8 мкм) у режимі гідروفільної хроматографії.

Дослідження термодинамічних параметрів переносу аналітів із рухомої фази в стаціонарну потребує визначення коефіцієнта ємності:

$$k = \frac{(t_r - t_0)}{t_0} = \frac{v_S}{v_M},$$

де: t_r – час утримання; t_0 – «мертвий» час утримання (час виходу компонента, що не утримується на

колонці, або час перебування несорбованої речовини у хроматографі); v_S/v_M – відношення кількості речовини (моль) аналіту в стаціонарній фазі до кількості речовини (моль) аналіту в рухомій фазі.

Відношення об'ємів рухомої та стаціонарної фаз позначаємо як β :

$$\beta = \frac{V_M}{V_S}.$$

Рівняння константи рівноваги переносу речовини, що аналізується, із мобільної в стаціонарну фазу має такий вигляд:

$$K = \frac{[A]_S}{[A]_M} = \frac{v_S}{v_M} \cdot \frac{V_M}{V_S} = k \cdot \beta.$$

Відомим є рівняння, яке пов'язує константу рівноваги переносу аналіту з рухомою в стаціонарну фазу зі зміною енергії Гіббса:

$$\begin{aligned} \Delta G^0 &= -RT \ln K; \\ \Delta G^0 &= \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0; \\ \Delta G^0 &= -RT \ln K = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0. \end{aligned} \quad (1)$$

Розділимо рівняння (1) на $-RT$ та отримаємо рівняння Вант-Гоффа [6]:

$$\begin{aligned} \ln K &= -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}; \\ \ln(k \cdot \beta) &= -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R}; \\ \ln k &= -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta. \end{aligned}$$

Надамо цьому рівнянню лінійної форми:

$$y = mx + b,$$

де: $y = \ln k$; $x = \frac{1}{T}$; $m = -\frac{\Delta H^0}{R}$; $b = \frac{\Delta S^0}{R} - \ln \beta$.

На основі отриманих рівнянь для визначення ентальпії переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу було обчислено коефіцієнт ємності залежно від зміни абсолютної температури та побудовано криві залежності $\ln k$ від $1/T$ (рис. 1).

Для створення рівняння лінійної залежності для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату, піридин-4-карбогідразиду, 2-ізонікотиноіл-*N*-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду, 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіону застосували метод найменших квадратів (табл. 1).

На рис. 2 наведено хроматограми морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату залежно від температури.

Визначення стандартної молярної ентальпії переносу аналітів із мобільної в стаціонарну фазу

Стандартну ентальпію переносу аналіту з мобільної в стаціонарну фазу розраховували на під-

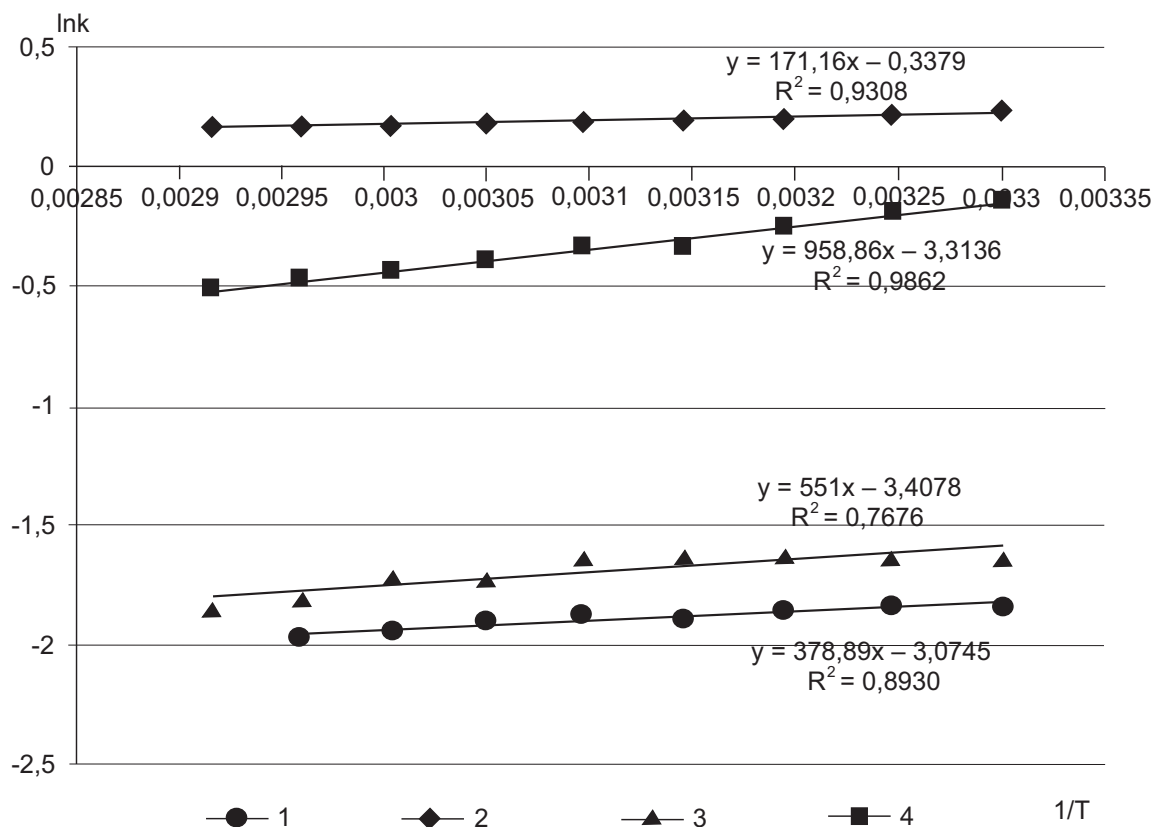


Рис. 1. Графіки залежності $\ln k$ від $1/T$ для морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату (2), піридин-4-карбогідразиду (4), 2-ізонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоаміду (3) та 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіону (1)

ставі куткового коефіцієнта m рівняння лінійної залежності:

$$\Delta H^0 = -m \cdot R.$$

Результати розрахунків стандартних ентальпій переносу наведено в табл. 2.

Негативні значення ентальпії переносу для всіх речовин (табл. 2) засвідчують, що речовини адсорбуються на поверхні силікагелю з виділенням теплоти. Тому процес переходу речовини з рухомої фази в стаціонарну переважає над зворотним процесом. Це пояснює те, що речовини в режимі гідрофільної хроматографії добре утримуються на силікагелі. Піридин-4-карбогідразид має найбільше за модулем значення ентальпії (табл. 2),

тому що є найбільш гідрофільною сполукою і відповідно краще взаємодіє із силікагелем.

Оцінювання стандартної ентропії переносу аналіту з рухомої в стаціонарну фазу

Важливою термодинамічною характеристикою утримання є ентропія переносу аналітів із рухомої в стаціонарну фазу.

Перетин графіка з віссю ординат дозволяє визначити ентропію переносу аналіту з рухомої в стаціонарну фазу:

$$\Delta S^0 = (b + \ln \beta) \cdot R.$$

Порівнюючи значення у-перетину (коефіцієнтів b) (табл. 1), можна порівняти значення ентропійного фактора для різних аналітів. Бачимо,

Таблиця 1

Рівняння лінійної залежності $\ln k$ від $1/T$, де $y = \ln k$, $x = 1/T$

№	Речовина	Рівняння	R ²	Стандартна похибка регресії, S
1	4-(2-Метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіон	$y = 378,89x - 3,0745$	0,8930	0,016938
2	Морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетат	$y = 171,16x - 0,3379$	0,9308	0,006573
3	2-Ізонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)гідразин-1-карботіоамід	$y = 551x - 3,4078$	0,7676	0,042683
4	Піридин-4-карбогідразид	$y = 958,86x - 3,3136$	0,9862	0,015988

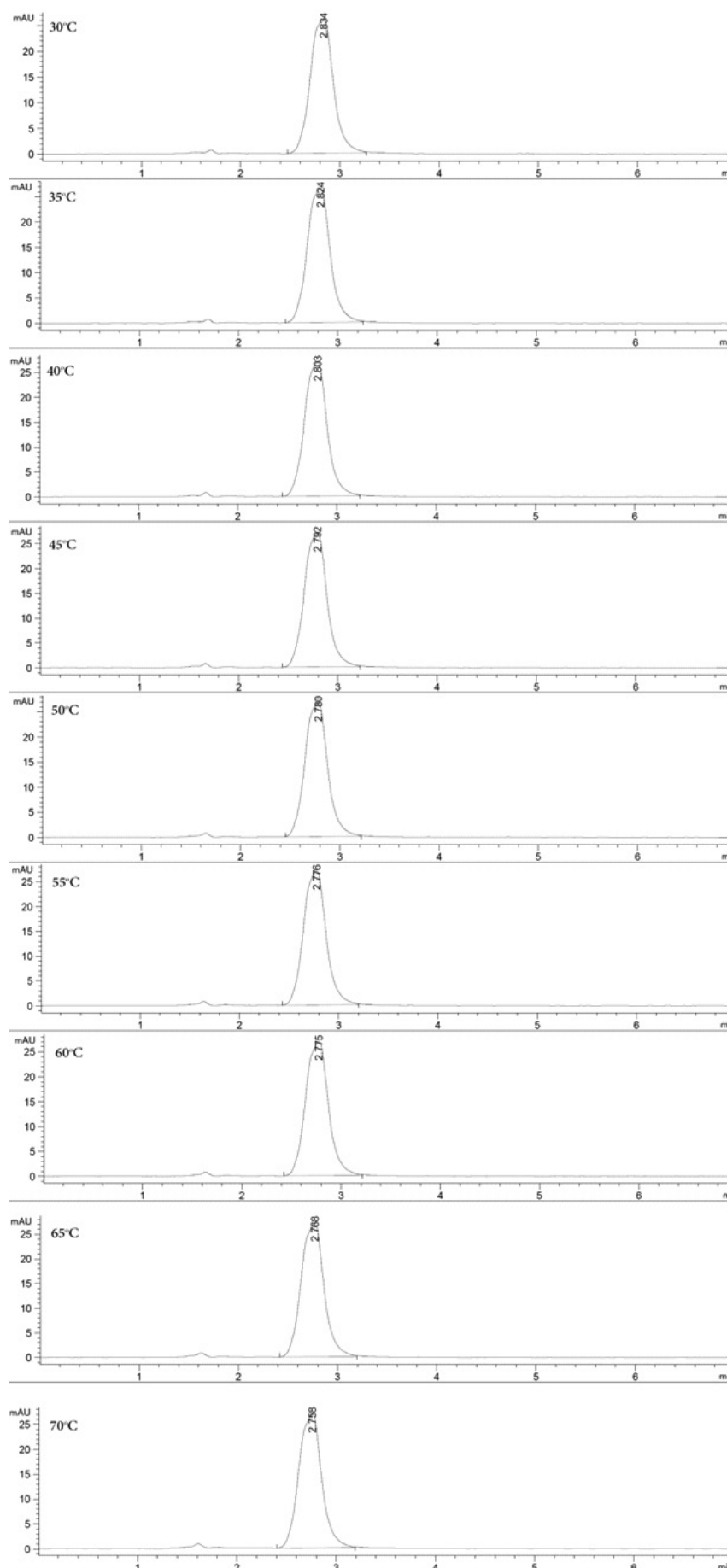


Рис. 2. Хроматограми морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату залежно від температури колонки

Таблиця 2

Стандартні ентальпії та умовні стандартні ентропії переносу аналітів із мобільної фази в стаціонарну

№	Речовина	ΔH^0 , кДж/моль	ΔS^0 , кДж/моль
1	4-(2-Метоксифеніл)-5-(піридин-4-іл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіон	-3,15	-0,0271
2	Морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)-тіо)ацетат	-1,42	-0,00436
3	2-Ізонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоамід	-4,58	-0,0299
4	Піридин-4-карбогідрозид	-7,97	-0,0291

що всі коефіцієнти b мають негативне значення. Чим більшим є за абсолютною величиною цей коефіцієнт, тим більше знижується ентропійний фактор і тим більше знижується утримання. За зниженням ентропійного фактора речовини можна розташувати так: 2→1→4→3.

Для того щоб приблизно розрахувати ентропійний фактор, пропонуємо використати таку модель.

Об'єм рухомої фази V_M можна оцінити за формулою:

$$V_M = t_0 \cdot v,$$

де: t_0 – «мертвий» час утримання; v – швидкість потоку.

«Мертвий» час утримання було визначено за допомогою компонента, що не утримується на силікагелі в умовах гідрофільної хроматографії – KNO_3 . Він дорівнював 1,25 хв.

$$V_M = t_0 \cdot v = 1,25 \cdot 0,4 = 0,5 \text{ мл.}$$

Об'єм стаціонарної фази було розраховано згідно з уявленням, що колонку було максимально щільно упаковано сферичними частинками сорбенту. Відповідно до гіпотези Кеплера [11] максимальна щільність упаковки сфер є $\pi/\sqrt{18} \approx 0,74048$. Тому сферичний сорбент може займати максимум 74% від об'єму колонки. Колонка має циліндричну форму, тому її об'єм можна розрахувати так:

$$V_{\text{column}} = h \cdot \pi \cdot r^2 = 5 \cdot 3,14 \cdot 0,23^2 = 0,83 \text{ мл.}$$

За щільності пакування 74% (ідеальне пакування) максимальний об'єм стаціонарної фази складає:

$$V_{s(\text{max})} = 0,74 \cdot 0,83 = 0,6 \text{ мл.}$$

Проте справжній об'єм стаціонарної фази, у якому буде присутній аналіт, є меншим, тому пропонуємо ввести умовну величину β' :

$$\beta' = \frac{V_M}{V_{s(\text{max})}} = \frac{0,5}{0,6} = 0,83.$$

З огляду на те, що справжнє значення відношення об'ємів рухомої та стаціонарної фази нам невідомо, пропонуємо розрахувати умовне (при-

близне) значення стандартної ентропії переносу аналізу з рухомої фази в стаціонарну:

$$\Delta S^0 = (b + \ln \beta) \cdot R.$$

Результати розрахунку умовного значення ентропії (табл. 2) мають таку ж послідовність зниження, яку було визначено на підставі у-перетину: 2→1→4→3. Найбільшу величину має морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-4H-1,2,4-триазоліл)тіо)ацетат, а точніше його протонувана кислотна форма, яка утворюється в присутності метанової кислоти, що містить елюент. Поряд із негативним значенням ентальпії переносу це свідчить про здатність добре адсорбуватись на силікагелі, і ця сполука справді має найбільше значення коефіцієнта ємності.

Результати доводять, що умовний ентропійний фактор порівняно з ентальпійним фактором має дуже невеликі значення (приблизно в 100 разів менші), але він теж суттєво впливає на стандартну енергію Гіббса, тому що множиться на абсолютну температуру (298 К). Отже, вплив ентропії на перенос аналізу з рухомої фази в стаціонарну є істотним.

Експериментальна частина

Реактиви

Воду високої чистоти (18 М Ω , 25 °C) готували за допомогою приладу Direct Q 3UV (Millipore, Molsheim, France). Ацетонітрил використовували кваліфікації «HPLC Super Gradient» (Avantor Performance Materials Poland S.A., Poland), кислоту метанову кваліфікації «For analysis» (98%) (AppliChem GmbH, Germany).

Морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетат, 2-ізонікотиноіл-N-(2-метоксифеніл)-гідрозин-1-карботіоамід та 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіон синтезовано та підтверджено структуру на кафедрі фізикоїдної хімії ЗДМУ під керівництвом доктора фармацевтичних наук, професора А. Г. Каплаушенка. Субстанцію піридин-4-карбогідрозиду кваліфікації «х.ч.» було придбано в ТОВ «НВП «УКРОРГСИНТЕЗ».

Обладнання

Застосовували ВЕРХ систему Agilent 1260 Infinity, що складається з дегазатора (Agilent Techno-

logies, Japan), бінарного насоса (Agilent Technologies, Germany), автосамплера (Agilent Technologies, Germany), термостата колонки (Agilent Technologies, Germany), діодно-матричного детектора (Agilent Technologies, Germany). Програмне забезпечення OpenLAB CDS.

Хроматографічні умови

Використано колонку Agilent Zorbax Rx-Sil (4,6×50 мм, 1,8 мкм). Елюент складався з 0,1% HCOOH в ацетонітрилі та 100 mM HCOONH₄ у воді (80:20). Швидкість потоку дорівнювала 0,4 мл/хв, об'єм інжекції – 1 мкл. Довжина хвилі діодно-матричного детектора 272 нм.

Приготування розчинів

Розчин морфоліній 2-((4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-4H-1,2,4-триазол-3-іл)тіо)ацетату з концентрацією 0,01% готували розчиненням речовини у воді. Розчини піридин-4-карбогідрази, 2-ізонікотиніол-N-(2-метоксифеніл)гідрозин-1-карботіоаміду готували в 50% ацетонітрилі з концентрацією 0,1%. Розчин 4-(2-метоксифеніл)-5-(піридиніл)-2,4-дигідро-3H-1,2,4-триазол-3-тіону з концентрацією 0,1% готували в диметилсульфоксиді.

References

1. Kaplaushenko, A. G. Synthesis, physicochemical and biological properties of S-derivatives of 5-(2-, 3-, 4-nitrophenyl)-1,2,4-triazol-3-thiones. Ph.D. Thesis, Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, Kyiv, 2006.
2. Kaplaushenko, A. G. Synthesis Methods and Biological Activity of 1,2,4-Triazol-3-thions. *Ukrainian biopharmaceutical journal* **2009**, 1 (4), 48–56.
3. Kaplaushenko, A. G. Synthesis, structure and biological activity of 4-mono- and 4,5-disubstituted 1,2,4-triazole-3-one derivatives. D.Sc. Thesis, Zaporizhzhya State Medical University, Zaporizhzhya, 2012.
4. Varynskyi, B.; Kaplaushenko, A. Metabolism study of morpholinium 2-((4-(2-methoxyphenyl)-5-(pyridin-4-yl)-4H-1,2,4-triazole-3-yl)thio)acetate. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* **2020**, 33 (2), 72–75. <https://doi.org/10.2478/cipms-2020-0014>.
5. Linford, M. R.; Clark, J.; Teutenberg, Th. Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part I: Benefits and Practical Considerations. *LCGC Europe* **2013**, 26 (2), 78–85.
6. Linford, M. R.; Jensen, D. S.; Clark, J.; Teutenberg, Th. Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part II: Basic Thermodynamics of Elevated Temperature LC, Including the van 't Hoff Relationship. *LCGC North America* **2012**, 30 (11), 992–998.
7. Linford, M. R.; Jensen, D. S.; Clark, J.; Teutenberg, Th. Elevated Temperatures in Liquid Chromatography, Part III: A Closer Look at the van 't Hoff Equation. *LCGC North America* **2012**, 30 (12), 1052–1057.
8. Rane, V. P.; Ahirrao, V. K.; Patil, K. R.; Jadhav, R. A.; Ingle, R. G.; More, K. B.; Yeole, R. D. Enantiomeric Separation and Thermodynamic investigation of (R)-5-[1-(4-Nitrobenzylsulfonyloxy)-ethyl]-5-(pyridine-2-yl)-[1,3,4]-thiadiazole, a Key Intermediate of Nafithromycin. *Analytical Chemistry Letters* **2019**, 9 (5), 625–633. <https://doi.org/10.1080/22297928.2019.1694433>.
9. Zhang, L.; Hu, Y.; Galella, E.; Tomasella, F. P.; Fish, W. P. Separation of atropisomers by chiral liquid chromatography and thermodynamic analysis of separation mechanism. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2017**, 7 (3), 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.jpfa.2017.03.003>.
10. Dungalová, J.; Lehotay, J.; Krupčík, J.; Čižmárik, J.; Armstrong, D. W. Study of the mechanism of enantioseparation Part VI: Thermodynamic study of HPLC separation of some enantiomers of phenylcarbamic acid derivatives on a (S,S) Whelk-O 1 column. *J. Sep. Sci.* **2004**, 27 (12), 983–990. <https://doi.org/10.1002/jssc.200301591>.
11. Hales, T. C. An overview of the Kepler conjecture. <https://arxiv.org/pdf/math/9811071.pdf> (accessed Nov 11, 2020).

Received: 11. 08. 2020

Revised: 25. 10. 2020

Accepted: 14. 11. 2020